DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FİZYOLOJİK ÖNEME SAHİP MELATONİNİN İZOLASYONUNA YÖNELİK İNDOL GRAFT MEMBRANLARIN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU

Can ÇETİN

Şubat, 2016
İZMİR

FİZYOLOJİK ÖNEME SAHİP MELATONİNİN İZOLASYONUNA YÖNELİK İNDOL GRAFT MEMBRANLARIN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU

Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi
Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Can ÇETİN

Şubat, 2016
İZMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

CAN ÇETİN, tarafından **PROF. DR. M. NALAN TÜZMEN** yönetiminde hazırlanan **"FİZYOLOJİK ÖNEME SAHİP MELATONİNİN İZOLASYONUNA YÖNELİK İNDOL GRAFT MEMBRANLARIN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU"** başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. M. Nalan TÜZMEN
Yönetici

Prof. Dr. Hülya AYAR KAYALI
Jüri Üyesi

Doç. Dr. Bilgen Osman
Jüri Üyesi

Prof.Dr. Ayşe OKUR
Müdür
Fen Bilimleri Enstitüsü

TEŞEKKÜR

Çalışmamım her aşamasında derin bilgi ve birikimiyle bana destek olan, her hatamı sabır ve sevgiyle karşılayan, bilime olan aşkıyla ve yüreğindeki sevgiyle dünyanın geri kalanına örnek olması gereken değerli hocam Prof. Dr. M. Nalan Tüzmen'e

Her başım sıkıştığında bilgisine danıştığım arkadaşım, hocam Araş. Gör. Tülden İnanan Kalburcu' ya

Son olarak hayatımın her döneminde bana destek olan, bana inanan ve güvenen aileme

Çok teşekkür ederim.

Can ÇETİN

FİZYOLOJİK ÖNEME SAHİP MELATONİNİN İZOLASYONUNA YÖNELİK İNDOL GRAFT MEMBRANLARIN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU

ÖZ

Melatonin (5-metoksi-N-asetiltriptamin), noroendokrin sisteminin ve günlük uyku düzeninin regulasyonunu sağlayan önemli bir hormondur. Melatoninin immün cevap, kanser ve depresif sendromlar gibi çeşitli hastalıklara karşı oldukça etkili olduğu, nemlendirici, yağlanmayı önleyici, yenileyici, kırışıklık önleyici olarak kozmetiklerde de yaygın kullanıma sahip olduğu bilinmektedir. Tıp ve kozmetik endüstrisindeki bu yaygın kullanımları nedeniyle, yüksek bitkiler gibi doğal kaynaklardan melatoninin yüksek saflık ve seçicilikte, hızlı ve düşük maliyetli bir yöntemle ekstraksiyonu ve tayini büyük önem taşımaktadır. Son 20 yılda katı faz ekstraksiyonu alanında yapılan yoğun araştırmalar, çeşitli matrikslerdeki analitin seçici ekstraksiyonu için yeni materyallerin geliştirilmesine öncülük etmiştir.

Bu çalışmada, kompleks biyolojik matrikslerdeki melatoninin zenginleştirilmesi ve kantitatif tayini için katı faz kartuşu olarak kullanılabilecek polimerik membranların hazırlanması, karakterize edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, 2-hidroksietil metakrilatın (HEMA) UV-başlatıcılı fotopolimerizasyonuyla p(HEMA) membranlar hazırlanmıştır. Membranlar L-triptofan graft edilmesinden sonra adsorpsiyon yoluyla melatoninin ekstraksiyonunda kullanılmıştır. Membranlar üzerine sulu çözeltilerden melatonin adsorpsiyonu, farklı melatonin derişimleri ile farklı süre ve sıcaklıklarda kesikli sistemde çalışılmıştır. L-Trp graft pHEMA membranlar üzerine maksimum melatonin adsorpsiyon kapasitesi 36.58 mg/g olarak bulunmuştur. Adsorplanan melatonin trietilamin:methanol karışımı (1:9) ile %100 oranında desorplanmıştır. Hazırlanan L-Trp graft p(HEMA) membranların kromatografik analiz öncesi önderiştirilmelerinde tekrar tekrar kullanılabileceği gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: Afinite matriks, graft membran, melatonin, izolasyon, ekstraksiyon

PREPARATION AND CHRACTERIZATION OF INDOLE GRAFTED MEMBRANES TO ISOLATE PHYSIOLOGICALLY IMPORTANT MELATONIN

ABSTRACT

Melatonin (5-methoxy-*N*-acetyltryptamine) is an important hormone that plays a role in regulating the neuroendocrine system, and in the regulation of the circadian sleep-wake cycle. It is known that melatonin is very effective various diseases such as cancer, depressive syndrome and immune system and also that melatonin has broad usage in cosmetics as moisturizer, lipoidozis preventive, regenerative, anti-wrinkle. Due to their common usage in medicine and cosmetic industry, extraction and determination of melatonin with high purity and selectively using rapid and low-cost method from natural sources, such as high plants, have great importance. In the last 20 years, intensive researches about solid phase extraction field have guided to develop new materials for selective extraction of analyte from several matrixes.

In this study, preparation and characterization of polymeric membranes which can be used as SPE cartridge for the extraction and determination of melatonin in complex biological matrices were aimed. For this purpose, p(HEMA) membranes were prepared with UV-initiated photopolymerization of 2-hydroxyethylmethacrylate. The membrane was then grafted with L-tyrptophane and used for the extraction of melatonin via adsorption. Melatonin adsorption onto the membrane from aqueous solutions was studied with different amounts of melatonin at different temperature and time in a batch system. The maximum melatonin adsorption capacity of the L-Trp grafted pHEMA membranes was found to be 36.58 mg/g. 100% of the adsorbed melatonin was desorbed by using triethylamine:methanol mixture (1:9) as desorption agent. It was demonstrated that the prepared L-Trp grafted pHEMA membranes could be repeatedly applied to extraction of melatonin before chromatographic analysis.

Keywords: Affinity matrix, grafted membrane, melatonin, isolation, extraction

İÇİNDEKİLER

Sayfa

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU ii
TEŞEKKÜR iii
ÖZ iv
ABSTRACT v
ŞEKİLLER LİSTESİ viii
TABLOLAR LİSTESİ ix

BÖLÜM BİR-GİRİŞ 1

1.1 Melatonin 1
1.2 Afinite Kromatografisi 6
1.2.1 Afinite Kromatografisinin Bileşenleri 9
1.2.2 Katı Destek Materyali 9
1.2.3 Ligand 10
1.2.4 Uzantı Kolu 12

BÖLÜM İKİ-MATERYAL METOD 16

2.1 Kimyasallar 16
2.2 p(HEMA) Membranların Sentezi 16
2.3 p(HEMA) Membranlara L-Triptofan Graft Edilmesi 17
2.4 L-Triptofan Graft Edilmiş p(HEMA) Membranların Karakterizasyonu 18
2.5 Melatonin Adsorpsiyonunun Optimizasyonu 19
2.5.1 Melatonin Adsorpsiyonuna Süre Etkisi 19
2.5.2 Melatonin Adsorpsiyonuna Başlangıç Melatonin Derişiminin Etkisi 21
2.5.3 Melatonin Adsorpsiyonuna Sıcaklık Etkisi 24
2.5.4 Melatonin Adsorpsiyonuna İyon Şiddeti Etkisi 24
2.6 Desorpsiyon 25
2.7 Melatoninin HPLC İle Analiz Koşulları 25

BÖLÜM ÜÇ-VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ..... 27

3.1 L-Triptofan Graft p(HEMA) Membranların Karakterizasyonu 28
3.2 L-Triptofan Graft p(HEMA) Membranlara Melatonin Adsorpsiyon Koşullarının Optimizasyonu 30
3.2.1 Melatonin Adsorpsiyonuna Süre Etkisi 30
3.2.2 Melatonin Adsorpsiyonuna Başlangıç Melatonin Derişiminin Etkisi 31
3.2.3 Melatonin Adsorpsiyonuna Sıcaklık Etkisi 33
3.2.4 Melatonin Adsorpsiyonuna İyon Şiddeti Etkisi 34
3.3 Desorpsiyon 35

BÖLÜM DÖRT-SONUÇLAR 37

KAYNAKLAR 38

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1 Afinite kromatografisinin sınıflandırılması ……..7
Şekil 1.2 Afinite kromatografisinin genel prensibi ……..8
Şekil 1.3 Afinite kromatografisinde kullanılan ligandlar 12
Şekil 2.1 p(HEMA) membran sentez şeması ……....17
Şekil 2.2 p(HEMA) membranlara L-Triptofan graft işlem şeması ……18
Şekil 2.3 100 ppm melatonin standardının kromatogramı ……26
Şekil 3.1 p(HEMA) ve L-Trp-graft p(HEMA) membranların yapısı 27
Şekil 3.2 (a) p(HEMA) ve (b) L-triptofan graft p(HEMA) membranların FTIR spektrumları.....29
Şekil 3.3 p(HEMA) membranların SEM fotoğrafları ……29
Şekil 3.4 L-Triptofan graft p(HEMA) membranların şişme izotermi ……...30
Şekil 3.5 Melatonin adsorpsiyonuna sürenin etkisi ……...31
Şekil 3.6 Melatonin adsorpsiyonuna başlangıç derişiminin etkisi .……...32
Şekil 3.7 Melatonin adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi ……34
Şekil 3.8 Melatonin adsorpsiyonuna iyon şiddetinin etkisi…….... 34
Şekil 3.9 L-Triptofan graft p(HEMA) membranlardan melatonin desorpsiyonu 35
Şekil 3.10 L-Triptofan graft p(HEMA) membranların tekrar kullanılabilirliği 36

TABLOLAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1 Çeşitli bitkisel kaynakların melatonin içerikleri 2
Tablo 1.2 Katı faz ekstraksiyonunda kullanılan ticari sorbentler 4
Tablo 1.3 Afinite kromatografisi ile saflaştırılan biyomoleküller 8
Tablo 1.4 Afinite kromatografisinde kullanılabilecek matriksler 10
Tablo 2.1 Langmuir izotermi için R_L değerleri 23
Tablo 2.2 Melatoninin HPLC ile analiz koşulları 25
Tablo 3.1 Triptofan graft p(HEMA) membranlara melatonin adsorpsiyonunun kinetik verileri 31
Tablo 3.2 Triptofan graft p(HEMA) membranlara melatonin adsorpsiyonu için adsorpsiyon izoterm modellerinin verileri 33

BÖLÜM BİR
GİRİŞ

1.1 Melatonin

İlk kez yaklaşık 50 yıl önce keşfedilen melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin), çeşitli fonksiyonlarda rol alan ve pineal glanddan salgılanan bir nörohormondur. Melatonin başlangıçta nöroendokrin fizyolojisi, özellikle de üretkenlik fizyolojisi ile ilgili bir molekül olarak tanımlanmış (Reiter, 1993; Malpaux, Migaud, Tricoire ve Chemineau, 2001), daha sonra günlük ritim ve uyku proseslerinde de yer aldığı bulunmuştur (Melamud ve diğer., 2012). Ayrıca, melatonin metabolizma, üreme, denge, kas koordinasyonu ile bakteri, virus, kimyasal kirleticiler ve serbest radikaller gibi hastalık etkenleriyle savaşan immun sistemin kontrolünde de önemli fonksiyonlara sahiptir (Arendt, 1988; Reiter, 1991; Maestroni, 1993). Bunun yanı sıra, melatoninin immün cevap, kanser ve depresif sendromlar gibi çeşitli hastalıklara karşı oldukça etkili olduğu da bilinmektedir (Jung ve Ahmad, 2006).

Melatonin, hem yağda (Reiter, 1998) hem de suda (Reiter, 1996; Tauitou, 2001) çözünebilir. Ancak yağdaki çözünürlüğü daha fazladır. Melatonin sentezlenince hemen dolaşıma salınır. Bu hızlı salınım, hormonun lipofilik özelliğine bağlıdır. Bu sayede pinealosit membranından ve kılcal damar endotelinden rahatça geçer. Melatoninin kandaki konsantrasyonu, gece sentezlenip salınmasına bağlı olarak gece boyunca gündüzün 5-15 katı daha yüksektir. Lipofilik özelliğine bağlı olarak, kolayca kandan vücut sıvılarına, hücrenin bütün organellerine ve hücre çekirdeğine ulaşabildiği gibi kan-beyin bariyerini de kolayca geçer. Böylece, çok geniş bir dağılımda antioksidan aktivite gösterir (Karbownik ve Reiter, 2000). Melatonin, sadece bir memeli sentetik ürünü değildir, yenebilen çeşitli bitkilerin yanı sıra memeli olmayan tüm vertebralılarda, algleri ve bakterileri içeren vertebrasızlarda da bulunur (Chen ve diğer., 2003; Posmyk ve Mjanas 2009; Rodriguez ve diğer, 2011; Aguilera ve diğer, 2014; Reiter ve diğer., 2015). Bu nedenle melatonin, sadece endojen olarak üretilen bir antioksidan değildir; aynı zamanda besin yoluyla da alınabilir (Reiter, 1996; 1998). Melatonin, yüksek bitkilerin kök, gövde, yaprak, çiçek, meyve ve tohum gibi birçok organında genellikle gram doku başına pikogram

veya nanogram arasında değişen konsantrasyonlarda bulunur. Tohumlarda ortalama melatonin miktari 2-200 ng/g kuru ağırlık olarak belirlenmistir (Posmky ve Janus, 2009). Aşağıdaki tabloda farklı bitkilerin melatonin içerikleri verilmiştir.

Tablo 1.1 Çeşitli bitkisel kaynakların melatonin içerikleri

Yaygın isim	**Organ**	**Melatonin miktarı (ng/g)**
Gündüzsefası	Yaprak	0,0005
Muz	Meyve	0,002
Gündüzsefası	Filiz	0,004
Kuşkonmaz	Filiz	0,01
Pancar	Kök	0,01
Yabani çilek	Meyve	0,01
Soğan	Çiçek soğanı	0,03
Salatalık	Meyve	0,03
Ananas	Meyve	0,04
Elma	Meyve	0,05
Havuç	Kök	0,06
Çin lahanası	Yaprak	0,10
Lahana	Yaprak	0,10
Kırmızı kazayağı	Filiz	0,20
Arpa	Tohum	0,40
Domates	Meyve	0,50
Sarımsak	Kök	0,60
Kırmızı turp	Kök	0,60
Şalgam	Kök	0,70
Pirinç	Tohum	1,00
Yulaf	Tohum	2,00
St. John’s maltı	Yaprak	2,00
Şevketibostan	Tohum	2,00
Krizantem	Yaprak	2,00
Mısır	Tohum	2,00
St. John’s maltı	Çiçek	4,00
Uzun çayırotu	Tohum	5,00
Haşhaş	Tohum	6,00
Kereviz	Tohum	7,00
Kişniş	Tohum	7,00
Anason	Tohum	7,00
Keten	Tohum	12,00
Yeşil kakule	Tohum	15,00
Kiraz	Meyve	18,00
Rezene	Tohum	28,00
Ayçiçeği	Tohum	29,00
Badem	Tohum	39,00
Çemen otu	Tohum	43,00
Kurt üzümü	Tohum	103,00
Kara lahana	Tohum	129,00
Beyaz lahana	Tohum	189,00

İnsan diyetindeki doğal melatonin kaynaklarını bulmayı amaçlayan iki farklı çalışma ile yüksek bitkilerde melatonin varlığı belirlenmiştir (Dubbels ve diğer., 1995; Hattori ve diğer., 1995). 1997'de nörolojik hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılan şifalı bitkilerin umulandan daha yüksek miktarda melatonin içerdiği belirlenmiştir (Murch, Simmons, ve Saxena, 1997). Melatonin klinik olarak jet gecikmesi ve uyku bozukluklarının tedavisinde kullanılır (Brzezinski ve diğer., 2005). Alzheimer hastalarında melatonin salgılanması baskılandığından 1995'ten bu yana Alzheimer hastalarının uyku bozukluklarının tedavisi amaçlı melatonin kullanılmaktadır (Sanders, Chaturvedi, ve Hordinsky, 1999; Jan, Freeman ve Fast 1999). Ayrıca, melatoninin immün cevap, kanser ve depresif sendromlar gibi çeşitli hastalıklara karşı oldukça etkili olduğu da literatürde yer almaktadır (Lissoni ve diğer., 1999; Dolberg, Hirschmann, Grunhaus, 1998; Jung ve Ahmad, 2006). Melatonin ve analogları ayrıca, nemlendirici, yağlanmayı önleyici, yenileyici, kırışıklık önleyici, cilt ağartıcı, güneş ve atmosferin neden olduğu aktinik hasarı önleyici olarak kozmetiklerde de yaygın kullanıma sahiptir. Melatoninin antioksidatif ve nörodüzenleyici fonksiyonlarının, çeşitli hastalıkların melatonince zengin şifalı bitkilerle tedavisinde etkin olabileceği düşünülmektedir (Watanabe ve diğer., 2002). Ancak melatoninin yeşil bitkiler gibi kompleks matrikslerden zenginleştirilmesi, belirlenmesi ve kantitatif tayini oldukça güçtür. Tıp ve kozmetik endüstrisindeki bu yaygın kullanımları nedeniyle, doğal kaynaklardan melatoninin yüksek saflık ve seçicilikte, hızlı ve düşük maliyetli bir yöntemle zenginleştirilmesi ve tayini büyük önem taşımaktadır.

Melatonin tayini amaçlı analitik metotlar, kullanılan tekniğe bağlı olarak nanogramdan pikograma kadar değişen miktarlarda tayini mümkün kılar (Rodriguez-Naronjove diğer., 2011; Stürtz ve diğer., 2011; Oladi, Mohamadi, Shamspur, Mostafavi, 2014) . Günümüzde kullanılan analitik teknikler radyoimmunolojik yöntem (RIA), enzim-aracılı immunosorbent yöntemi (ELISA), elektrokimyasal ve floresans dedektörlü yüksek performans sıvı kromotografisi (HPLC) ve gaz kromotografi-kütle spektrometridir (GC-MS) (Sagara, Okatani, ve Yamanaka, 1998; Yie, Johansson, ve Brown, 1993). Modifiye bir ekstraksiyon prosedürüyle birlikte çalışan ticari RIA kitlerinin kalsiyum heparin gibi kimyasallarla girişim yaptığı

belirlenmiştir (Sieghart, Ronca, Drexler ve Karall, 1987; Plebani ve Masiero, 1990). Rutin olarak kullanılan radyoimmün testle (RIA) karşılaştırıldığında geliştirilen enzim aracılı immünosorbent yönteminin (ELISA) teknik olarak daha basit olduğu ve daha küçük numune hacmiyle çalışma olanağı sağladığı belirlenmiştir, ancak bu yöntem düşük melatonin düzeylerini belirlemek için ek deriştirme basamağına gereksinim duyar (Chegini, Ehrhart-Hofmann, Kaider ve Waldhauser, 1995). Bu metotlarla kıyaslandığında, son yıllarda melatoninin kantitatif tayini amaçlı HPLC teknikleri kullanılmaktadır (Penitson-Bird ve diğer., 1993). Elektrokimyasal dedeksiyonlu HPLC metotları mobil faz bileşimiyle ilgili bazı sınırlamalar içermekle birlikte kısa analiz süresi ve radyoaktif reaktife gereksinim duymaması gibi avantajlara sahiptir (Mefford ve Barchas, 1980; Vieira, Miguez, Lema ve Aldegunde, 1992). Floresans dedeksiyonlu çalışmalar, metanol-su ya da etilasetat gibi basit bir mobil faz kullanılan daha kararlı bir metodu kullanmaktadır (Vitale, Ferrari, Aldana ve Affani, 1996). HPLC metodlarının temel dezavantajı düşük konsantrasyonların ölçümünde oldukça büyük hacimlere gereksinim duymasıdır. Tayin sınırları, 0.2-2.0 mL plazma için 2-20 pg/mL,8 mL idrar için 7 pg/mL'dir. Bununla birlikte, karışımlardaki tüm bileşenlerin ayrılması mümkün olmadığı durumlarda nicel analizde kesinlik ve doğrulukta eksiklik olmaktadır. Bu nedenle, örnek hazırlama aşamasında genellikle sıvı-sıvı ekstraksiyonu, katı-faz ekstraksiyonu (KFE), katı-sıvı ekstraksiyonu, ultrasonik ekstraksiyon, matriks katı faz dispersiyonu gibi yöntemler geliştirilmekte ve kullanılmaktadır. Yüksek örnek hacmi, kolay analit geri alınımı, yüksek geri kazanım, hızlı örnek yüklemesi, az organik çözücü gereksinimi gibi özelliklerinden dolayı KFE, diğer ekstraksiyon yöntemlerinden daha avantajlıdır. Ticari olarak kullanılan farklı KFE sorbentleri mevcuttur (Tablo 1.2).

Tablo 1.2 Katı faz ekstraksiyonunda kullanılan ticari sorbentler

TİCARİ SORBENT (KARTUŞ) TÜRLERİ	
CarboPrep SPE Kartuşlar	Kapalı Uçlu SPE Kartuş : Aktive Edilmiş Sodyum Sülfat
Pestisit Kalıntısı Cleanup SPE Kartuşlar	CarboPrep Revers SPE Kartuşlar
Resprep SPE Kartuşlar (Normal Fazlar)	Resprep SPE Kartuşlar (Polimerik DVB Adsorbentler)
Resprep SPE Kartuşlar (İyon Değiştirici Fazlar)	Resprep SPE Kartuşlar (Bağlı Ters Fazlar)
Düzenli C8 ve C18 SPE Kartuşlar	Ftalatsız C8 ve C18 SPE Kartuşlar
EPA Metot 525.2 için C18 SPE Kartuşlar	Unbonded Silika (Asit Yıkamalı) SPE Kartuşlar

Bununla birlikte aşağıdaki gibi farklı polimerik yapılar KFE sobenti olarak kullanılabilirler:

- ✓ Polianilin
- ✓ stiren-metakrilat ve stiren-N-vinilpirolidon kopolimerleri
- ✓ poli-N-metilanilin (PNMA) ve polidifenilamin
- ✓ Polipirol(PPy)
- ✓ Polimerik karma mod anyon değiştirici (Oasis MAX, Waters).
- ✓ Modifiye edilmemiş ve hidroksillenmiş polistiren divinilbenzen polimerleri
- ✓ Stiren-divinilbenzen

İspanya'nın ana tarım alanlarından biri olan Ebro deltasındaki pestisitlerin ve transformasyon ürünlerinin varlığını belirlemek amacıyla gerçekleştirilen bir çalışmada stiren-divinil benzen katı faz sorbenti olarak kullanılmıştır (Aguilar, Ferrer, Borrull ve Barceló, 1999).

Fitalat ve yüksek yoğunluklu uçucu yağ asitlerinin ortamdan uzaklaştırılması amacıyla gerçekleştirilen bir çalışmada, modifiye edilmemiş ve hidroksillenmiş polistiren divinilbenzen polimerlerinin KFE sorbenti olarak kullanımı incelenmiştir (Jonsson ve Boren, 2002).

Katı faz ekstraksiyon sorbenti olarak polimerik karma mod anyon değiştirici (Oasis MAX, Waters) kartuşun kullanıldığı başka bir çalışmada ise sanayi ve kentsel atık sularında bulunan düşük seviyelerdeki beta laktam antibiyotiklerin zenginleştirilmesi amaçlanmıştır (Benito-Peña, Partal-Rodera, León-González ve Moreno-Bondi, 2006).

Su örneklerinden bazı çevresel kirleticilerin (fenol, pestisit ve poliaromatik hidrokarbonlar) katı faz ekstraksiyonu ile tayini veya uzaklaştırılması amacıyla pirol bazlı polimerik yeni bir sorbent sentezlenmiştir (Bagheri ve Mohammadi, 2003).

Bagheri ve Saraji tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, polianilin su örneklerinden bazı çevresel kirleticilerin katı faz ekstraksiyonu için yeni bir sorbent

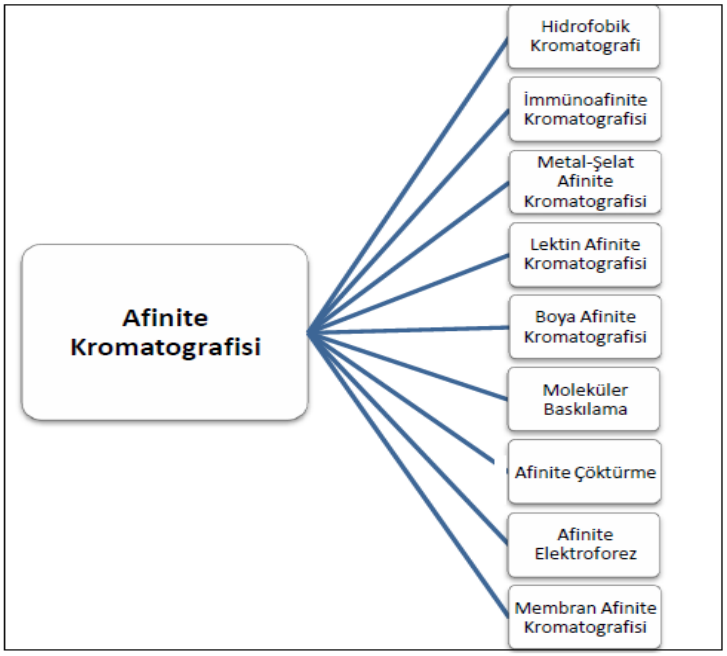
olarak kullanılmıştır. İlk kez, iletken bir polimer olan polianilin, organik mikro-kirletici maddelerin katı faz ekstraksiyonu için paketleme materyali olarak kullanılmıştır. Polimer çevresel su numunelerinden klorofenollerin önderiştirilmesi için test edilmiştir. (Bagheri ve Saraji, 2001)

Üç farklı iletken polimerin (poli-N-metilanilin, polianilin ve polidifenilamin) sentezlendiği bir çalışmada, sudan bazı fenolik bileşiklerin katı faz ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş ve sulu çözeltilerdeki farklı organik bileşiklerin zenginleştirilmesi için KFE materyali olarak kullanılan anilin bazlı iletken polimerlerin etkinliğini araştırılmıştır (Bagheri ve Saraji, 2003).

Yukarıdaki literatür bilgisinden görüleceği üzere, KFE amacıyla genellikle ticari sorbentler kullanılmaktadır. Ancak son yıllarda, farklı yapı ve özelliklerdeki afinite sorbentleri geliştirilmekte ve saflaştırma, uzaklaştırma ve KFE amacıyla yaygın kullanım alanı bulmaktadır.

1.2 Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisi, belli bir moleküler yapı ve yönlenmeye sahip immobilize ligand ile hedef molekül arasındaki seçici ve tersinir etkileşime dayalı bir ayırma yöntemidir. Bu etkileşimlere örnek olarak antijen-antikor, enzim-inhibitör ilişkisi verilebilir. Hemen hemen bütün biyomoleküllerin biyolojik fonksiyonları veya kendilerine özgü kimyasal yapılarından faydalanarak saflaştırılmasını mümkün kılan biyospesifik tanıma temelli bu yöntem ayırma teknolojisinde eşsiz bir yer tutar (Denizli ve Küfrevioğlu, 2010). Afinite kromatografisinin birçok uygulaması vardır:



Şekil 1.1 Afinite kromatografisinin sınıflandırılması

Afinite kromatografisinde saflaştırma çoğu zaman birkaç bin kat olur ve aktif materyalin geri kazanılması genelde çok yüksektir. Diğer tekniklerle saflaştırılması çok basamaklı işlemler gerektiren, çok zaman alan ve hatta ayrılması mümkün olmayan birçok biyolojik materyal, bu teknikle tek bir basamakta saflaştırılabilir. Bu sebepten dolayı afinite kromatografisi şu amaçlarla kullanılabilir (Mohr ve Pommering, 1986):

a) Kompleks biyolojik karışımlardan maddeleri saflaştırmak için,

b) Bazı maddelerin denatüre olmuş şekillerinden doğal şekillerini ayırmak için.

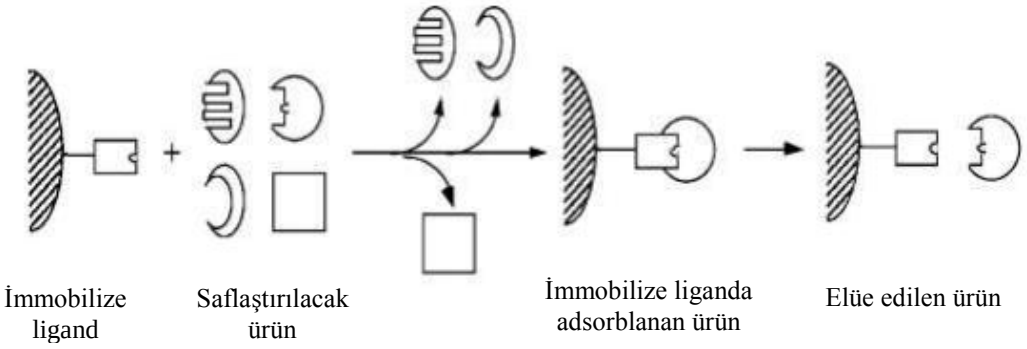
c) Büyük miktarlardaki kirleticiyi, küçük miktardaki biyolojik materyallerden ayırmak için.

Aşağıdaki tabloda afinite kromatografisi ile saflaştırılabilen bazı biyomoleküller gösterilmektedir.

Tablo 1.3 Afinite kromatografisi ile saflaştırılan biyomoleküller

1. Antibadiler ve Antijenler	8. Reseptörler
2. Enzimler ve İnhibitörler	9. Lektinler ve Glikoproteinler
3. Regülatör Enzimler	10. RNA ve DNA
4. Dehidrogenazlar	11. Bakteriler
5. Transaminazlar	12. Virüsler ve Fajlar
6. Hormon bağlayıcı proteinler	13. Hücreler
7. Vitamin bağlayıcı proteinler	14. Diğer

Afinite kromatografisinin genel prensibi Şekil 1.2'de gösterilmiştir. Ligandın kovalent olarak bağlandığı katı destek, kromatografik kolonda sabit faz olarak kullanılır. Ayrılacak olan biyomolekülü içeren ham karışım kolondan geçirilir, belirlenen deneysel koşullarda immobilize olan afinite ligandı ile etkileşime girecek uygun grupları bulunmayan moleküller kolondan alıkonmadan çıkarlar, afinitesi olanlar ise kolonda adsorplanırlar. Ligand ile saflaştırılan biyomolekül arasında kompleks oluşumu iyonik etkileşim, hidrofobik kuvvetler, London dispersiyon kuvveti, dipol dipol etkileşimi veya yük-transfer etkileşimleri gibi genel moleküler kuvvetler ile gerçekleşir. Bu kuvvetlerden birkaçının aynı zamanda gerçekleşmesi biyospesifik bağın seçiciliği ve etkinliğini oluşturan en temel etmendir.



Şekil 1.2 Afinite kromatografinin genel prensibi

Afinite kromatografisi 5 aşamadan oluşur (Magdeldin ve Moser, 2012):

1. Uygun bir ligand seçimi
2. Ligandın matriks üzerine immobilizasyonu

3. Elde edilen molekül karışımının kolona yüklenmesi
4. Oluşan safsızlıkların ortamdan uzaklaştırılması
5. Hedef molekülün saf olarak elüasyonu

1.2.1 Afinite Kromatografisinin Bileşenleri

Afinite kromatografisi büyük biyomoleküllerin kompleks karışımlardan ayırma ve saflaştırılmasında kullanıldığında;

- Destek (Matriks)
- Ligand
- Uzatıcı kol bileşenlerinin bulunması gerekir (Mohr ve Pommerenning, 1986).

1.2.2 Katı Destek Materyali

Destek matriksinin seçimi, afinite sistemlerindeki ilk dikkat edilecek noktadır. Matriks seçiminde dikkat edilmesi gereken ilk husus matriksin fiziksel ve kimyasal olarak kararlı olmasıdır. Matriks tek başına ayrılması istenen biyomolekülle hiçbir etkileşime girmeyecek şekilde inert ve saf olmalıdır (Bailon, Ehrlich, Fung ve Berthold, 2000). Matriks, yüzeyinde ligandların tutuklanması için hidroksil, karboksil, amino gibi fonksiyonel gruplara sahip olmalıdır. Matriks, hidrofilik ve nötral davranış, iyi bir kimyasal, mekanik ve biyolojik kararlılık ve sıcaklığa karşı dayanıklılık göstermeli ve kimyasal reaksiyonlarla türevlendirilmeye izin vermelidir. Afinite ortamındaki tutuklanmış ligand ile hedef molekül arasında spesifik etkileşim gerçekleşebilmelidir. Afinite kromatografisinde kullanılacak olan matriksin gözenekli bir yapıya sahip olması gerekir. Matriksin gözenek yapısının biyomolekülün gözeneklere girmesine ve liganda bağlanmasına olanak sağlayacak şekilde büyük olması gerekir. İyi bir akışkanlık göstermeli ve kırılmaya uğramaması için kararlı bir yapıya sahip olmalıdır. Belirli pH ve sıcaklık aralığında çalışabilmeli, ayrıca kolay aktive edilmelidir. Ayrıca matriks ucuz olmalı ve tekrar kullanılabilmelidir (Mohr ve Pommerenning, 1986; Bailon, Ehrlich, Fung ve Berthold, 2000).

Katı destek olarak doğal veya sentetik polimerler kullanılabilir. Doğal polimerlerden, agaroz, dekstran, selüloz ve kitosan gibi makromoleküller, yüksek afinite gösterir; fakat mekanik olarak zayıf materyallerdir. Poliakrilatlar, polistiren, polietilen türevleri gibi sentetik polimerler ise, mekanik dayanıklılıkları yüksek, kimyasal ve biyolojik degredasyona dirençli malzemelerdir. Bu nedenle söz konusu sentetik polimerler, afinite matriksi olarak yaygın kullanım alanı bulurlar.

Tablo 1.4 Afinite kromatografisinde kullanılabilecek matriksler

Matriks	***Ticari Örnekler***
Agaroz (Çapraz Bağlı)	*Affi-jel* *Sepharose* *Acti- jel* *Avid-jel* *Reacti-jel*
Poliakrilamid/agaroz Akrilamid/akrilat Oligoetilenglikol/metakrilat türevleri	*Ultrajel* *Eupergit* *Fractojel*
Silika	*TSK*

Kullanılan destek materyalleri, mikro- ya da nano-boyutta küre, çubuk, kriyojel veya membran formlarında hazırlanabilir. Kolon kromatografisinde kullanılan küçük küreler ve sıkıştırılmış yumuşak jeller, kolon içerisinde yüksek basınca ve akış hızının azalmasına neden olur. Membran tipi destek malzemeleri ile düşük basınç düşmesi, yüksek akıs hızı ve yüksek verimlilik gibi sonuçlar elde edilir. Bunların yanında kolay paketleme imkânı, büyük ölçeğe uygulanabilirliği, tıkanma sorunun olmaması gibi üstünlükler de sayılabilir. Bu yüzden membran yapıda hazırlanabilen kromatografi matriksi biyomoleküllerin geri kazanılması, saflaştırılması, izolasyonu için büyük ölçekli saflaştırma işlemlerinde dikkat çekicidir (Yie ve diğer., 2010).

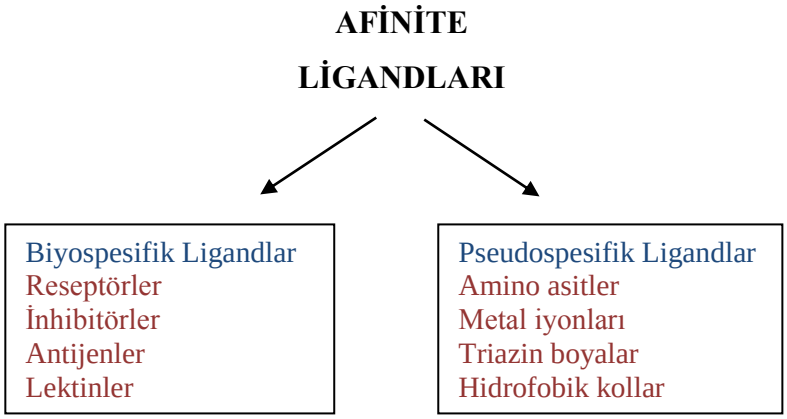
1.2.3 Ligand

Hedef moleküle özgün bağlanma yeteneği gösteren molekül, ligand olarak isimlendirilir. Hedef molekül, uygun şartlar altında matriks üzerine tutuklanmış

seçici ligand ile kovalent olmayan spesifik etkileşime dayanan adsorpsiyon işlemi ile yüzeyde tutulur. Daha sonra adsorplanan molekül farklı pH, iyonik şiddet ve uygun spesifik elüentler kullanılarak biyolojik molekül ile matriks arasındaki non-kovalent ilişkinin bozulması ile desorbe edilir (Denizli ve Pişkin, 2001; Zeng ve Ruckustein, 1999). Kromatografik ayırımda kullanılacak destek materyaline bağlanacak ligandın, hedef moleküle spesifik ve tersinir olarak bağlanması ve destek materyaline de bağlanmaya olanak verecek gruplar içermesi gerekir. Ligandın matris yüzeyine bağlanmasının herhangi bir aktivasyon işlemi gerektirdiği durumlarda, aktivasyon veya modifikasyon işlemi ligandın spesifik bağlanma aktivitesini zayıflatmamalı ve zarar vermemelidir (Klein, 1991). Ayrıca, kromatografi sırasında uygulanacak kimyasal işlemlere karşı ligandın kararlı olması da gerekir. Ligandın matrikse bağlandığı bölgenin seçimi de önemlidir. Ligand çeşitli fonksiyonel gruplara sahipse, saflaştırılacak moleküle en az ihtimalle spesifik etkileşme verecek grup vasıtasıyla matrikse bağlanmalıdır. Öte yandan, matrikse ligandın direkt bağlanması sterik etkilere neden olabilir. Bu nedenle özellikle küçük molekül kütleli ligandlar için uzantı kolu kullanılmalıdır.

Biyomoleküllerin ayrımı için kullanılan biyospesifik ligandların yerine daha ekonomik ve küçük molekül olmalarının yanında yüksek fiziksel ve kimyasal karalılık sunmaları gibi avantajlardan dolayı boyalar, amino asitler ve metal şelat gibi pseudo spesifik ligandlar kullanılmaktadır.

Afinite kromatografisinde kullanılan ligandlar; pseudo-spesifik ligandlar (amino asitler, metal şelatlar ve boya-ligand) ve biyo-spesifik ligandlar (enzim, substrat, koenzim, kofaktör, oligopeptid, protein, nükleik asit, oligonükleotid, antibadi ve antijen) olmak üzere iki grup altında incelenebilir (Arıca, Yılmaz, Yalçın ve Bayramoğlu, 2004). Spesifik ligand taşıyan afinite sorbentlerin hazırlanma aşamalarında, destek malzemelerine bağlanması ve biyolojik aktivitelerini uzun süre korumaları mümkün olmamaktadır. Bu doğrultuda, pseudo-spesifik ligandlar spesifik ligandlara önemli alternatif oluşturmaktadır (Arıca, Yılmaz, Yalçın ve Bayramoğlu, 2004; Arıca ve Bayramoğlu, 2005; Bayramoğlu, Şenel, Yalçın ve Arıca, 2006; Bayramoğlu, Yılmaz ve Arıca, 2004).



Şekil 1.3 Afinite kromatografide kullanılan ligandlar

1.2.4 Uzantı Kolu

Afinite kromatografisi yönteminde, saflaştırılacak molekülün liganda bağlanması konusunda önemli bir sorun yaşanmaktadır. Hedef molekülün bağlanma bölgeleri bazen derinlerde bulunur ve sterik bağlanmadan dolayı giriş olayı zor olur (Magdeldin ve Moser 2012). Küçük ligandları (enzim kofaktörleri gibi) doğrudan matrikse bağlamak suretiyle hazırlanan destek malzemeleri, matriks ile liganda bağlanan maddeler arasında sterik engellemelerden dolayı küçük ayırma kapasitesi gösterebilirler (Keçili ve diğer., 2007). Daha iyi ve efektif bağlanma çevresini, aynı zamanda yeterli bağlanmayı sağlayabilmek için matriks ve ligand arasına uzantı kolu takılır (Magdeldin ve Moser, 2012). Bu uzantı kolunun uzunluğu kritiktir. Eğer çok kısa olursa beklenen etkiyi gösteremez ve ligand örnek içindeki hedef maddeleri bağlayamaz. Çok uzun olursa ayırma işleminin seçiciliği azalır ve ara kol ile örnekteki maddeler hidrofobik etkileşime girerler. Uzantı kolu adı verilen bu molekülün 6-8 karbonlu bir yapıdan oluşması kolon veriminin en yüksek seviyede olmasını sağlar (Keçili ve diğer., 2007).

Çeşitli hastalıkların melatonince zengin şifalı bitkilerle tedavisinde, melatoninin antioksidatif ve nörodüzenleyici fonksiyonlarının etkin olabileceği düşünülmektedir. Ancak, melatoninin yeşil bitkiler gibi kompleks matrikslerden zenginleştirilmesi, belirlenmesi ve kantitatif tayini oldukça güçtür. Literatürde bu amaçla gerçekleştirilmiş çeşitli çalışmalar mevcuttur.

Cao ve ark., bitki örneklerindeki melatonin, serotonin ve auksinin HPLC-MS/MS ile tayinini çalışmış ve melatonin için tayin sınırını 5 pg/mL olarak belirlemişlerdir. Bu çalışmada bitki örnekleri ince kıyıldıktan sonra metanol ile ektrakte edilmiş ve ekstraktlar HPLC-MS/MS ile analiz edilmiştir (Cao, Murch, O'Brien, ve Saxena, 2006).

Nunez-Vergara ve arkadaşlarının ticari tabletlerdeki melatonin ve pridoksinin GC-MS ile tayini amaçlı çalışmalarında, tabletler metanol ile ekstrakte edilmiş N-metil-N-trimetilsililtrifloro asetamid (MSTFA/TMSCl 100:1) ile türevlendirmenin ardından GC-MS ile analiz sonucu tabletteki melatonin miktarı 5 ng/mL, pridoksin miktarı ise 2 ng/ml olarak belirlenmiştir. Çalışmadaki yöntem basit, kesin, tekrarlanabilir olarak değerlendirilmiş ancak tayin icin metanol ekstraksiyon işleminin ardından türevlendirme gerekliliği nedeniyle işlem süresinin uzadığı belirtilmiştir (Nunez-Vergara ve diğer., 2001). Ticari MELATONE isimli tabletteki melatonin miktarı bir başka çalışmada HPLC ile analiz sonucunda 1 µg/mL olarak bulunmuştur (Ayano ve diğer., 2007).

Chen ve ark., (2003) 108 farklı Çin şifalı bitkisindeki melatonin miktarını KFE sonrası HPLC-MS ile belirlemişlerdir. Bu amaçla bitki tozları metanolde 30 dak. süreyle süspanse edildikten sonra süpernatan azot atmosferinde kurutulmuş ve metanol-su karışımında tekrar çözündükten sonra ticari C18 KFE kartuşuna uygulanmıştır. Bu yöntemle 108 bitkinin 64 tanesinde 10 ng/gdan fazla, 43 tanesinde ise 100 ng/gdan fazla melatonin tayin edilmiştir.

Simonin ve ark., (1999) biyolojik sıvılardaki melatonini naftalenik yapısal analogu S 20098 varlığında tayin edebilmek için immunolojik analizleri incelemişlerdir. Oldukça benzer moleküller varlığında, LC-RIA yönteminin tayin sınırı 15 pg/mL olarak belirlenmiş, bu yöntemin yeterince hassas olmaması ve rutin analizlerde kullanımının zor olması nedeniyle, daha hassas GC-MS tekniği geliştirilmiştir. Bu teknikte GC-MS ile analiz öncesi plazma örnekleri için ticari C8 Amprep kartuşlar ile katı faz ekstraksiyonu, tükrük icin n-hekzan ve diklorometan ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu uygulanmıştır. Bu metodla plazma ve tükrük için tayin sınırı 1

pg/mL olarak belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda, immunolojik testlerin duyarlılığının S 20098 gibi melatonin analoglarının varlığında düşük olması nedeniyle biyolojik sıvılardaki melatonin tayini için GC-MS'in hem spesifiklik hem de duyarlık acısından tercih edilen bir yöntem olduğu belirlenmiştir.

Yukarıdaki literatür özetlerinden anlaşılacağı üzere melatonin izolasyonu ve tayini amacıyla ekstraksiyon için metanol, n-hekzan ve diklorometan gibi çözücüler ya da C8 Amprep ve C18 gibi ticari KFE sorbentleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Melatoninin tayininde yeni nesil polimerik sistemlerin kullanımına yönelik literatürde sadece bir çalışma bulunmaktadır. Nomachi ve ark. tarafından yapılan bu çalışmada, sadece H-bağları etkileşimlerinden yararlanılarak moleküler baskılanmış polimer hazırlanmasında farklı çözücülerin etkisi incelenmiştir. Amid bağı ve indol halkasına sahip olan melatoninin baskılanmasında, melatonin analoğu olan N-propiyonil-5-methoksitriptamin (NPMT) yalancı kalıp olarak kullanılmıştır. Baskılama işleminde, fonksiyonel monomer olarak methakrilik asit (MAA), çarpraz bağlayıcı olarak etilenglikol dimetakrilat kullanılmıştır. Melatonin seçici polimerler, non-kovalent baskılama metodu ile farklı H-bağlama kapasitesine sahip çözücüler ($CHCl_3$, MeCN ve THF) içerisinde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen polimerlerin performansı kromatografik olarak incelenmiştir. Melatonin ile çözücü arasındaki H-bağları oranının ve melatonin ile MAA arasındaki H-bağı oluşumunda çözücü etkisinin, etkin baskılama bölgelerinin oluşum için en önemli faktör olduğu sonucuna varılmıştır (Nomachi, Kubo, Hosoya ve Kaya, 2006).

Literatür özetlerinden de görüleceği üzere, farklı kaynaklardaki melatoninin tayininde daha yaygın olarak sıvı-sıvı ekstraksiyonu kullanılmakta, KFE ise ticari kartuşlarla gerçekleştirilmektedir. Son yıllarda partiküllerle doldurularak hazırlanan kolonların yerine membranlar, KFE da içeren etkin afinite ayırmalarında ilgi çekici hale gelmektedir (Hennion, 1999; Roper ve Lightfoot, 1995). Öte yandan membranların farklı grup ve yöntemlerle modifikasyonları da uygulama alanlarını genişletmektedir. Doğal amino asit taşıyan membranlar ise biyolojik moleküller için doğala özdeş bir yapay mikro-çevre oluşturmaktadır. Tüm bunlar gözönüne alınarak bu çalışmada, kompleks biyolojik matrikslerdeki melatoninin belirlenme ve kantitatif tayini için katı faz kartuşu olarak kullanılabilecek triptofan iceren HEMA bazlı

polimerik afinite membranlarının hazırlanması, karakterize edilmesi ve melatonin adsorpsiyon koşullarının optimizasyonu amaçlanmıştır. Bu amaçla, ilk aşamada HEMA'nın UV-başlatıcılı fotopolimerizasyonuyla p(HEMA) membranlar hazırlanmıştır. Sonra NaH varlığında p(HEMA) membranların karbonil grupları üzerinden L-triptofan graft edilmiştir. Son aşamada da L-triptofan graft edilen fonksiyonel membranların adsorpsiyon yoluyla melatoninin zenginleştirilmesinde kullanımı amacıyla sistem parametrelerinin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

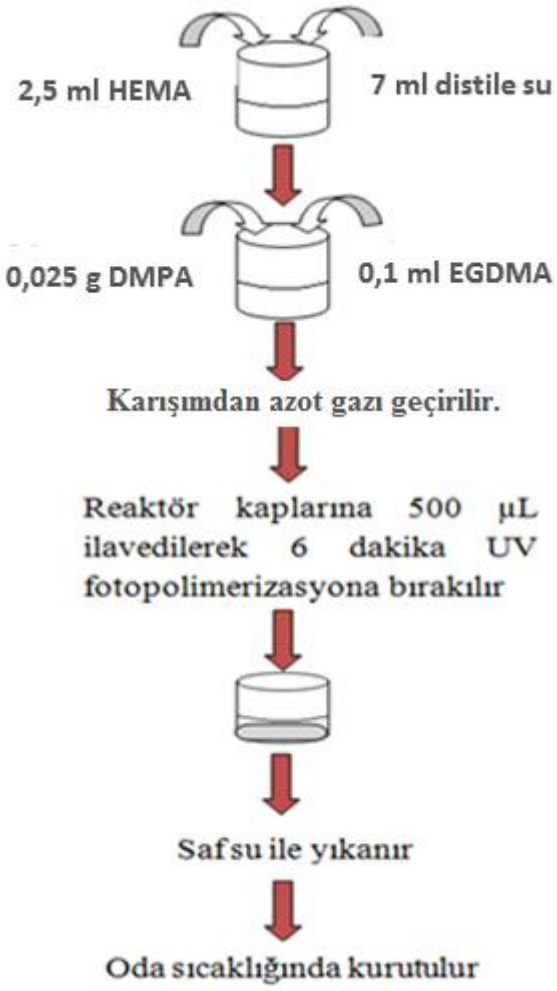
BÖLÜM İKİ
MATERYAL METOD

2.1 Kimyasallar

Denemeler için gerekli olan melatonin, 2-hidroksietilmetakrilat (HEMA), etilen glikol dimetakrilat (EGDMA), 2,2-dimetoksi-2-fenilasetofenon (DMPA), L-triptofan, sodyum hidrür, metanol, asetonitril, asetik asit, tetrahidrofuran, etil asetat, trietanolamin ve sodyum klorür Sigma-Aldrich (USA) firmasından temin edildi. Kullanılan diğer tüm kimyasallar analitik saflıktadır. Denemelerde kullanılan su, Millipore ultra saf su cihazı [Millipore Corporation (France) Elix 5® reverse osmoz ünitesi, elektrodeiyonizasyon (E.D.I) modülü (Elix ® 5 Water Purification System), organik/kolloid uzaklaştırıcı iyon değişim sistemi] ile üretildi.

2.2 p(HEMA) Membranların Sentezi

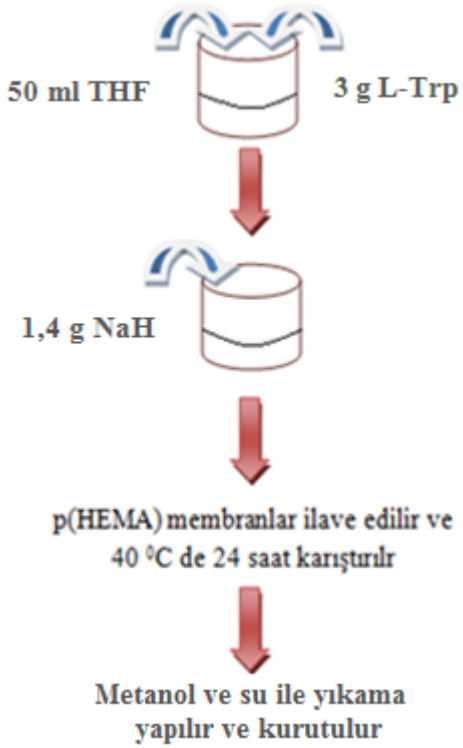
p(HEMA) membranlar, serbest radikal fotopolimerizasyon yöntemiyle sentezlendi. Sentez, fotobaşlatıcı olarak DMPA (2,2-dimetoksi-2-fenilasetofenon) (toplam monomerin ağırlıkça %1'i), çapraz bağlayıcı olarak EGDMA (5,2 mmol; etilen glikol dimetakrilat), HEMA (8 mmol; 2-hidroksietilmetakrilat) monomer ve distile su kullanılarak gerçekleştirildi. Ortamdan çözünmüş oksijenin uzaklaştırılması için karışımdan 5 dakika azot gazı geçirildi. Hazırlanan karışımdan 10 mm çapındaki cam petrilere 0,5 mL konularak 6 dakika UV fotopolimerizasyona bırakıldı. Sentezlenen membranlar perforatör ile 0,6 cm çapında disklere ayrılarak denemelerde kullanmaya hazır hale getirildi. Hazırlanan membranlar metanol ve distile su ile yıkanarak oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Sentezin akış şeması Şekil 2.1'de verilmiştir.



Şekil 2.1 p(HEMA) membran sentez şeması

2.3 p(HEMA) Membranlara L-Triptofan Graft Edilmesi

L-Trp-graft p(HEMA) membranların hazırlanmasında aşağıdaki prosedür takip edildi. 20 g kuru p(HEMA) membran diskler, 3 g L-triptofan, katalizör olarak 1,4 g NaH ve 50 mL tetrahidrofuran içeren reaksiyon kabına konuldu. Graft işlemi 24 saat boyunca 225 rpm çalkalama hızıyla ve 40°C'de gerçekleştirildi. Reaksiyon sonunda membranlar ortamdan uzaklaştırıldı ve zayıf olarak adsorplanmış olan L-triptofan moleküllerin uzaklaştırıması amacıyla metanol ve distile su ile iyice yıkandı ve vakum altında kurutulmaya bırakıldı (Şekil 2.2). Membranlar daha sonra kullanılmak üzere +4°C'de saklandı.



Şekil 2.2 p(HEMA) membranlara L-Triptofan graft işlem şeması

2.4 L-Triptofan Graft Edilmiş p(HEMA) Membranların Karekterizasyonu

L-Trp-graft p(HEMA) membranların karakterizasyonları, Fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR), taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ve şişme testi ile gerçekleştirildi.

p(HEMA) ve L-Trp-graft p(HEMA) membranların FTIR spektrumu, FTIR spektrofotometresi (Perkin Elmer 100 FTIR) kullanılarak elde edildi. Bu amaçla, kurutulmuş membranlar (0,1 g), KBr (0,1 g, IR Grade, Merck, Almanya) ile homojen olarak karıştırılarak tablet haline getirilip 4000-450 cm^{-1} dalga sayısı aralığında FTIR spektrumu çekildi.

L-Trp-graft p(HEMA) membranların yüzey morfolojini belirlemek amacıyla İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Malzeme Araştırma Merkezi'nde SEM görüntüleri alındı. Örnekler analiz öncesi 7 gün süreyle 25°C'de kurutuldu. p(HEMA) membranların iletkenliğini arttırmak amacıyla yüzeye altın kaplama yapıldıktan

SEM cihazı (Quanta 250 S FEG) ile görüntü alındı. Örneğin yüzeyi, membranların morfolojisini belirlemek için istenilen büyüklükte tarandı.

Sentezlenen L-Trp-graft p(HEMA) polimerik membran sistemlerin şişme davranışları incelendi. Sentezlenen ve perforatör ile küçük disklere ayrılan polimerik membranlar etüvde kurutuldu. Kuru ağırlığı bilinen membran diskleri 25 °C'de su banyosunda distile su içerisinde bekletilerek belirli zaman aralıklarında çıkartılıp etrafındaki fazla su uzaklaştırıldıktan sonra ağırlıkları hassas terazide ölçüldü. Polimerik membranların şişmeleri denge değerine gelene kadar denemeye devam edildi. Deneme sonunda elde edilen tartım değerlerine göre polimerik membranların % şişme değerleri aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlendi (Uygun ve diğer., 2014):

$$\% S = [(W_t - W_0) / W_0] \times 100 \quad (2.1)$$

Eşitlikte W_t herhangi bir t anındaki şişmiş membranın, W_0 ise başlangıçtaki kuru membranın ağırlığıdır. Her bir membran için yüzde şişme değeri olan % S değeri zamana bağlı olarak değişim grafiği elde edildi.

2.5 Melatonin Adsorpsiyonunun Optimizasyonu

Adsorpsiyon çalışmaları, kesikli sistemde gerçekleştirildi. Adsorpsiyon koşullarının optimizasyonu amacıyla, süre, derişim, sıcaklık, iyon şiddeti gibi değişkenlerin adsorpsiyona etkisi araştırıldı.

2.5.1 Melatonin Adsorpsiyonuna Sürenin Etkisi

Melatonin adsorpsiyonu üzerine sürenin etkisini belirlemek amacıyla metanolde hazırlanan 100 mg/L melatonin çözeltisine bir adet membran konularak 25°C'de 10, 20, 30, 45, 60, 90 ve 120 dakika süreyle orbital karıştırıcıda karıştırmaya bırakıldı. Belirlenen sürelerin sonunda melatonin miktarları belirlenerek adsorpsiyon kapasitesinin süreyle değişimi incelendi.

Adsorplanan melatonin miktarı aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

$$Q = \frac{C_{başlangıç} - C_{son}}{m} \times V \quad (2.2)$$

Bu eşitlikte, Q, gram membran başına adsorplanan melatonin miktarını (mg/g); $C_{başlangıç}$, başlangıç melatonin konsantrasyonunu (mg/L); Cson, adsorpsiyon sonrası belirlene melatonin konsantrasyonunu (mg/L); m, kuru membran ağırlığını (g); V ise adsorpsiyon hacmini (L) ifade eder.

Melatonin adsorpsiyon hızının tanımlanması amacıyla denge süresini kontrol eden adsorpsiyon kinetikleri uygulandı. Yalancı-birinci-mertebe kinetik modeli, adsorpsiyon kinetiklerinin belirlenmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Langergren ve Svenska (1898) tarafından tanımlanan model aşağıdaki denklemle ifade edilmektedir:

$$\ln (q_e - q_t) = \ln q_e - k_1 t \quad (2.3)$$

Denklemde, q_e ve q_t (mg/g) denge anında ve herhangi bir anda adsorplanan melatonin miktarını; k_1 (1/h) adsorpsiyon hız sabitini ifade etmektedir. Süreye karşı ln ($q_e - q_t$) grafiğe geçirildiğinde, elde edilen doğru denkleminin eğiminden k_1, kesim değerinden ln q_e değerleri elde edilir (Langergren ve Svenska, 1898).

Denge adsorpsiyonuna dayanan yalancı-ikinci-mertebe denklemi ise aşağıdaki şekilde ifade edilmektedir:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e} + \frac{1}{q_e} \quad (2.4)$$

Bu denklemde, k_2 (g/mg h) hız sabitini ifade etmektedir. Süreye karşı t/qt değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle elde edilen doğru denkleminin eğimi $1/q_e$, kesim noktası $1/k^2q^2_e$ değerlerini vermektedir. Bu yöntem genellikle adsorpsiyonun tüm aralığı üzerindeki davranışını öngörmektedir (Ho ve McKay, 1998).

Adsorpsiyon verilerinin uygulanabilirliğinin analizi için Elovich eşitliği

kullanılmaktadır.

$$q_t = \left(\frac{1}{\beta}\right) \ln(\alpha\beta) + \frac{1}{\beta} \ln t \qquad (2.5)$$

Denklemdeki, α (mg/g h) başlangıç adsorpsiyon hızını ifade ederken, β (g/mg) ise yüzey yayılımının boyutuyla ilgilidir. $1/\beta$ ve $1/\beta \ln(\alpha\beta)$ parametreleri, ln t'nin q_t'ye karşı grafiğe geçirilmesiyle elde edilen eğim ve kesim değerleridir (Ozacar ve Sengil, 2005). $1/\beta$ değeri adsorpsiyon için uygun bölgelerin sayısını belirtirken, $1/\beta \ln(\alpha\beta)$ değeri ln t' nin sıfıra eşit olduğu durumda adsorpsiyon miktarıdır. Bu değer, ilk basamağın adsorpsiyon davranışını anlamada yardımcıdır (Tseng, 2006).

Bu kinetik modeller, difüzyon mekanizmasını açıklamada yeterli olmadıklarından Weber ve Morris (1962) tarafından önerilen partikül içi difüzyon modeli uygulanmaktadır. Çoğu adsorpsiyon işleminde yaygın olan tutunmanın temas süresinden çok $t^{1/2}$ ile orantılı olarak değiştiği durumda deneysel olarak belirlenen fonksiyonel ilişkidir. Teoriye göre:

$$q_t = k_{pi} t^{1/2} + Ci \qquad (2.6)$$

i basamağının hız parametresi olan k_{pi} (mg/g $h^{1/2}$), $t^{1/2}$' ye karşı grafiğe geçirilen qt değerlerinden elde edilen denklemin eğiminden belirlenmektedir. Denklemin kesim değerinden elde Ci, sınır katmanının kalınlığı hakkında fikir vermektedir. Örnek olarak daha büyük Ci, daha büyük sınır katmanı etkisini ifade etmektedir (Weber ve Morris, 1962).

2.5.2 Melatonin Adsorpsiyonuna Başlangıç Melatonin Derişiminin Etkisi

Melatonin adsorpsiyonu üzerine başlangıç konsantrasyonunun etkisini incelemek amacıyla 5-600 mg/L aralığındaki konsantrasyonlarda hazırlanan melatonin çözeltilerine Trp-graft p(HEMA) membranlar eklenerek orbital karıştırıcıda (225 rpm) karıştırmaya bırakıldı. 1 saat sonunda adsorpsiyon ortamından örnekler alınarak melatonin miktarları belirlendi.

Adsorpsiyon izotermi, adsorpsiyon işlemi dengeye ulaştığında adsorplanan moleküllerin katı ve sıvı arasındaki dağılımını gösteren en önemli bilgidir. Diğer bir deyişle, adsorpsiyon izotermleri, denge durumunda adsorban ile adsorplanan arasındaki etkileşimin belirlenmesi için kullanılmaktadır. Langmuir izotermi, yüzey üzerine tek tabakalı adsorpsiyonu ifade etmektedir. Sonsuz sayıda adsorpsiyon bölgesi içeren adsorbanın tabakalarına adsorplanan göçü olmamaktadır. Langmuir izoterminin doğrusal eşitliği:

$$C_e/qe = 1/(Lq_m) + (C_e/q_m) \tag{2.7}$$

şeklinde verilmektedir. q_e, denge durumunda adsorbanın birim ağırlığınca adsorplanan melatonin miktarını (mg/g) ve C_e, çözeltideki melatoninin denge derişimini (ppm) ifade etmektedir. q_m, tek tabaka adsorpsiyon kapasitesini (mg/g) verir ve L, adsorpsiyon enerjisiyle ilgilidir (L/mg). C_e/q_e, C_e'ye karşı grafiğe geçirildiğinde, elde edilen denklemin eğimi $1/q_m$, kesim noktası $1/L\ q_m$ değerini vermektedir (Weber ve Chakkravorti, 1974).

Langmuir izoterminin temel karakteristiğini oluşturan denge sabiti, R_L, olarak tanımlanan boyutsuzluk sabiti Weber ve Chakkravorti (1974) tarafından aşağıdaki gibi önerilmiştir.

$$R_L = \frac{1}{1 + L\ C_0} \tag{2.8}$$

L, Langmuir sabiti olarak tanımlanırken, C_0 en yüksek başlangıç melatonin derişimini (ppm) ifade etmektedir (Weber and Chakkravorti, 1974). Kesikli sistem adsorsiyonlarında R_L değerlerinin (Tablo 2.1) 0 ile 1 aralığında hesaplanması durumunda adsorpsiyon işlemi istemli olarak yorumlanabilmektedir.

Tablo2.1 Langmuir izotermi için R_L değerleri

R_L Value	Adsorpsiyon Türü
$R_L > 1,0$	İstemsiz
$R_L = 1,0$	Doğrusal
$0 < R_L < 1$	İstemli
$R_L = 0$	Dönüşümsüz

Freundlich modeli, heterojen ya da değişen afiniteye sahip yüzeyler üzerine adsorpsiyona dayanan deneysel bir denklemdir. Daha kuvvetli bağlanma bölgelerinin ilk olarak dolduğu ve bağlanma kuvvetinin artan bağlanma bölgesi dolum derecesi ile azaldığı öne sürülmektedir. Freundlich eşitliğinin doğrusal biçimi aşağıdaki gibi verilmektedir.

$$\log q_e = \log K_f + n_f \log C_e \tag{2.9}$$

Freundlich sabiti, K_F, adsorpsiyon kapasitesini ve Freundlich sabiti, n_f, adsorpsiyon işleminin istemliliğini belirtmektedir. log C_e' ye karşı çizilen log q_e'den elde edilen denklemin eğimi n_f, kesim noktası log K_F değerini vermektedir (Freundlich, 1906). 0 ile 1 arasında bir değere sahip olan n_f yüzey heterojenitesinin belirtecidir. $n_f < 1$ olduğunda normal Langmuir izotermine uymakta, $n_f > 1$ olduğunda ise kooperatif adsorpsiyonun belirtecidir (Altınışık ve diğer., 2010).

Temkin izotermi adsorban-adsorplanan ilişkilerini açıkça hesaplayan bir faktör içermektedir. Adsorpsiyon, bağlanma enerjilerinin bazı maksimum bağlanma enerjilerine kadar düzenli dağılımı ile karakterize edilir. Temkin izotermi şu şekilde tanımlanmaktadır:

$$q_e = \left(\frac{RT}{b_T}\right) \ln (A\, C_e) \tag{2.10}$$

Denklemde, $RT/b_T = B$ (J/mol) adsorpsiyon ısısıyla ilgili olan Temkin sabitidir. A (L/g) maksimum bağlanma enerjisine bağlı denge bağlanma sabitidir. R (8.314 J/mol K) evrensel gaz sabiti ve T (K) mutlak çözelti sıcaklığıdır (Temkin ve Pyzhev, 1940).

Adsorpsiyonun ortalama serbest enerji değerini hesaplamak için, Dubinin–

Radushkevich (DR) izotermi uygulanmaktadır. DR eşitliği

$$\ln q_e = \ln X_m - \beta\varepsilon^2 \tag{2.11}$$

olarak tanımlanmaktadır. β, adsorpsiyon enerjisiyle ilgili sabit (mol^2/J^2); X_m, Dubinin–Radushkevich tek-tabaka kapasitesi (mg/g) ve q_e adsorplanan melatonin miktarını ifade etmektedir. Polanyi potansiyeli, ε, aşağıda verilen denklemden yararlanarak hesaplanmaktadır.

$$\varepsilon = R\,T \ln\left(1 + \frac{1}{C_e}\right) \tag{2.12}$$

ln q_e değerlerinin ε^2' ye karşı grafiğe geçirilmesiyle ede edilen denklemin eğimi β, kesim noktası da X_m değerlerini vermektedir (Dubinin ve Radushkevich, 1947). Adsorpsiyonun ortalama serbest enerjisi, E (kJ/mol), hesaplanan β değerinden yaralanılarak verilen denkleme göre hesaplanmaktadır.

$$E = \frac{1}{(2\beta)^{1/2}} \tag{2.13}$$

2.5.3 Melatonin Adsorpsiyonuna Sıcaklık Etkisi

Melatonin adsorpsiyonuna sıcaklık etkisinin incelenmesi amacıyla hazırlanan 100 mg/L melatonin çözeltilerine Trp-graft p(HEMA) membranlar eklenerek sıcaklığı 15, 25, 35, 45°C'ye ayarlanan orbital karıştırıcıda karıştırmaya bırakıldı. 1 saat sonunda adsorpsiyon ortamından örnekler alınarak melatonin miktarları belirlendi.

2.5.4 Melatonin Adsorpsiyonuna İyon Şiddetinin Etkisi

Melatonin adsorpsiyonuna iyon şiddetinin etkisinin incelenmesi amacıyla 25-3000 mg/L aralığında NaCl içeren melatonin çözeltilerine L-Trp-graft p(HEMA) membranlar eklenerek orbital karıştırıcıda karıştırmaya bırakıldı. 1 saat sonunda adsorpsiyon ortamından örnekler alınarak melatonin miktarları belirlendi.

2.6 Desorpsiyon

L-Trp-graft p(HEMA) membranlara adsorblanan melatoninin desorpsiyonu amacıyla NaCl (3000 mg/L), etilasetat:metanol karışımı (2:8) ve trietilamin:metanol karışımı (1:9) gibi farklı desorpsiyon ajanları kullanıldı. Melatonin adsorplanmış L-Trp graft pHEMA membranlar, desorpsiyon ortamında oda sıcaklığında 1h süreyle inkübe edildi. Desorpsiyon oranı, membranlara adsorplanan melatonin miktarları ve desorplanan melatonin miktarları kullanılarak aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır.

$$\text{Desorpsiyon oranı } (\%) = \frac{\text{Desorplanan melatonin miktarı}}{\text{Adsorplanan melatonin miktarı}} \text{ x } 100 \qquad (2.14)$$

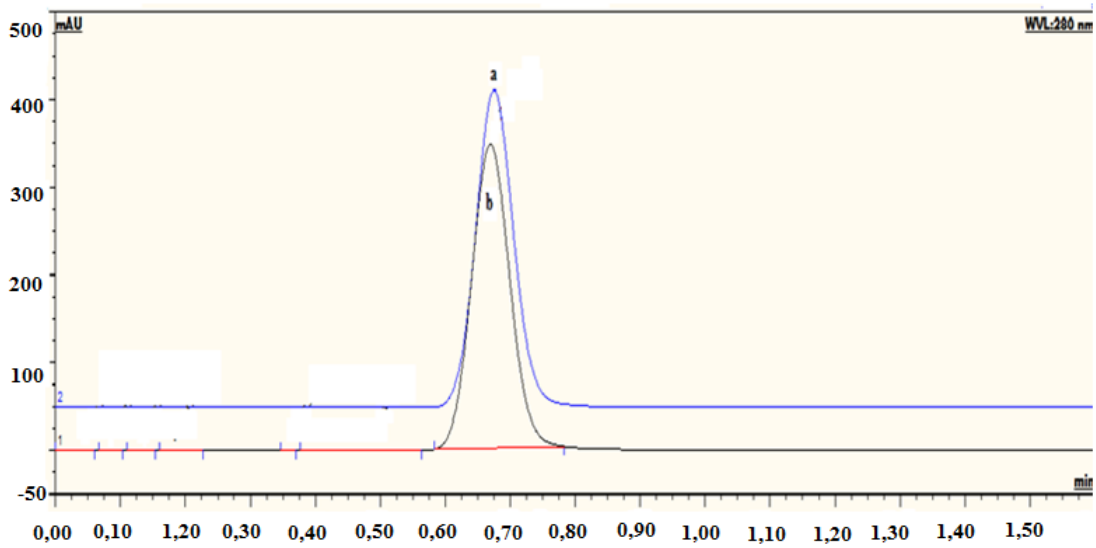
Membranlar 1 saat süreyle deiyonize su ile yıkandı ve membranların tekrar kullanılabilirliğini belirlemek üzere tekrar kullanıldı.

2.7 Melatoninin HPLC ile Analiz Koşulları

Adsorpsiyon öncesi ve sonrası ortamdaki melatonin miktarları, Xiangnian ve arkadaşlarının methodunda bazı modifikasyonlar yapılarak HPLC ile belirlendi (Xiangnian, Jun, ve Shujin, 2002). Kromatografik analizler Thermo LC sistem ile gerçekleştirildi. Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 serisi LC sistemi, DAD dedektör, pompa, otoörnekleyici, degas ünitesi ve kolon fırını içermektedir. Aşağıdaki tabloda melatoninin HPLC ile analiz koşulları verilmişitir.

Tablo 2.2 Melatoninin HPLC ile analiz koşulları

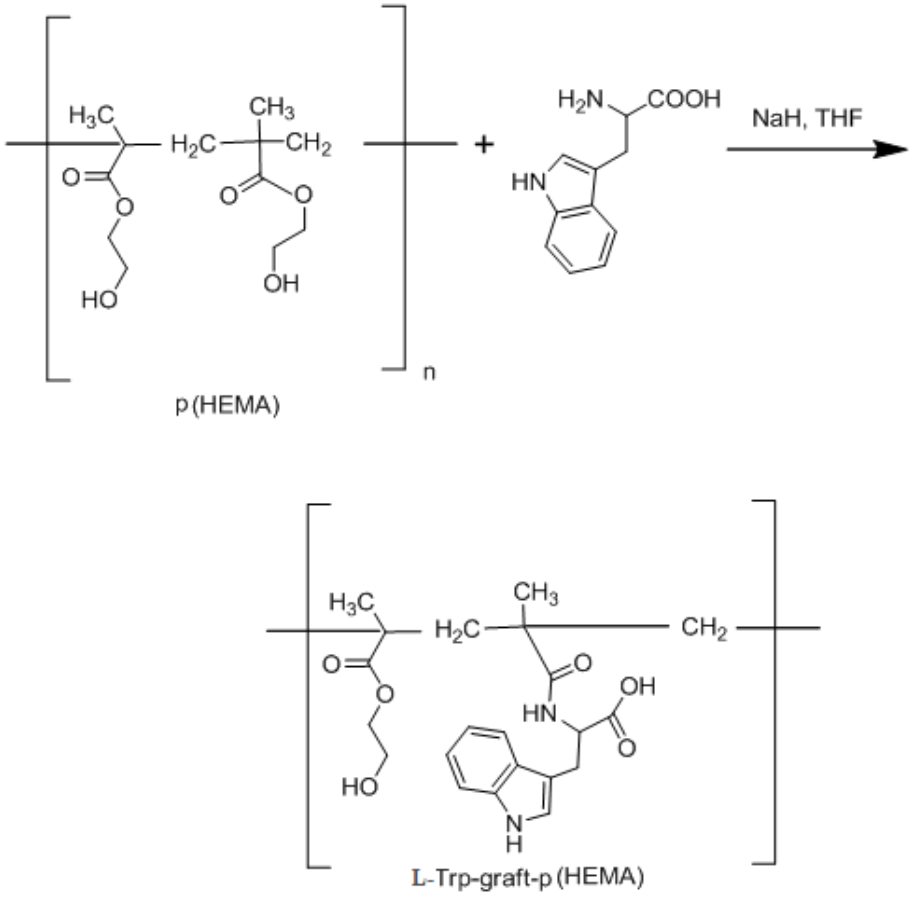
Kolon	**Sıcaklık (°C)**	**Mobil Faz**	**Akış Hızı**	**Dalgaboyu (nm)**	**Dedektör**	**t_R**
Gemini C18 (50x3mm)	30	MeOH:ACN:CH3COOH (45:45:10)	0,5 mL/dakika	280	DAD	0,7



Şekil 2.3 100 ppm melatonin standardının kromatogramı a) adsorpsiyon öncesi b) adsorpsiyon sonrası

BÖLÜM ÜÇ
VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Bu çalışmada melatonin önderiştirilmesi için membran yapıda L-Trp-graft p(HEMA) destek materyali hazırlandı. Çalışmanın ilk aşamasında UV-fotopolimerizasyon yöntemi ile sentezlenen p(HEMA) membranlara triptofan graft edilerek çalışmada kullanılacak destek materyali hazırlandı ve karakterize edildi. Hazırlanan L-Trp-graft p(HEMA) membraların yapısı Şekil 3.1'de görülmektedir. Ikinci aşamada, hazırlanan L-Trp-graft p(HEMA) membranlara melatonin adsorpsiyon koşulları optimize edildi. Son aşamada ise hazırlanan membranların tekrar kullanılabilirliğini belirlemek amacıyla uygun desorpsiyon ajanı belirlendi ve tekrar kullanılabilirlik çalışmaları gerçekleştirildi.

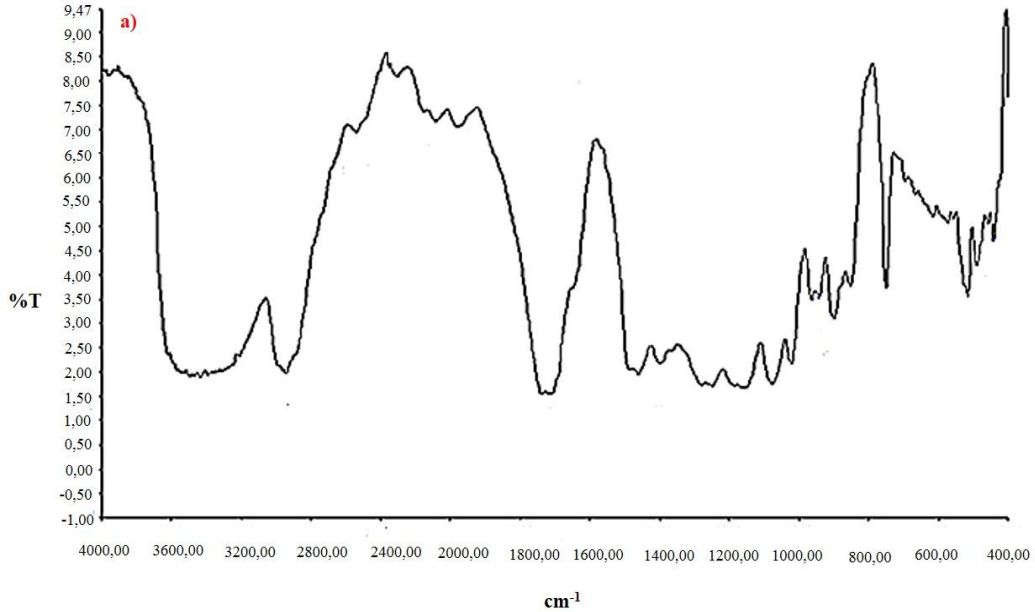


Şekil 3.1 p(HEMA) ve L-Trp-graft p(HEMA) membranların yapısı

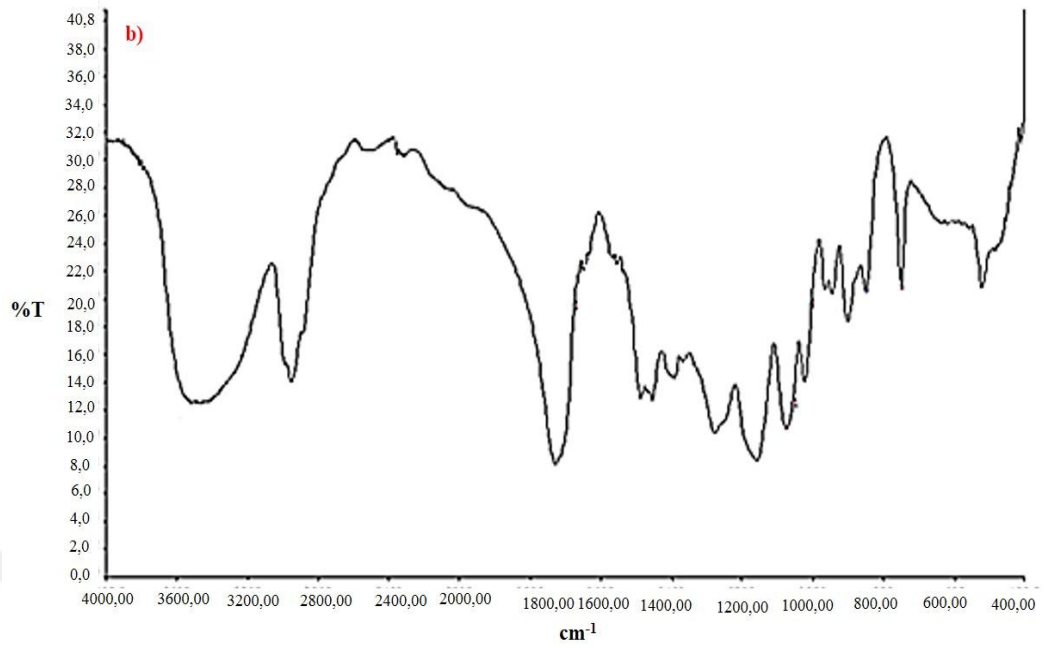
3.1 L-Trp Graft p(HEMA) Membranların Karakterizasyonu

Hazırlanan p(HEMA) ve L-Trp-graft p(HEMA) membranların FTIR spektrumları KBr ile pellet hazırlanarak alındı. p(HEMA) ve Trp graft p(HEMA) membranların FTIR spektrumları Şekil 3.2'de verildi. 3450 cm^{-1} civarında p(HEMA)'nın yapısındaki -OH grubundan kaynaklanan karakteristik gerilme titreşim bandı görülmektedir. p(HEMA) membranın FTIR spektrumunda (Şekil 3.2a) ayrıca 2982/2940 cm^{-1}de alifatik CH_2/CH_3 gerilme bandları ile 1720 cm^{-1} civarında C=O bandı görülmektedir. 1264 ve 1147 cm^{-1} deki bantlar ise C-O (ester) gerilme titreşimini karakterize etmektedir.

L-Trp-graft p(HEMA) membranın FTIR spektrumunda (Şekil 3.2b) ise bu bantlara ek olarak 3429 cm^{-1} deki bandın şiddetinde meydana gelen değişim, triptofanın indol grubundaki aminin yapıya katıldığını göstermektedir. 1641 cm^{-1} deki band da triptofanın yapısında bulunan karbonil grubundan kaynaklanmaktadır. 1100/1150 cm^{-1}deki band L-Trp-graft p(HEMA) membranlarının yapısındaki C-N gerilme titreşimini ifade etmektedir.

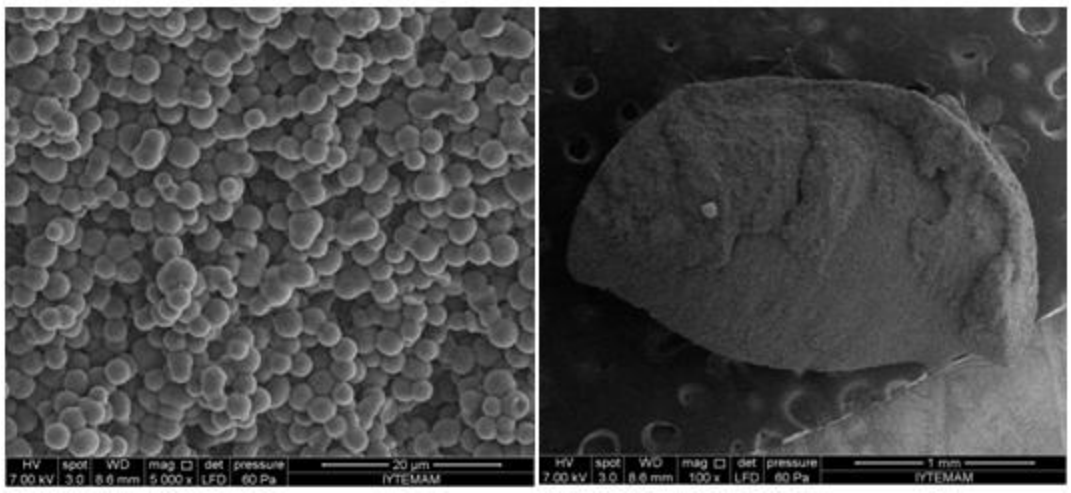


Şekil 3.2 (a) p(HEMA) ve (b) Trp graft p(HEMA) membranların FTIR spektrumları



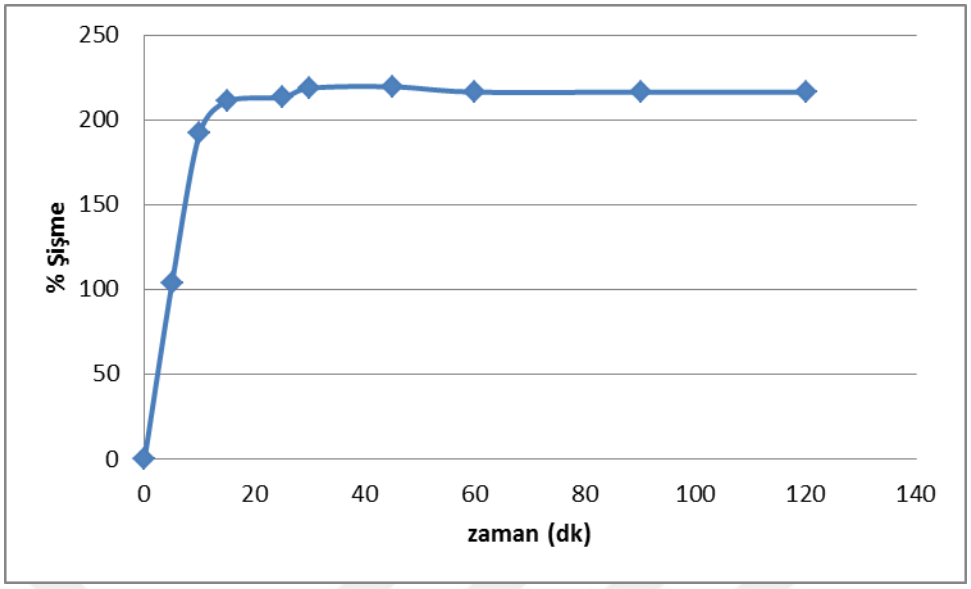
Şekil 3.2 (a) p(HEMA) ve (b) Trp graft p(HEMA) membranların FTIR spektrumları (Devamı)

Taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntülerinde L-Trp-graft p(HEMA) membranların partiküller ve gözenekli bir yapıya sahip olduğu gözlendi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 p(HEMA) membranların SEM fotoğrafları

Sentezlenen L-Trp-graft p(HEMA) membranların şişme davranışları incelendi ve zamana karşı % şişme değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 3.4).



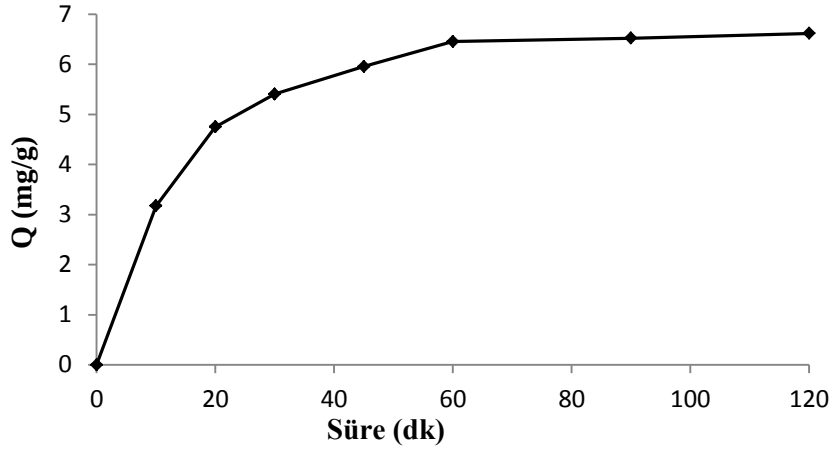
Şekil 3.4 Trp graft p(HEMA) membranların şişme izotermi

L-Trp-graft p(HEMA) membranların denge şişme oranı %229 olarak belirlendi. Yüksek şişme oranı membranlarin, sulu ortamda çözünmeyen fakat çapraz bağlanma derecesine bağlı olarak şişen çapraz bağlı hidrojeller olduğunu göstermektedir.

3.2 Trp-Graft p(HEMA) Membranlara Melatonin Adsorpsiyon Koşullarının Optimizasyonu

3.2.1 Melatonin Adsorpsiyonuna Süre Etkisi

Şekil 3.5'ten görüleceği üzere 60. dakikaya kadar adsorplanan melatonin miktarı artış gösterdi, 60. dakikadan sonra ise adsorpsiyon dengeye ulaştı. 60. dakika itibariyle matriks yüzeyindeki tüm bağlanma bölgelerinin dolması nedeniyle bu süre sonrasında adsorpsiyon kapasitesinde değişim gözlenmedi. Bu nedenle, adsorpsiyon çalışmaları için optimum süre 60 dakika olarak belirlendi.



Şekil 3.5 Sürenin melatonin adsorpsiyonuna etkisi (c: 100 mg/L; T: 25°C; kh: 225 rpm)

Melatonin adsorpsiyonuna süre etkisi verileri kullanılarak adsorpsiyon kinetikleri hesaplandı ve sonuçlar Tablo 3.1'de verildi.

Tablo 3.1.Trp-graft p(HEMA) membranlara melatonin adsorpsiyonu için kinetik verileri (25°C)

Yalancı-birinci-mertebe kinetik modeli				
$q_{e,\ deneysel}$ **(mg/g)**	$q_{e,\ hesaplaanan}$ **(mg/g)**	k_1 **(1/saat)**	R^2	
6,45	5,27	3,19	0,9952	
Yalancı-ikinci-mertebe kinetik modeli				
$q_{e,\ hesaplanan}$ **(mg/g)**	k_2 **(g/mg saat)**	$t_{½}$ **(dk)**	$h_{0,2}$ **(mg/g dk)**	R^2
7,87	0,54	14,03	33,67	0,9974
Elovich eşitliği				
1/β ln(αβ) (mg/g)	**α (mg/g saat)**	**β (g/mg)**	R^2	
6,62	65,23	0,54	0,9849	
Partikül içi difüzyon modeli				
k_{pi} **(mg/g saat^{½})**	C_i	R^2		
0,78	0,97	0,9444		

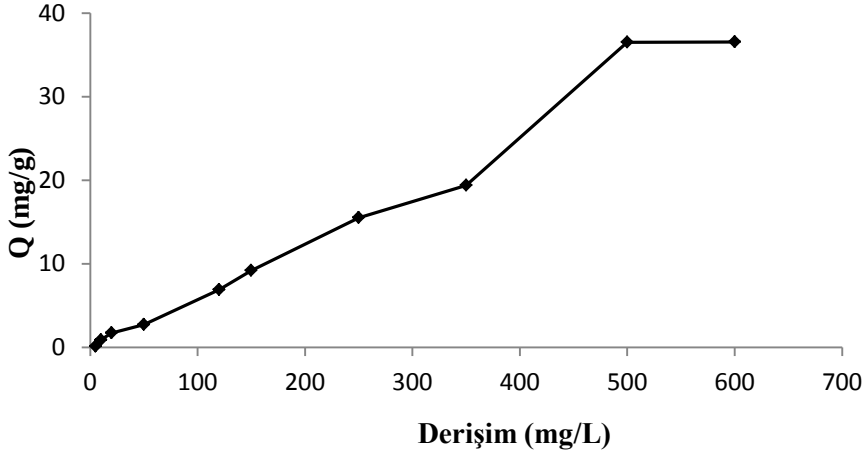
Tablo 3.1 incelendiğinde, yalancı-birinci mertebe ve yalancı-ikinci mertebe kinetiklerine ait R^2 değerlerinin birbirine yakın olduğu, dolayısıyla melatonin adsorpsiyonunun hem birinci-mertebe hem de ikinci-mertebe kinetik modele uygun yürüdüğü belirlendi. Modele göre, hız sabiti 0,54 g/mg saat olarak hesaplandı.

3.2.2 Melatonin Adsorpsiyonuna Derişim Etkisi

Melatonin adsorpsiyonu üzerine başlangıç konsantrasyonunun etkisini incelemek amacıyla 5-600 mg/L konsantrasyonlarda hazırlanan melatonin çözeltilerine L-Trp-graft p(HEMA) membranlar eklenerek 25°C'de 60 dakika süreyle adsorpsiyon işlemi

gerçekleştirildi. Bu süre sonunda adsorpsiyon ortamından örnekler alınarak melatonin miktarları belirlendi.

Başlangıçta artan melatonin derişimi ile adsorpsiyon kapasitesinin de arttığı, 500 mg/L melatonin derişiminden sonra doygunluğa ulaşıldığı gözlendi (Şekil 3.6). Trp-graft p(HEMA) membranların maksimum melatonin adsorpsiyon kapasitesi 36,58 mg/g olarak belirlendi.



Şekil 3.6 Melatonin adsorpsiyonuna derişim etkisi(T: 25°C; kh:225 rpm)

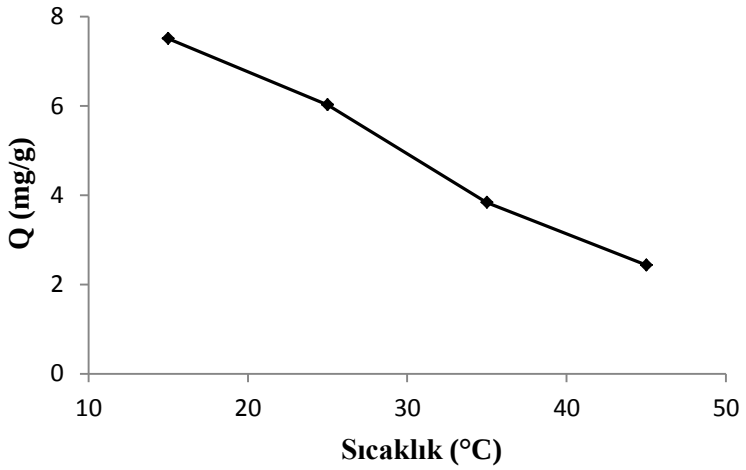
Başlangıç melatonin derişiminin adsorpsiyona etkisinin incelenmesiyle elde edilen veriler kullanılarak açıklanan izoterm parametreleri hesaplandı ve sonuçlar Tablo 3.2'de verildi. Tablo 3.2 incelendiğinde, en yüksek R^2 değerinin Freundlich izotermine ait verilerden elde edilmesi nedeniyle melatonin adsorpsiyonunun Freundlich izotermine uygun olduğu belirlendi. Bu durumda n_f değerinin 1'den büyük olması melatonin adsorpsiyonunun kooperatif olduğunu göstermektedir. Öte yandan, Dubinin–Radushkevich tek-tabaka kapasitesi değeri, maksimum adsorpsiyon kapasitesi değerine oldukça yakın hesaplanmıştır (X_m= 32,85 mg/g). İzoterme göre hesaplanan enerji değerinin 1 ile 8 kJ/mol aralığında olması adsorpsiyonun fiziksel etkileşimlere dayandığını göstermektedir (Smith, 1981).

Tablo 3.2 L-Trp-graft p(HEMA) membranlara melatonin adsorpsiyonu için adsorpsiyon izoterm modellerinin verileri (25°C)

Langmuir İzotermi				
q_e **(mg/g)**	L **(L/mg)**	q_m**(mg/g)**	R_L	R^2
36,54	0,0022	2000	0,480	0,0026
Freundlich İzotermi				
	n_f	K_f **(mg/g)**		R^2
	1,0042	3,90		0,9946
Temkin İzotermi				
A (L/g)	b_T	**B**		R^2
268,13	451,17	5,4915		0,6382
Dubinin-Redushkevich İzotermi				
B **(mol^2/J^2)**	X_m**(mg/g)**	E **(kJ/mol)**		R^2
2×10^{-8}	32,85	5,00		0,9586

3.2.3 Melatonin Adsorpsiyonuna Sıcaklık Etkisi

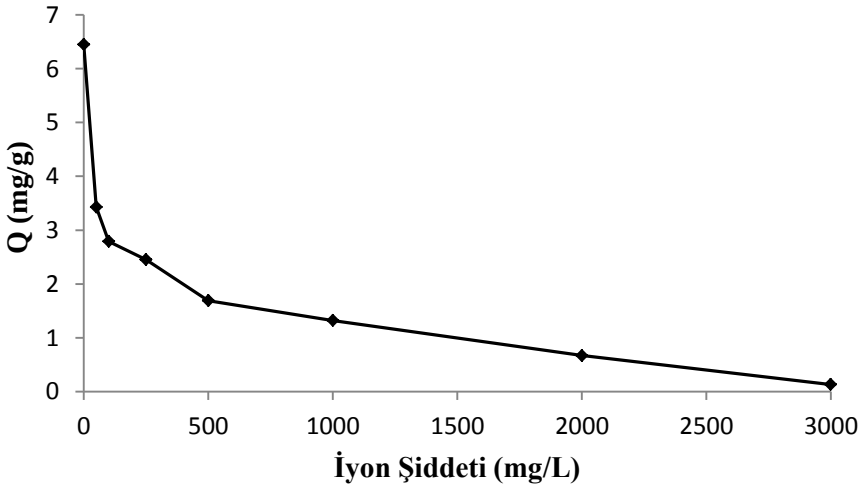
Melatonin adsorpsiyonuna sıcaklık etkisinin incelenmesi amacıyla hazırlanan 100 mg/L melatonin çözeltilerine Trp-graft p(HEMA) membranlar eklenerek sıcaklığı 15, 25, 35 ve 45°C'ye ayarlanan orbital karıştırıcıda 60 dakika süreyle adsorpsiyon gerçekleştirildi. Bu süre sonunda adsorpsiyon ortamından örnekler alınarak melatonin miktarları belirlendi. Şekil 3.7'den görüleceği üzere Trp-graft p(HEMA) membranlara melatonin adsorpsiyonu sıcaklık 15°C'den 45°C'ye çıkarıldığında % 67,64 oranında azaldı. Bilindiği gibi fiziksel etkileşimlere dayalı adsorpsiyonlarda sıcaklık arttıkça adsorpsiyon kapasitesi azalır, oysa kimyasal etkileşimlere dayalı adsorpsiyonlarda sıcaklık arttıkça adsorpsiyon kapasitesi de artar. Çalışmada elde edilen izoterm verileri de adsorpsiyonun fiziksel etkileşimlere dayalı yürüdüğünü göstermektedir. Aynı zamanda bu düşüşün nedeni, adsorpsiyonun ekzotermik doğasına bağlı olabilir.



Şekil 3.7 Melatonin adsorpsiyonuna sıcaklık etkisi (C: 100 mg/L, t: 60 dk, kh: 225 rpm)

3.2.4 Melatonin Adsorpsiyonuna İyon Şiddetinin Etkisi

Melatonin adsorpsiyonuna iyon şiddetinin etkisini incelemek amacıyla 25-3000 mg/L aralığında NaCl içeren melatonin çözeltilerine L-Trp-graft p(HEMA) membranlar eklenerek 60 dakika süreyle adsorpsiyon gerçekleştirildi Bu süre sonunda adsorpsiyon ortamından örnekler alınarak melatonin miktarları belirlendi.



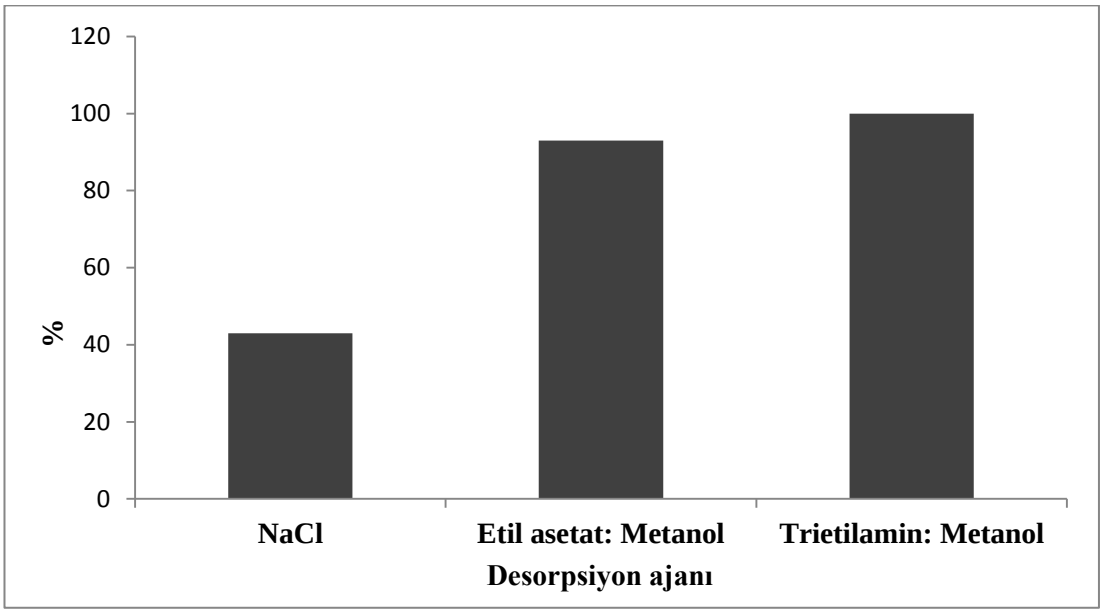
Şekil 3.8 Melatonin adssorpsiyonuna iyon şiddeti etkisi

Melatonin adsorpsiyonuna NaCl konsantrasyonunun etkisi Şekil 3.8'de verildi. Artan NaCl konsantrasyonu ile birlikte L-Trp-graft p(HEMA) membranlara adsorplanan melatonin miktarında belirgin bir azalma olduğu Şekil 3.8'de açıkca

görülmektedir. Artan tuz konsantrasyonuyla tuz iyonları arasındaki elektrostatik itmeler de artar. Bu nedenle, melatonin molekülleri arasındaki etkileşimler de artar ve agregasyon ve çökme meydana gelebilir (Vinu ve ark., 2005). Bu büyük melatonin agregatları L-Trp graft p(HEMA) membranlara adsorpsiyonu bloke edebilir ve diğer moleküllerin polimerin iç kesimlerine ulaşmasını engelleyebilir. Bu durumda da L-Trp graft p(HEMA) membranların melatonin adsorpolama kapasitesi azalır.

3.3 Desorpsiyon

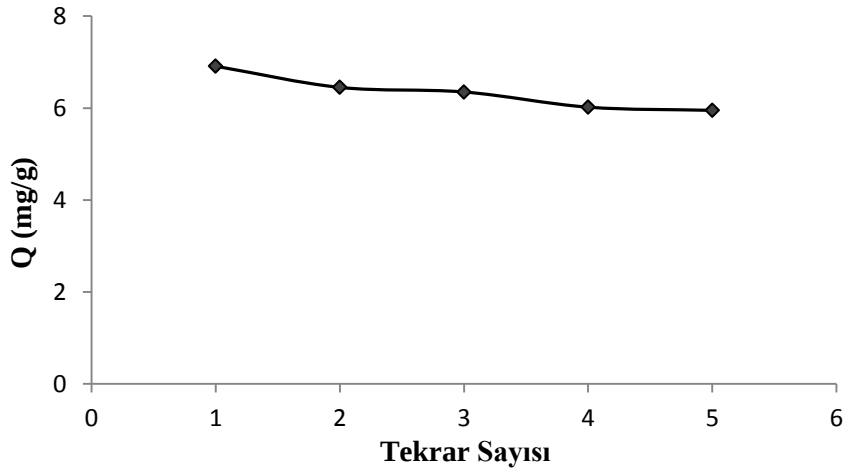
L-Trp-graft p(HEMA) membranlara adsorblanan melatoninin desorpsiyonu amacıyla NaCl (3000 mg/L), etilasetat:metanol karışımı (2:8) ve trietilamin:metanol karışımı (1:9) gibi farklı desorpsiyon ajanları kullanıldı. Bu desorpsiyon ajanlarıyla membranlardan melatoninin desorpsiyonu 25°C'de 60 dakika süreyle gerçekleştirildi.



Şekil 3.9 Trp-graft p(HEMA) membranlardan melatoninin desorpsiyonu (C: 100 mg/L, 25°C, $t_{adsorpsiyon}$: 1 saat, $t_{desorpsiyon}$: 1 saat).

Şekil 3.9'dan görüleceği gibi desorpsiyon oranları NaCl, etil asetat:metanol ve trietilamin:metanol karışımları için sırasıyla % 43, % 93 ve % 100 olarak belirlendi.

L-Trp-graft p(HEMA) membranların tekrar kullanılabilirliğini belirlemek için adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü 5 kez tekrarlandı. Her bir döngü sonrasındaki adsorpsiyon kapasiteleri Şekil 3.10'da verildi.



Şekil 3.10 Trp graft p(HEMA) membranların tekrar kullanılabilirliği

Şekil 3.10'dan görüleceği üzere L-Trp-graft p(HEMA) membranların adsorpsiyon kapasitesi 5 döngü sonunda yaklaşık % 14 oranında azaldı. Bu sonuç, L-Trp graft p(HEMA) membranların melatonin adsorpsiyonunda defalarca etkin bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir.

BÖLÜM DÖRT
SONUÇLAR

Bu çalışmada, kompleks biyolojik matrikslerdeki melatoninin önderiştirme ve kantitatif tayini için katı faz kartuşu olarak kullanılabilecek triptofan içeren HEMA bazlı polimerik membranlar UV-başlatıcılı fotopolimerizasyonla hazırlanmış, hazırlanan membranlar L-triptofan graft edilmesinin ardından karakterize edilmiş ve adsorpsiyon yoluyla melatoninin önderiştirlmesinde kullanılmak amacıyla süre, derişim, sıcaklık ve iyon şiddeti gibi sistem parametrelerinin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan L-Trp-graft p(HEMA) membranlar kullanılarak çok az miktarda sorbent ile (~13-14 mg/membran) 60 dk gibi bir sürede melatonin adsorpsiyonunun tamamlanabileceği belirlenmiştir. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde, melatonin adsorpsiyonunun Freundlich izotermine uygun olduğu, deneysel ve teorik olarak belirlenen maksimum adsorpsiyon kapasitelerinin ($Q_{deneysel}$= 36,58 mg/g: Q_{teorik}= 32,85 mg/g) son derece yakın olduğu ve adsorpsiyonun fiziksel etkileşimlere dayandığı sonucuna varılmıştır. Adsorplanan melatonin, trietillamin-metanol (1:9) karışımıyla %100 oranında desorplanmış ve L-Trp graft p(HEMA) membranların melatonin adsorsiyonunda defalarca etkin bir şekilde kullanılabileceği belirlenmiştir.

Literatürde yenilebilir bitkilerdeki melatonin tayinine yönelik ticari sorbentlerin kullanıldığı çalışmalar mevcuttur, ancak yeni bir polimerik sorbentin geliştirilip optimizasyonuna yönelik bir çalışma bulunmamaktadır. Literatürdeki çalışmalarda, melatoninin kromatografik analizi öncesinde katı faz ekstraksiyonu amacıyla çoğunlukla daha yüksek miktarlarda (200 mg) (Chen ve diğer., 2003) ve ticari olarak mevcut olan sorbentlerin (C8 Amprep) (Simonin ve diğer., 1999) kullanıldığı görülmektedir. Sonuç olarak bu çalışma ile daha az destek materyali kullanılarak, çok daha kısa sürede ve az maliyetle etkin bir şekilde melatonin tayinine olanak sağlayan bir yeni nesil afinite sistemi geliştirilmiştir. Geliştirilen L-Trp-graft p(HEMA) membranların biyoteknolojik çalışmalarda uygulama bulabileceği ve ayrıca membranların tekrar tekrar kullanılabilir olmasının geniş ölçekli biyoteknolojik uygulamalarda ekonomik avantaj sağlayabileceği söylenebilir.

KAYNAKLAR

Aguilera, Y., Lie´bana, R., Herrera, T., Rebollo-Hernanz, M., Sanchez-Puelles, C., Benı´tez, V. ve Martı´n-Cabrejas, M.A. (2014). Effect of illumination on the content of melatonin, phenolic compounds, and antioxidant activity during germination of lentils (Lens culinaris L.) and kidney beans (Phaseolus vulgaris L.*). Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 10736–10743.

Aguilar, C., Ferrer, I., Borrull, F., Marcé, R.M. ve Barceló, D. (1999). Monitoring of pesticides in river water based on samples previously stored in polymeric cartridges followed by on-line solid-phase extraction-liquid chromatography–diode array detection and confirmation by atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 386, 237-248.

Altınışık, A., Gür, E. ve Seki, Y. (2010). A natural sorbent, Luffa cylindrica for the removal of a model basic dye. *Journal of Hazardous Materials*, 179, 658–664.

Arendt, J. (1988). Melatonin. *Clinical Endocrinology*, 29, 205-229.

Arıca, M.Y., Yılmaz, M., Yalçın, E. ve Bayramoğlu, G. (2004). Affinity membrane chromatography: relationship of dye-ligand type to surface polarity and their effect on lysozyme separation and purification. *Journal of Chromatography B*, 805, 315-323.

Arıca, M.Y. ve Bayramoğlu, G. (2005). Purification of lysozyme from egg white by Reactive Blue 4 and Reactive Red 120 dye-ligands immobilised composite membranes. *Process Biochemistry*, 40, 1433-1442.

Ayano, E., Suzuki, Y., Kanezawa, M., Sakamoto, C., Morita-Murase, Y., Nagata, Y., Kanazawa, H., Kikuchi, A. ve Okano, T. (2007). Analysis of melatonin using a pH- and temperature-responsive aqueous chromatography system. *Journal of Chromatography* A, 1156, 213–219.

Bagheri, H. ve Saraji, M. (2001). New polymeric sorbent for the solid-phase extraction of chlorophenols from water samples followed by gas chromatography–electron-capture detection. *Journal of Chromatography A*, 910, 87-93.

Bagheri, H. ve Mohammadi, A. (2003). Pyrrole-based conductive polymer as the solid-phase extraction medium for the preconcentration of environmental pollutants in water samples followed by gas chromatography with flame ionization and mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*, 1015, 23-30.

Bagheri, H. ve Saraji, M. (2003). Conductive polymers as new media for solid-phase extraction: Isolation of chlorophenols from water sample. *Journal of Chromatography A*, 986, 111-119.

Bailon P., Ehrlich G.K., Fung W.J. ve Berthold W. (2000). *Affinity Chromatography: Methods and Protocols.* New Jersey: Humana Press.

Bayramoğlu, G., Yılmaz, M. ve Arıca, M.Y. (2004). Evaluation of lysozyme adsorptive behaviour of pHEMA-based affinity membranes related to the surface energy and its components to be used in chromatographic fields. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects,* 243, 11-21.

Bayramoglu, G., Şenel, A.Ü., Yalçın, E., ve Arica, M.Y. (2006). Human serum albumin adsorption on poly[(glycidyl methacrylate)-co-(methyl methacrylate)] beads modified with a spacer-arm-attached L-histidine ligand. *Polymer International,* 55, 40-48.

Benito-Peña, E., Partal-Rodera, A.I., León-González, M.E. ve Moreno-Bondi, M.C. (2006). Evaluation of mixed mode solid phase extraction cartridges for the preconcentration of beta-lactam antibiotics in wastewater using liquid

chromatography with UV-DAD detection. *Analytica Chimica Acta*, 556, 415-422.

Brzezinski, A., Vangel, M.G., Wurtman, R.J., Norrie, G., Zhdanova, I., Ben-Shushan, A. ve Ford, I. (2005). Effects of exogenous melatonin on sleep: a meta-analysis. *Sleep Medicine Reviews*. 9, 41–50.

Cao, J., Murch, S.J., O'Brien, R. ve Saxena, P.K. (2006). Rapid method for accurate analysis of melatonin, seratonin and auxin in plants samples using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1134, 333–337.

Chegini, S., Ehrhart-Hofmann, B., Kaider, A. ve Waldhauser, F. (1995). Direct enzyme-linked immunosorbent assay and radioimmunoassay for melatonin compared. *Clinical Chemistry*, 41, 381-386.

Chen, G., Huo, Y., Tan, D.X., Liang, Z., Zhang, W. ve Zhang, Y. (2003). Melatonin in Chinise medicinal herbs. *Life Sciences*, 73, 19-26.

Denizli, A. ve Pişkin, E. (2001). Dye-ligand affinity systems. *Journal of Biochemistry and Biophysical Methods*, 49, 391-416.

Denizli, A. ve Küfrevioğlu, İ. (2010). *Protein kromatografisi ve yeni nesil polimerik sistemler*. Ankara: Pozitif Matbaacılık.

Dolberg, O.T., Hirschmann, S. ve Grunhaus, L. (1998). Melatonin for the treatment of sleep disturbances majör depressive disorder. *The American Journal of Psychiatry*, 155,1119.

Dubinin, M.M., Radushkevich, L.V. (1947). Equation of the characteristic curve of activated charcoal. *Proceedings of the USSR Academy of Sciences*, *55*, 331–333.

Dubbels, R., Reiter, R.J., Klenke, E., Goebel, A., Schnakenberg, E., Ehlers, C., Schiwara, H.W. ve Schloot, W. (1995). Melatonin in edible plants identified by radioimmunoassay and by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pineal Research*, 18, 28.

Hattori, A., Migitak, H., Iigo, M., Itho, M., Yamamoto, K., Ohtanikaneko, R., Hara, R., Suzuki, T. ve Reiter, R.J. (1995). Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin levels and binding to melatonin receptors in vertebrates. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 35, 627.

Hennion, M.C. (1999). Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 856, 3.

Ho, Y.S. ve McKay, G. (1998). The kinetics of sorption of basic dyes from aqueous solutions by sphagnum moss peat. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 76, 822–826.

Jan, J.E., Freeman, R.D. ve Fast, D.K. (1999). Melatonin treatment of sleep-wake cycle disorders in children and adolescents. *Developmental Medicine&Child Neurology*, 41, 491.

Jonson, S. ve Borén, H. (2002). Analysis of mono- and diesters of *o*-phthalic acid by solid-phase extractions with polystyrene–divinylbenzene-based polymers. *Journal of Chromatography A*, 963, 393-400.

Jung, B. ve Ahmad, N. (2006). Melatonin in cancer management: progress and promise. *Cancer Research*, 66, 9789–93.

Karbownik, M. ve Reiter, R J. (2000). Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation. *Experimental Biology and Medicine*, 225, 9.

Keçili, E., Say, R., Ersöz, A. Yavuz, H. ve Denizli, A. (2007). Purification of penicillin acylase through a monolith column containing methacryloyl antipyrine. *Separation and Purification Technology*, 55, 1–7.

Klein, E. (1991). *Affinity membranes: their chemistry and performance in adsorptive separation processes*. Newyork: John Wiley and Sons Interscience.

Langergren, S. ve Svenska, B.K. (1898). Zur theorie der sogenannten adsorption geloester stoffe. *Veternskapsakad Handlingar*, *24 (4),* 1–39.

Lissoni, P., Barni, S., Mandala, M., Ardizzoia, A., Paolorossi, F., Vaghi, M., Longarini, R., Malugani, F. ve Tancini, G. (1999). Decreased toxicity and increased efficacy of cancer chemotheraphy using the pineal hormone melatonin in metastatic solid tumour patients with poor clinical status. *Europan Journal of Cancer*, 35,1688.

Maestroni, G.J.M. (1993). The immunoneuroendocrine role of melatonin. *Journal of Pineal Research,* 14, 1-10.

Magdeldin, S ve Moser, A. (2012). *Affinity chromatography: principles and applications*. Affinity Chromatography, Dr. Sameh Magdeldin (Ed.).

Malpaux, B., Migaud, M., Tricoire, H. ve Chemineau, P. (2001). Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin. *Journal of Biological Rhythms*, 16, 336–347.

Mefford, I.N. ve Barchas, J.D. (1980). Determination of tryptophan and metabolites in rat brain and pineal tissue by reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chrornatography*, 181, 187-193.

Melamud, L., Golan, D., Luboshitzky, R., Lavi, I. ve Miller, A. (2012). Melatonin dysregulation, sleep disturbances and fatigue in multiple sclerosis. *Journal of Neurological Sciences*, 314, 37–40.

Mohr, P. ve Pommerening, K. (1986). *Affinity chromatography, practical and theoretical aspects*. New York and Basel: Marcel Dekker, Inc.

Murch, S.J., Simmons, C.B. ve Saxena, P.K. (1997). Melatonin in feverfew and other medicinal plants. *The Lancet*, 350, 1598.

Nomachi, M., Kubo, T., Hosoya, K. ve Kaya, K. (2006). Solvent effects in the preparation of molecularly imprinted polymers for melatonin using ***N***-propionyl-5-methoxytryptamine as the pseudo template. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 384, 1291–1296.

Nunez-Vergara L.J., Squella J.A., Sturm, J.C., Baez, H. ve Camargo, C. (2001). Simultaneous determination of melatonin and pyridoxine in tablets by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis*, 26, 929–938.

Oladi, E., Mohamadi, M., Shamspur, T. ve Mostafavi, A. (2014). Spectrofluorimetric determination of melatonin in kernels of four different Pistacia varieties after ultrasound-assisted solid–liquid extraction. Spectrochim. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 132, 326–329.

Penitson-Bird, J.F., Di, W., Street, C.A., Kadva, A., Stalteri, M.A. ve Silman, R.E. (1993). HPLC assay of melatonin in plasma with fluorescence detection. *Clinical Chemistry*, 39, 2242-2247.

Plebani, M., Masiero, M., Burlina, A.P., Chiozza, M.L., Scanarini, M. ve Burlina, A. (1990). Measurement of melatonin in blood by radioimmunoassay. Analitical considerations and clinical usefulness. *Child's Nervous System*, 6, 220-221.

Posmyk, M. ve Mjanas, K.M. (2009). Melatonin in plants. *Acta Physiolgiae Plantarum*, 31, 1-11.

Reiter, R.J. (1991). Melatonin: The chemical expression of darkness. *Molecular and Cellular Endocrinology*,79:C153.

Reiter, R.J. (1993). The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia*, 49, 654–664.

Reiter, R.J., Pablos, M., Agapito, T.T. ve Guerrero, J.M. (1996). Melatonin in the context of the free radical theory of aginga. *Annals of New York Academi Sciences*, 786, 362.

Reiter, R.J. (1998). Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Progress in Neurobiology*, 56, 359.

Reiter, R.J., Tan, D.-X., Zhou, Z., Coelho Cruz, M.H., Fuentes-Broto, L. ve Galano, A. (2015). Phytomelatonin: assisting plants to survive and thrive. *Molecules* 20, 7396–7437.

Rodriguez-Naranjo, M.I., Gil-Izquierdo, A., Troncoso, A.M., Cantos-Villar, E. ve Garcı´a-Parrilla, M.C. (2011). Melatonin is synthesised by yeast during alcoholic fermentation in wines. *Food Chemistry*, 126, 1608–1613.

Roper, D.K. ve Lightfoot, E.N. (1995). Seperation of biomolecules using adsorptive membranes. *Journal of Chromatography A*, 702, 3.

Sagara, Y., Okatani, Y. ve Yamanaka, S. (1998). Determination of plasma 5-hydroxytryotophan, 5-hydroxytryptamine, 5-hydroxyindolacetic acid, tryptophan and melatonin by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography*, 431, 170.

Sanders, D.C., Chaturvedi, A.K. ve Hordinsky, J.R. (1999). Melatonin: aeromedical, toxicopharmacological, and analytical aspects. *Journal of Analytical Toxicology*, 23, 159.

Sieghart, W., Ronca, E., Drexler, G. ve Karall, S. (1987). Improved radioimmunoassay of melatonin in serum. *Clinical Chemistry*, 33, 604-605.

Simonin, G., Bru, L., Leliévre, E., Jeanniot, J.P., Bromet, N., Walther, B. ve Boursier-Neyret, C. (1999). Determination of melatonin in biological fluids in the presence of the melatonin agonist S 20098: comparison of immunological techniques and GC-MS methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 21, 591–601.

Smith, J.M. (1981). *Chemical Engineering Kinetics* (3th ed.), New York: McGraw-Hill.

Stürtz, M., Cerezo, A.B., Cantos, E. ve Garcı´a-Parrilla, M.C. (2011). Determination of the melatonin content of different varieties of tomatoes (Lycopersicon esculentum) and strawberries (Fragaria ananassa). *Food Chemistry*, 127, 1329–1334.

Temkin, M.T. ve Pyzhev, V. (1940). Kinetics of ammonia synthesis on promoted iron catalyst. *Acta Physiochimica URSS, 12*, 327–356.

Touitou, Y. (2001). Human aging and melatonin. *Experimental Gerontology*, 36, 1083

Tseng, R.L. (2006). Mesopore control of high surface area NaOH-activated carbon. *Journal of Colloid Interface Science*, 303, 494–502

Uygun, M., Senay, R.H., Avcıbası, N. ve Akgol, S. (2014). Poly(HEMA-co-NBMI) monolithic cryogel columns for IgG adsorption. *Applied Biochemistry and Biotechnology*,172,1574-1584.

Vinu, A., Hossain, K. Z., Kumar, G. S., Sivamurugan, V. ve Ariga, K. (2005). Adsorption of amino acid on mesoporous molecular sieves. *Studies in Surface Science and Catalysis*, *156*, 631-636.

Vitale, A.A., Ferrari, C.C., Aldana, H. ve Affanni, J.M. (1996). Highly sensitive method for the determination of melatonin by normal-phase high-performance liquid chromatography with fluorometric detection. *Journal of Chrornatography B: Biornedical Sciences and Applications*, 681, 381-384.

Vieira, R., Miguez, J., Lema, M. ve Aldegunde, M. (1992). Pineal and plasma melatonin as determined by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Analytical Biochernistry*, 205, 300-305.

Yie, S.M., Johansson, E. ve Brown, G.M. (1993). Competitive solid-phase enzym immunoassay for melatonin in human and rat serum and rat pineal gland. *Clinical Chemistry*, 39, 2322.

Ke, Y.M., Chen, C.I., Kao, P.M., Chen, H.G., Huang, H.C., Yao, C.J. ve Liu, Y.C. (2010). Preparation of the immobilized metal affinity membrane with high amount of metal ions and protein adsorption efficiencies. *Process Biochemistry*, 45, 500–506.

Zeng, X. ve Ruckustein, E. (1999). Membrane chromatography: Preparation and applications to protein separation. *Biotechnology progress*, 15, 1003-1019.

Watanabe, H., Kobayashi, T., Meibou, T., Sekiguchi, Y., Uchida, K., Aoki, T. ve Cyong, J.C.(2002). Effects of kampo herbal medicine on plasma melatonin concentration in patients. *The American Journal of Chinese Medicine*, 30, 65.

Weber, W.J. ve Morris, J.C. (1962). Advances in water pollution research: Removal of biologically-resistant pollutants from waste waters by adsorption. In *Proceedings of Second International Conference on Water Pollution Symposium*

(1st ed.) (231-266) Oxford: Pergamon Press.

Weber, T.W. ve Chakkravorti, R.K. (1974). Pore and solid diffusion models for fixed-bed adsorbers. *American lnstitute of Chemical Engineers, 20*, 228–238.

Xiangnian, Z., Jun, X. ve Shujin. (2002). Analysis method of Melatonin and its tablets by HPLC. *Guangdong Pharmaceutical Journal*, 12(6), 31-2.