

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MELATONİN TAYİNİNE YÖNELİK
MOLEKÜLER BASKILANMIŞ POLİMERİN
HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU

Elif ESEN

Aralık, 2017

İZMİR

**MELATONİN TAYİNİNE YÖNELİK
MOLEKÜLER BASKILANMIŞ POLİMERİN
HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Yüksek Lisans Tezi

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Elif ESEN

Aralık, 2017

İZMİR

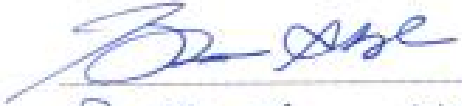
YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

ELİF ESEN tarafından PROF. DR. M. NALAN TÜZMEN yönetiminde hazırlanan
“MELATONİN TAYİNİNE YÖNELİK MOLEKÜLER BASKILANMIŞ
POLİMERİN 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. Sinan AKGÖL

Jüri Üyesi



Prof. Dr. Hülya ASERKAYACI

Jüri Üyesi



Prof. Dr. Kadriye ERTEKİN

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEŞEKKÜR

Kıymetli görüşlerinden yararlandığım, tezimin her aşamasında ve hayatımın her alanında desteğini gördüğüm tez danışmanım Prof. Dr. Nalan TÜZMEN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisans eğitimim boyunca anlayış gösterip yanımda olan hocam Doç. Dr. Dilek ODACI DEMİRKOL'a, deneysel çalışmalarında bana yardımcı olan Doç. Dr. Bilgen OSMAN ve öğrencilerine, benden yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Tülden İNANAN KALBURCU' ya, Uzman Hilmiye Deniz ERTUĞRUL UYGUN'a ve Simge ÖZTÜRK'e, her zaman bana destek olan hocalarıma ve manevi desteğini aldığım arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Her zaman ilgiyle, sabırla ve en önemlisi sonsuz sevgileriyle beni destekleyen annem Nurcan ESEN'e ve babam Mehmet Oğuz ESEN'e yanımda oldukları her an için teşekkür ederim.

Tez çalışmama desteği için 2016.KB.FEN.024 nolu proje ile DEÜ-BAP 'a teşekkür ederim.

Elif ESEN

MELATONİN TAYİNİNE YÖNELİK MOLEKÜLER BASKILANMIŞ POLİMERİN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU

ÖZ

Melatonin, immün sistem, kanser, depresif sendromlar gibi hastalıklara karşı etkili bir hormondur. Aynı zamanda nöroendokrin sisteminin ve uyku düzeninin düzenlenmesini sağlar. Melatonin ve analoglarının, nemlendirici, kırıksıklık önleyici, aktinik hasarı önleyici olarak kozmetiklerde de yaygın kullanımı mevcuttur. Özellikle tıp ve kozmetik endüstrisindeki kullanımları sebebiyle, melatoninin doğal kaynaklardan yüksek saflık ve seçicilikte, hızlı, düşük maliyetli bir yöntemle ekstraksiyonu, aynı zamanda tayini oldukça önemli hale gelmektedir. Melatonin için, radyoimmünojenik yöntem (RIA), enzim-aracılı immünosorbent yöntemi (ELISA), elektrokimyasal ve floresans dedektörlü yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) ve gaz kromatografi-kütle spektrometri (GC-MS) gibi birçok kantitatif tayin yöntemi kullanılmaktadır. Bitkilerdeki melatoninin ekstraksiyonunda sıvı-sıvı ekstraksiyonu yaygın kullanılmaktadır; fakat sıvı-sıvı ekstraksiyonundaki verimin düşük olması nedeniyle katı faz ekstraksiyonu, yüksek örnek hacmi, kolay analit geri alımı, yüksek geri kazanım, hızlı örnek yükleme, az organik çözücü gereksinimi gibi özelliklere sahip olduğu için diğer ekstraksiyon yöntemlerinden daha avantajlıdır. Katı faz sorbenti olarak kullanılacak sorbentler, nicel tutunma, desorpsiyon, yüksek kapasite, yenilenebilirlik ve kolay elde edilebilirlik gibi özelliklere sahip olmalıdır. Moleküler baskılanmış polimerler bu özellikleri sebebiyle son yıllarda biyomedikal ve biyoteknoloji alanındaki uygulamalarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu amaçla bu tez kapsamında, öncelikle etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) ve N-metakriloil-L-triptofan metil ester (MATrp) monomerleri kullanılarak melatonin tayini ve ekstraksiyonuna yönelik yeni bir afinite sorbenti [poli (etilen glikol dimetakrilat-N-metakriloil-L-triptofan metil ester) (p(EGDMA-MATrp) mikroküreleri] geliştirildi. Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR), Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM), Diferansiyel Termal Analiz-Termo-Gravimetrik Analizi

(DTA-TGA) ve şişme deneyleri ile karakterize edilen p(EGDMA-MATrp) mikroküreler kullanılarak adsorpsiyon parametreleri (sıcaklık, süre, pH, başlangıç derişimi vb.) optimize edildi. Geliştirilen sorbente adsorplanan melatoninin desorpsiyonu için uygun desorpsiyon ajani belirlenerek tekrar kullanılabilirliğı tayin edildi. Geliştirilen sorbentin ıhlamurdaki melatoninin yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile tayini öncesinde ekstraksiyonu için uygulanabilirliğı belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Melatonin, moleküler baskılanmış polimer, katı faz ekstraksiyonu



PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF MOLECULAR IMPRINTED POLYMERS FOR DETERMINATION OF MELATONIN

ABSTRACT

Melatonin is an effective hormone against diseases such as the immune system, cancer, and depressive syndromes. It also helps regulate the neuroendocrine system and the sleeping pattern. Melatonin and its analogues are also widely used in cosmetics as moisturizing, anti-wrinkle, actinic damage inhibitor. At the same time, the extraction of melatonin from natural sources with high purity and selectivity by a fast, low-cost method becomes very important, especially due to its use in the medical and cosmetic industries. Several quantitative assay methods such as radioimmunological method (RIA), enzyme-mediated immunosorbent assay (ELISA), high performance liquid chromatography (HPLC) with electrochemical and fluorescence detector and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) are used for melatonin. Liquid-liquid extraction is extensively used in extractions of melatonin in plants. However, because of the low yield in liquid-liquid extraction, solid phase extraction is more advantageous than other extraction methods because it has properties such as high sample volume, easy analyte retrieval, high recovery, fast sample loading, low organic solvent requirement. The sorbent to be used as the solid phase sorbent should have properties such as quantitative adhesion, desorption, high capacity, renewability and easy availability. Due to these properties, molecularly imprinted polymers have been used in biomedical and biotechnology applications in recent years.

For this purpose, a novel affinity sorbent [poly (ethylene glycol dimethacrylate-N-methacryloyl-L-tryptophan methyl ester) (p (EGDMA-MATRP) microspheres] for the determination and extraction of melatonin was first developed using ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) and N-methacryloyl-L-tryptophan methyl ester (MATrp) monomers. The adsorption parameters (temperature, time, pH etc.) were determined using p (EGDMA-MATrp) microspheres characterized by Recursive Infrared Spectroscopy (FTIR), Scanning Electron Microscopy (SEM),

Differential Thermal Analysis- Thermo-Gravimetric Analysis (DTA-TGA) were optimized. Re-usability was determined by determining the appropriate desorption agent for desorption of adsorbed melatonin in the developed sorbent. Applicability of the developed sorbentine lime melatonin for extraction before extraction by high performance liquid chromatography (HPLC) was determined.

Keywords: Melatonin, molecularly imprinted polymer, solid phase extraction



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZ	iv
ABSTRACT	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
TABLolar LİSTESİ	xiii

BÖLÜM BİR – GİRİŞ.....1

1.1 Melatonin	1
1.1.1 Melatonin Tayini Amaçlı Kullanılan Analitik Yöntemler	7
1.2 Afinite Kromatografisi	9
1.2.1 Moleküler Baskılama Kromatografisi	12
1.2.1.1 Moleküler Baskılama Yöntemleri.....	15
1.2.2 Moleküler Baskılamada Kullanılan Bileşenler.....	16
1.2.2.1 Fonksiyonel Monomerler.....	16
1.2.2.2 Kalıp (Hedef) Molekül.....	17
1.2.2.3 Çapraz Bağlayıcılar.....	18
1.2.2.4 Çözücüler	19
1.2.2.5 Başlatıcılar	20

BÖLÜM İKİ - MATERYAL METOD.....21

2.1 Reaktifler.....	22
2.2 Kullanılan Cihazlar	22
2.3 MLT Baskılanmış p(EGDMA-MATrp) Mikrokürelerin Hazırlanması.....	22

2.3.1 MLT Baskılanmış p(EGDMA-MATrp) Mikrokürelerin Karakterizasyonu...	25
2.4 MLT Baskılanmış p(EGDMA-MATrp) Mikrokürelere Melatonin Adsorpsiyonu ve Desorpsiyon Koşullarının İncelenmesi.....	27
2.4.1 MLT Adsorpsiyonunun Optimizasyonu.....	27
2.4.1.1. MLT Adsorpsiyonuna Sürenin Etkisi.....	27
2.4.1.2 MLT Adsorpsiyonuna Sorbent Miktarının Etkisi.....	28
2.4.1.3 MLT Adsorpsiyonuna Başlangıç Derişiminin Etkisi.....	28
2.4.1.4 MLT Adsorpsiyonuna Sıcaklık Etkisi	28
2.4.1.5 MLT Adsorpsiyonuna pH'ın Etkisi	29
2.4.1.5 MLT Adsorpsiyonuna İyon Şiddetinin Etkisi.....	29
2.4.2 Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik.....	29
2.5 İhlamur Örneklerindeki Melatoninin MLT Baskılanmış p(EGDMA-MATrp) Mikrokürelere Adsorpsiyonu	30
2.6 Melatoninin HPLC ile Analiz Koşulları	30

BÖLÜM ÜÇ - BULGULAR VE TARTIŞMA.....30

3.1 MLT Baskılanmış p(EGDMA-MATrp) Mikrokürelerin Karakterizasyonu	32
3.1.1 MLT Baskılanmış p(EGDMA-MATrp) Mikrokürelerin SEM Analizleri. .	32
3.1.2 MLT Baskılanmış p(EGDMA-MATrp) Mikrokürelerin FTIR Analizi.....	33
3.1.3 MLT Baskılanmış p(EGDMA-MATrp) mikrokürelerin DTA-TGA Analizi.....	34
3.1.5 MLT Baskılanmış .p(EGDMA-MATrp) Mikrokürelerin Şişme Testi..	35
3.2 MLT baskılanmış p(EGDMA-MATrp) Mikrokürelerin Adsorpsiyon ve Desorpsiyon Koşullarının İncelenmesi	36

3.2.1 MLT Adsorpsiyonunun Optimizasyonu.....	36
3.2.1.1 MLT Adsorpsiyonuna Sürenin Etkisi	36
3.2.1.2 MLT Adsorpsiyonuna Sorbent Miktarının Etkisi.....	37
3.2.1.3 MLT Adsorpsiyonuna Başlangıç Derişiminin Etkisi.....	38
3.2.1.4 MLT Adsorpsiyonuna Sıcaklık Etkisi	39
3.2.1.5 MLT Adsorpsiyonuna pH'ın Etkisi	41
3.2.1.6 MLT Adsorpsiyonuna İyon Şiddetinin Etkisi.....	42
3.2.2 Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik.....	43
3.3 İhlamur Örneklerindeki Melatoninin MLT baskılanmış p(EGDMA-MATrp) Mikrokürelere Adsorpsiyonu	44
BÖLÜM DÖRT - SONUÇ.....	45
KAYNAKLAR.....	46

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1 Melatoninin triptofandan sentezlenme şeması.....	2
Şekil 1.2 Afinite Kromatografisi.....	10
Şekil 1.3 Afinite saflaştırma basamaklarının şematik gösterimi.....	11
Şekil 1.4 Afinite kromatografik yöntemler.....	12
Şekil 1.5 MIP oluşumunun genel prensibi.....	14
Şekil 1.6 Moleküler baskılamada kullanılan monomerler.....	16
Şekil 1.7 Moleküler baskılamada kullanılan çapraz bağlayıcılar	18
Şekil 1.8 Kimyasal başlatıcılar.....	19
Şekil 2.1 p(EDGMA MATrp) sentezine ait olası reaksiyon şeması.....	24
Şekil 2.2 MLT baskılanmış p(EGDMA-MATrp) sentez şeması.....	25
Şekil 2.3 Kurutulmuş ıhlamur örneği.....	30
Şekil 2.4 10 ppm MLT standardının kromatogramı	31
Şekil 3.1 MLT baskılanmış p(EGDMA-MATrp) polimerin SEM analizi.....	32
Şekil 3.2 MLT ve MLT baskılanmış p(EGDMA-MATrp) polimerin FTIR spektrumu.....	33
Şekil 3.3 MLT baskılanmış p(EGDMA-MATrp) polimerin DTA-TGA analizi.....	34
Şekil 3.4 p(EGDMA-MATrp) mikrokürelerin zamana bağlı % şişme oranları.....	35
Şekil 3.5 MLT adsorpsiyonuna sürenin etkisi	37
Şekil 3.6 MLT adsorpsiyonuna sorbent miktarının etkisi	38
Şekil 3.7 MLT adsorpsiyonuna derişimin etkisi	39
Şekil 3.8 MLT adsorpsiyonuna sıcaklık etkisi	40
Şekil 3.9 MLT adsorpsiyonuna pH etkisi	41
Şekil 3.10 MLT adsorpsiyonuna iyon şiddetinin etkisi	42
Şekil 3.11 MLT baskılanmış p(EGDMA-MATrp) mikrokürelere adsorplanan MLT'nin desorpsiyonu.....	43

Şekil 3.12	MLT baskılanmış p(EGDMA-MATrp) mikrokürelerin tekrar kullanılabilirliği.....	44
Şekil 3.13	a) İhlamur ekstraktı ve b) MLT baskılanmış p(EGDMA-MATrp) mikrokürelere ihlamur örneğinin adsorpsiyonuna ait kromatogramlar.	44



TABLÖLAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 1.1 Melatonin kaynakları ve miktarı (ng/g).....	5
Tablo 1.2 Katı faz ekstraksiyonunda kullanılan ticari sorbentler.....	8
Tablo 1.3 Kromatografik teknikler ve temelleri.....	9
Tablo 2.6 Melatonin HPLC ile tayininde kullanılan kromatografik koşullar.....	31



BÖLÜM BİR

GİRİŞ

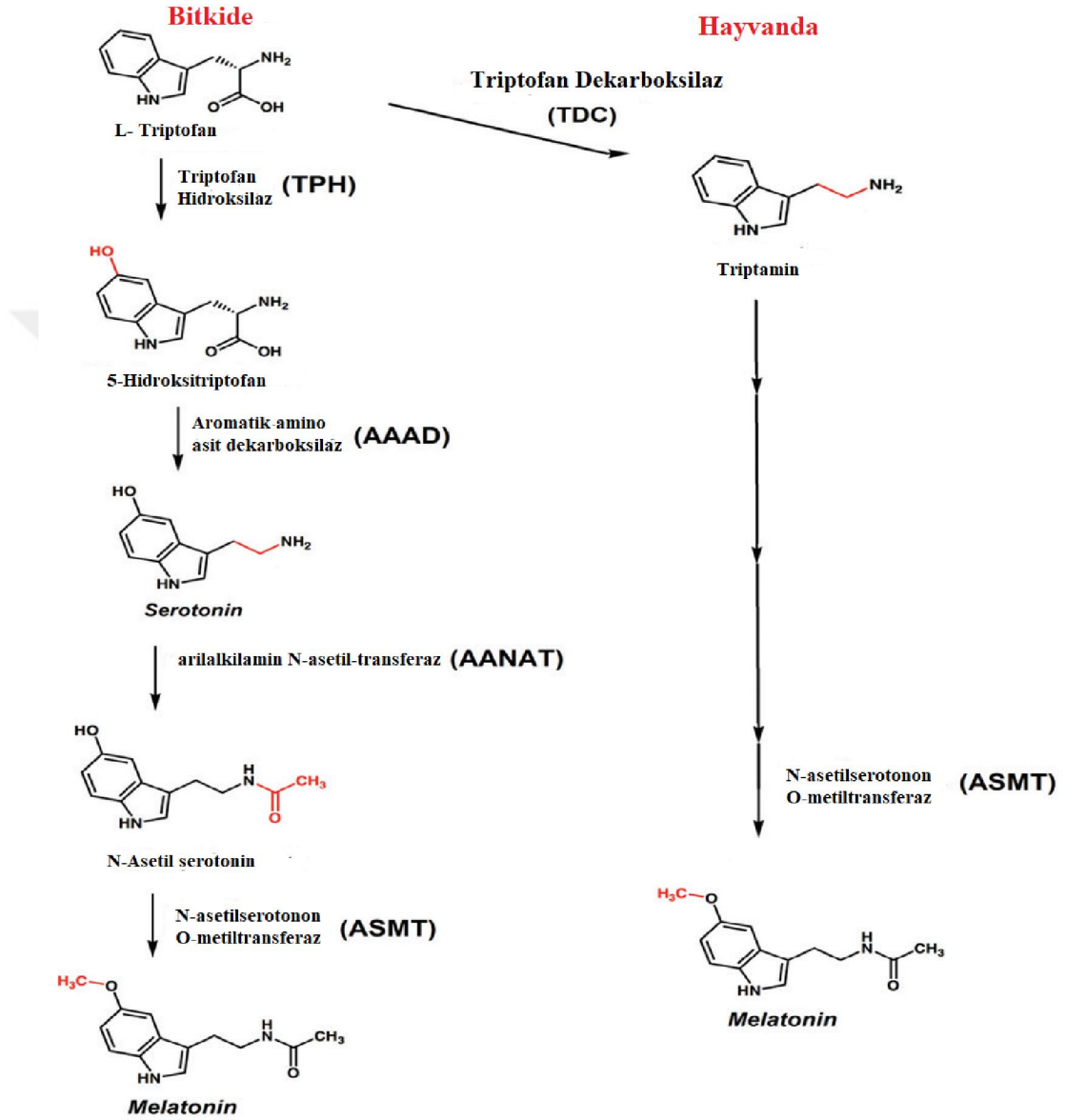
Melatonin (5-metoksi-N-asetiltriptamin), nöroendokrin sisteminin ve günlük uyku düzeninin regulasyonunu sağlayan önemli bir hormondur. Ayrıca, metabolizma, üreme, denge, kas koordinasyonu ile bakteri, virüs, kimyasal kirleticiler ve serbest radikaller gibi hastalık etkenleriyle savaşan immun sistemin kontrolünde de önemli fonksiyonlara sahiptir. Melatonin klinik olarak jet gecikmesi ve uyku bozukluklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca, melatoninin immün cevap, kanser ve depresif sendromlar gibi çeşitli hastalıklara karşı oldukça etkili olduğu da bilinmektedir. Bunun yanı sıra, melatonin ve analogları, nemlendirici, yağlanmayı önleyici, yenileyici, kırışıklık önleyici, cilt ağartıcı, güneş ve atmosferin neden olduğu aktinik hasarı önleyici olarak kozmetiklerde de yaygın kullanıma sahiptir.

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.

1.1 Melatonin

Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin), bir amid bağı ve indol halkası içeren ve triptofan aminoasitinden türetilen, küçük bir lipofilik moleküldür (molekül ağırlığı 232 g/mol) (Nomachi ve diğer.,2006). İlk kez yaklaşık 50 yıl önce keşfedilen melatonin, çeşitli fonksiyonlarda rol alır ve pineal glanddan salgılanan bir nörohormondur. Melatonin başlangıçta nöroendokrin fizyolojisi, özellikle üretkenlik fizyolojisi ile ilgili bir molekül olarak tanımlanmıştır (Reiter ve diğer., 1973, 1980), daha sonra melatoninin günlük ritim ve uyku proseslerinde de yer aldığı bulunmuştur (Arendt, 1988, Reiter, 1991). Son yıllarda ise, melatoninin immün fonksiyon ve kanser büyümesinde etkin olduğu ve antioksidatif özelliklere sahip olduğu bulunmuştur (Maestroni, 1993, Reiter ve diğer., 1996).

Bitki ve hayvanda, melatoninin triptofandan sentez şeması aşağıda verilmiştir:



Şekil 1.1 Melatoninin triptofandan sentezlenme şeması

Melatonin, hem yağda (Reiter, 1998) hem de suda (Reiter ve diğer., 1996, Touitou, 2001) çözünebilen, ancak yağdaki çözünürlüğü suya göre daha fazla olan bir moleküldür. Melatonin sentezlendiğinde hemen dolaşıma salınır. Bu hızlı salınımı, hormonun lipofilik özelliğine bağlıdır.

Lipofilik özelliği sayesinde pinealosit membranından ve kılcal damar endotelinden rahatça geçer. Melatoninin kandaki konsantrasyonu, gece sentezlenip salınmasına bağlı olarak gece boyunca gündüze göre 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 geçebilmesi nedeniyle melatonin çok geniş bir dağılımda antioksidan aktivite göstermektedir (Karbownik ve Reiter, 2000).

Melatonin, sadece bir memeli ürünü değildir, yenebilen çeşitli bitkilerin yanı sıra memeli olmayan tüm vertebralılarda, algleri ve bakterileri içeren vertebrasızlarda da bulunmaktadır (Chena ve diğer., 2003). Bu nedenle melatonin, sadece endojen olarak üretilen bir antioksidan değildir; aynı zamanda besin yoluyla da dışarıdan alınabilir (Reiter ve diğer., 1996, Reiter, 1998).

Melatonin, çeşitli koşullarda gastrik ülserleri hafiflettiği ve *H. pylori* enfeksiyonları görülen hastalarda gastrik ülser iyileşmesini teşvik ettiği hâlihazırda onaylanmıştır (Celinski ve diğer. 2011). Bu koruyucu etkiler, kan akışını arttırmak, serbest radikalleri süpürmek, matriks metalloproteinazları (MMP) -3 ve -9'u inhibe etmek ve iltihaplanmayı azaltmak gibi sayısız mekanizmaya katılmaktadır (Jaworek ve diğer., 2005; Ganguly ve diğer., 2010). Şimdiye kadar yapılan çalışmalar, gastrik kanser hücrelerinde melatoninin terapötik potansiyelini açıkça göstermektedir. Melatoninin hedefi olan kanser patogenezinin çeşitli yönlerinin çok büyük bir değere sahip olmayan toksisitesi ile birleşmesi, özellikle kombinasyonel rejimlerde melatoninin gastrik kanser tedavisinde kullanılması potansiyelini ispatlamaktadır (Asghari ve diğer., 2017).

Birçok araştırma, uykusuzluk ve nörodejeneratif hastalıklar gibi bozuklukların ortaya çıkmasını yaşılan ilerlemesiyle MLT hormonunun düşüşüne bağlamaktadır (Pandi ve diğ., 2013). Parkinson ve Alzheimer gibi hastalıklara, iskemi ve intraserebral hemoraji gibi farklı etiolojiden kaynaklanan beyin lezyonlarına karşı nöro koruyucu bir ajan olarak MLT'nin rolü önerilmiştir (Wu ve Swaab, 2005; Lekic ve diğ.,2010).

Melatonin, yüksek bitkilerin kök, gövde, yaprak, çiçek, meyve ve tohum gibi birçok organında gram doku başına pikogram veya nanogram arasında değişen konsantrasyonlarda bulunmaktadır. (Posmyk ve Mjanas, 2009). Melatonin, sentetik melatonin takviyeleri gibi harici olarak veya melatoninini üreten/içeren doğal kaynaklardan alınmalıdır. Örneğin çilek, elma, kiraz, meyve suyu, pirinç, antep fıstığı, badem, ıspanak, lahana, soğan, domates, salatalık, keten tohumu ve ayçiçeğı tohumları, devedikeni, çavdar, rezene ve anason çayı gibi bitki çayları gibi triptofan içeren besin maddelerini alarak da vücuttaki melatonin salınımı artırılabilir (Çalışkan ve diğ.,2017). Aşağıdaki tabloda farklı bazı bitkilerin melatonin miktarları verilmiştir:

Tablo 1.1 Melatonin kaynakları ve miktarı (ng/g)

Yaygın İsim	Organ	MLT miktarı(ng/g)
Gündüz sefası	Yaprak	0,0005
Muz	Meyve	0,002
Gündüz sefası	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
Lahana	Yaprak	0,1
Kırmızı kazayağı	Filiz	0,2
Domates	Meyve	0,5
Sarımsak	Kök	0,6
Kırmızı turp	Kök	0,6
Şalgam	Kök	0,7
Pirinç	Tohum	1
Şevketibostan	Tohum	2
Mısır	Tohum	2
St.John's maltı	Çiçek	4
Uzun çayırotu	Tohum	5
Haşhaş	Tohum	6
Kereviz	Tohum	7

Tablo 1.1 devamı

Kişniş	Tohum	7
Anason	Tohum	7
Defne	Yaprak	8
Keten	Meyve	12
Yeşil kakule	Tohum	15
Kiraz	Meyve	18
Rezene	Tohum	28
Ayçiçeği	Tohum	29
Badem	Tohum	39
Çemenotu	Tohum	43
Arpa	Tohum	82
Yulaf	Tohum	90
Kara lahana	Tohum	129
Beyaz lahana	Tohum	189
Ahududu	Tüm Bitki	387
Küçük yapraklı ıhlamur	Yaprak	410
Turp	Tüm bitki	485
Ak dut	Yaprak	1510

Yüksek bitkilerdeki melatonin varlığı, 1990'ların ortasında insan diyetindeki doğal melatonin kaynaklarını tayin etmeyi amaçlayan iki farklı çalışma ile belirlenmiştir (Dubbels ve diğer., 1995, Hattori ve diğer., 1995). 1997'de de nörolojik hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılan şifalı bitkilerin yüksek miktarda melatonin içerdiğine sahip olduğu belirlenmiştir (Murch ve diğer., 1997). Antioksidatif ve nörodüzenleyici fonksiyonları nedeniyle melatonince zengin şifalı bitkilerin çeşitli hastalıkların tedavisinde etkin olabileceği düşünülmektedir (Watanabe ve diğer., 2002). Ancak melatoninin yeşil bitkiler gibi kompleks

matrikslerden ekstraksiyonu, belirlenmesi ve kantitatif tayininin oldukça güç olduğu bilinmektedir.

Melatoninin klinik olarak uyku bozukluklarının tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir. Alzheimer hastalarında melatonin salgılanması baskılandığı için 1995'ten bu yana Alzheimer hastalarının uyku bozukluklarının tedavisi amaçlı melatonin kullanılmaktadır (Sanders ve diğer., 1999, Jan ve diğer., 1999). Ayrıca, melatoninin immun cevap, kanser ve depresif sendromlar gibi çeşitli hastalıklara karşı da oldukça etkili olduğu literatürde yer almaktadır (Lissoni ve diğer., 1999, Ohashi ve diğer., 1999). Aynı zamanda melatonin ve analogları, kozmetiklerde yaygın olarak kullanılmaktadır; nemlendirici, yağlanmayı önleyici, yenileyici, kırışıklık önleyici, cilt ağartıcı, güneş ve atmosferin neden olduğu aktinik hasarı önleyici (Goldfaden, 2010). Tıp ve kozmetik endüstrisinde yaygın kullanımları nedeniyle, doğal kaynaklardan melatoninin yüksek saflık ve seçicilikte, hızlı ve düşük maliyetli bir yöntemle ekstraksiyon ve tayini önemli hale gelmektedir.

1.1.1 Melatonin Tayini Amaçlı Kullanılan Analitik Yöntemler

Kullanılan yöntemle ilgili olarak nanogramdan pikograma kadar değişen miktarlarda tayini mümkün kılan, günümüzde kullanılan analitik yöntemler radyoimmünojenik yöntem (RIA), enzim-aracılı immünosorbent yöntemi (ELISA), elektrokimyasal ve floresans dedektörlü yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) ve gaz kromatografi-kütle spektrometridir (GC-MS).

Ticari RIA kitleri, modifiye bir ekstraksiyon prosedürüyle birlikte çalışır, ancak bu kitlerin kalsiyum heparin gibi kimyasallar ile girişim yaptığı belirlenmiştir (Sieghart ve diğer., 1987, Plebani ve diğer., 1990). Enzim aracılı immünosorbent yönteminin (ELISA) teknik olarak daha basit ve daha küçük numune hacmiyle çalışma olanağı sağladığı belirlenmiştir. Ancak bu yöntem de düşük melatonin düzeylerini belirlemek için ek deriştirme basamağına gereksinim duyar (Chegini ve diğer., 1995).

Son yıllarda HPLC ve GC-MS teknikleri, özellikle doku ekstraktlarındaki melatoninin kantitatif tayini için kullanılmaktadır (Peniston-Bird ve diğer., 1993). Ancak karışımlardaki tüm bileşenlerin ayrılmasının zor olduğu 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.

Diğer ekstraksiyon yöntemleri ile kıyaslandığında, yüksek örnek hacmi, kolay analit geri alımı, yüksek geri kazanım, hızlı örnek yükleme, az organik çözücü sarfiyatı gibi avantajları nedeniyle KFE ön plana çıkmaktadır. Farklı polimerik yapılar KFE kartuşu olarak kullanılabilirler. Ticari olarak kullanılan farklı KFE sorbentleri Tablo 1.2’de verilmiştir.

Tablo 1.2 Katı faz ekstraksiyonunda kullanılan ticari sorbentler

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

Bununla birlikte, polianilin, polipirrol, stiren-metakrilat ve stiren-N-vinilpirolidon kopolimerleri, stiren-divinilbenzen gibi farklı polimerik yapılar da KFE sobenti olarak kullanılmaktadır. Ancak son yıllarda, çeşitli afinite kromatografi teknikleri kullanılarak farklı yapı ve özelliklerdeki afinite sorbentleri geliştirilmekte ve saflaştırma, uzaklaştırma ve KFE amacıyla yaygın kullanım alanı bulmaktadır.

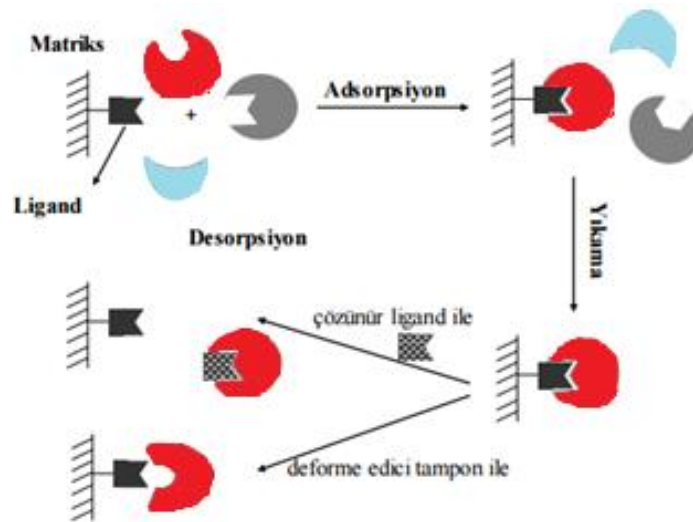
1.2 Afinite Kromatografisi

Yunanca “Chroma” renk ve “Graphein” yazmak kelimelerinden gelen kromatografi, ilk olarak 20.yy başlarında renkli bitki pigmentlerinin ayrılmasında kullanılmıştır ve bir sabit, bir hareketli faz arasında moleküllerin diferansiyel etkileşimlerine dayalı bir “ayırma teknikleri ailesi” olarak tanımlanmıştır. Aynı zamanda biyomoleküllerin saflaştırılmasında da yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir. IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) ise kromatografiyi, kimyasal maddelerin iki ortam arasında dağılmaları ile gerçekleşen fiziksel bir ayırma tekniği olarak tanımlamaktadır. Hareketli faz, sabit fazın üzerinden geçer ve ayrılması istenen maddeyi ortamdan sürükleyerek ayrılması istenen maddeler farklı derecede sabit fazla etkileşime girerler ve sabit fazla etkileşimi fazla olan bileşenler daha ağır, etkileşimi az olan bileşenler ise daha hızlı hareket ettiklerinden bileşenler birbirinden ayrılmış olurlar. Bileşenlerin ayrılmasında, sabit faz ile bileşenler arasındaki etkileşimine göre farklı kromatografik yöntemler geliştirilmiştir. Bu etkileşim molekül büyüklüğüne, polariteye, spesifik bağlanma özelliklerine ya da elektrostatik çekim gücüne göre değişmektedir (Alkan ve diğer., 2009).

Tablo 1.3 Kromatografik teknikler ve temelleri

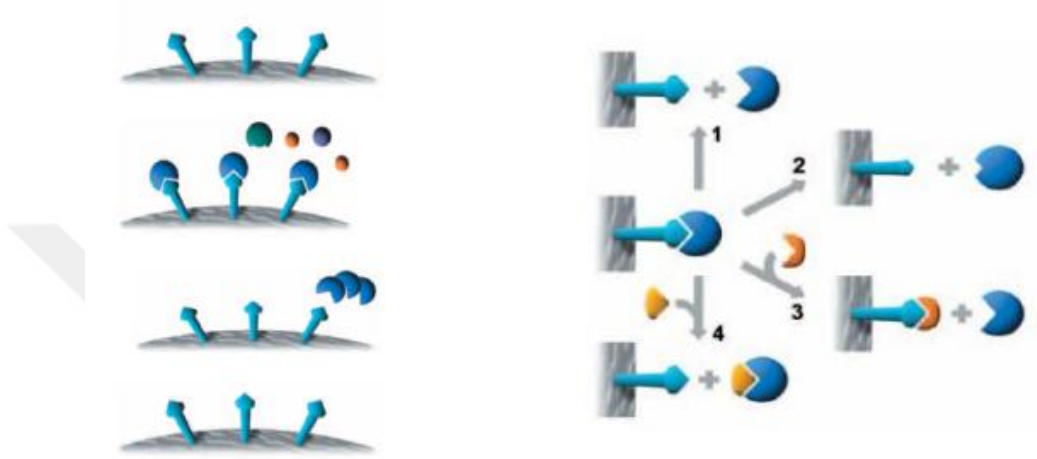
Kromatografik Teknik	Temel
Afinite Kromatografisi	Biyospesifik Seçimlilik
İyon Değişirme Kromatografisi	Yük
Jel Geçirgenlik Kromatografisi	Boyut
İzoelektrik Odaklama Kromatografisi	İzoelektrik Nokta
Hidrofobik Kromatografisi	Hidrofobik Etkileşim
Sıvı Kromatografi	Çözünürlük

Afinite kromatografisi, biyolojik olarak aktif yapıların tamamlayıcı bileşenlerini seçici ve tersinir olarak bağlama özelliklerine dayalı olan adsorpsiyon kromatografisidir. Bu maddeler genellikle ligand olarak adlandırılır. Enzimlerin inhibitörleri, substratları veya kofaktörleri ile aktif veya düzenleyici bölgeleri ile, nükleik asitlerin nükleotidlerle kompleksleri, hormon ve toksinlerin reseptörlerle meydana getirdiği kompleksler, taşıyıcı proteinlerin vitaminler ve şekerlerle oluşturduğu kompleksler afinite kromatografisine örnek olarak verilebilir. Afinite kromatografisinin şematik gösterimi Şekil 1.2’ de gösterilmiştir.



Şekil 1.2 Afinite Kromatografisi

Bu teknikte, klasik yöntemlerden farklı olarak biyolojik moleküller, seçici olarak “biyolojik tanıma” yeteneğine sahip ligandlar kullanılarak saflaştırılmaktadır. Kromatografik kolonda sabit faz olarak kullanılan katı destek üzerine, ligand kovalent olarak bağlanır.

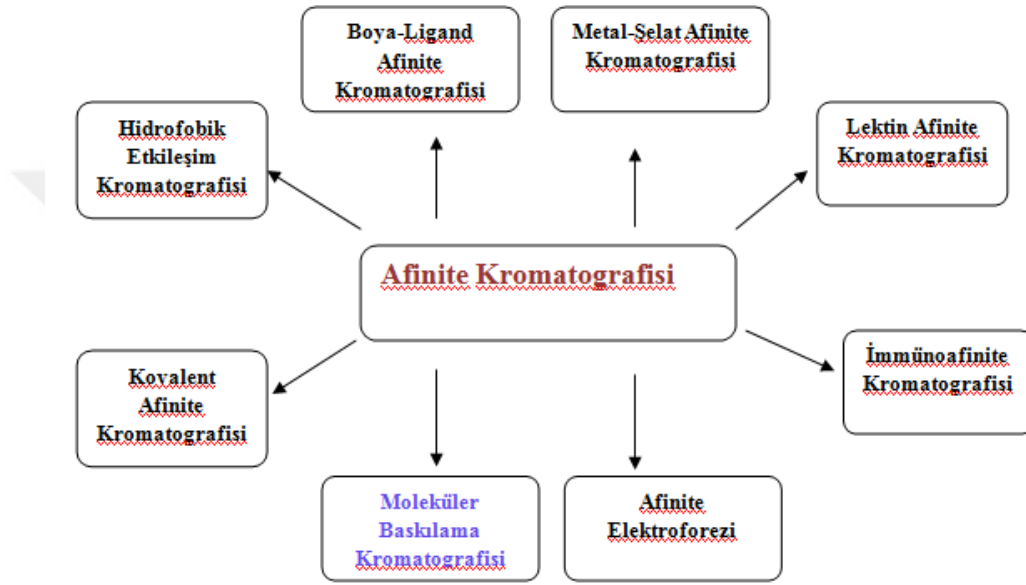


Şekil 1.3 Afinitede saflaştırma basamaklarının şematik gösterimi

Afinitede saflaştırma için, öncelikle bağlanma tamponunda afinite ortamı dengelenir (1), hedef molekül, ligand ile seçici olarak bağlanabileceği koşullarda uygulanır ve hedef spesifik ama tersinir olarak bağlanır; bağlanamayan bileşenler yıkanarak kolondan uzaklaştırılır (2), sonraki adımda, yarışmacı ligantla spesifik olarak veya pH, iyonik şiddet veya polarite değiştirilerek non-spesifik olarak elüsyon gerçekleştirilir (3), ve son olarak bağlanma tamponu ile afinite ortamı tekrar dengelenir (4) (Şekil 1.3). Belirlenen deneysel koşullarda immobilize olan afinite ligandı ile etkileşime girecek uygun grupları bulunmayan moleküller kolona tutunmadan kolondan uzaklaşır, afinitesi olanlar ise kolonda adsorplanır.

Ligand ile saflaştırılan molekül arasında kompleks oluşumu iyonik etkileşim, hidrofobik kuvvetler, London dağılma kuvveti, dipol-dipol etkileşimi veya yük-aktarım etkileşimleri vb. moleküler kuvvetler ile gerçekleşir. Bu kuvvetlerden birkaçının aynı anda gerçekleşmesi biyospesifik bağın seçiciliğini ve etkinliğini belirlemektedir (Lowe, 1996, Wilchek ve Miron, 1999, Anspach, 2004).

Afinitenin geniş alanda farklı uygulamaları mevcuttur. Kullanılan tekniklerin çoğu kendi isimleriyle kabul edilir. Bu tekniklerin bazıları aşağıdaki şekilde gösterilmiştir (Şekil 1.4) (Bereli ve diğer., 2005; Öncel ve diğer., 2005; Altıntaş ve Denizli 2006; Babaç ve diğer., 2006; Özcan ve diğer., 2006).



Şekil 1.4 Afinite kromatografik yöntemler

1.2.1 Moleküler Baskılama Kromatografisi

Moleküler baskılanmış polimer (MIP), bir prepolimerin kalıp molekülün varlığında polimerleştirilmesiyle oluşur (Şekil 1.5). İşlem sırasında polimer ve kalıp molekül arasında bağlar oluşması, monomerik bileşenlerin kendiliğinden bir araya getirilmesinden kaynaklanabilir. Örneğin prepolimerdeki pozitif yükler, kalıp moleküldeki negatif yüklere kendilerini yakınlaştırır ve bununla birlikte, ilke olarak iyonik, hidrofobik, π - π veya hidrojen bağı etkileşimleri gibi kovalent olmayan etkileşim ile çalışır.

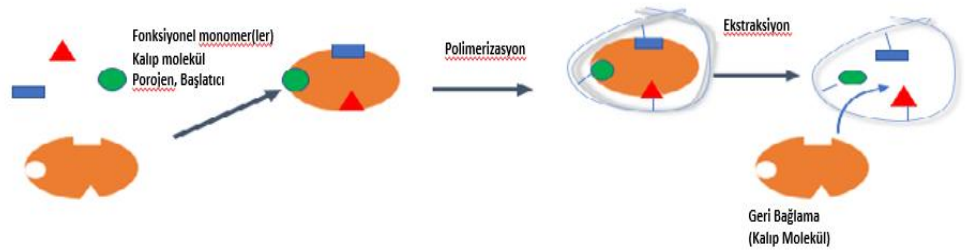
Kalıp molekülü kolayca geri alabilmek için kalıp ve boşluk arasındaki etkileşimin kovalent olmayan özelliği tercih edilir. Polimerizasyon sırasında oligomerlerin çapraz bağlanması sabit etkileşim bölgelerine yol açar. Ortaya çıkan boşluklar, kalıp molekül uzaklaştırılsa olsa bile boyut ve şekli yeniden tanır (Arshady ve Mosbach, 1981). Kalıp ve fonksiyonel monomer arasındaki afinite, baskı molekülünün polimere güçlü bir şekilde bağlanmasına ancak yine de tersine çevrilebilirliğe de olanak sağlamalıdır. Özellikle, kalıp büyük bir molekül olduğunda, polimer kalıbın çıkarılmasına ve yeniden bağlanmaya izin vermesi için bir miktar gözenekli olmalıdır. Bu, MIP'de gözenekli yapıyı arttıran porojenik bir çözücü kullanılarak garanti edilebilmektedir (Pardeshi ve diğer., 2014).

Doğal antikörlerin aksine, MIP'ler genellikle üretilebilirlikleri yüksektir. Aynı zamanda, yüksek kararlılık ve kayda değer mekanik özelliklere sahiptirler. Bu avantajlı teknik, küçük moleküller (örneğin, ilaçlar, zirai ilaçlar, peptidler ve şekerler), daha büyük organik moleküller ve biyoanalitleri (örneğin, virüsler, immünoglobülinler ve eritrositler) içeren çok çeşitli analitler için uygulanabilir (Haupt ve Mosbach., 2000, Subrahmanyam ve diğer., 2013). Ayrıca, MIP'ler, biyolojik reseptörler mevcut olmadığında, özel polimerler olarak uygulanabilir. Bu yöntem, üç basamaktan oluşmaktadır:

- (i) Kalıp molekülün fonksiyonel grup taşıyan polimerleşebilen bir monomer ile kompleks oluşumu gerçekleşir. Bu basamakta kalıp etrafında fonksiyonel monomerin bağlandığı bir yapı oluşumu söz konusudur. Bu etkileşimde kalıp molekülün üç boyutlu yapısı ve kimyasal özellikleri önemli bir yer tutar.
- (ii) Oluşan bu kompleks yapı fonksiyonel monomer üzerinden polimerleştirilir.
- (iii) Oluşan polimerik yapıdan, kalıp molekül uzaklaştırılır ve kalıp molekülün yapıdan uzaklaştırılmasından sonra hazırlanan baskılanmış polimerik matriks, farklı kaynaklardan hedef molekülü yüksek seçicilikle tanır ve uzaklaştırır.

Uygun koşullar altında, moleküler baskılanmış polimerler (MIP), kalıp molekülün boyutunu, yapısını ve fizikokimyasal özelliklerini tanıır, hedef molekülü seçici ve etkin olarak bağlar. Kuvvetli asit, kuvvetli baz, organik çözücüler ve yüksek sıcaklık gibi elverişsiz koşullar MIP' in hedef molekülü tanıma özelliğini etkilemez (Mayes ve Mosbach, 1997). Bu teknik ile hazırlanan polimerler, kromatografi, kapiler elektroforez, sensörler, analitik örnek ayırma ve tanıma, kataliz ve katı-hal kimyası gibi birçok uygulama alanında potansiyel kullanıma sahiptir (Kandimala ve Ju., 2004). Seçici olarak yönlendirme ve oldukça benzer kimyasal türler varlığında kalıp molekülü bağlama yeteneği, bu polimerlerin birçok biyomedikal ve biyoteknolojik uygulamada kullanımını sağlamaktadır (Nicholls ve Rosengren., 2002).

Metakrilik asit (MAA), moleküler baskılamada en çok kullanılan monomerdır. Çünkü yapısındaki karboksilik asit grubu hem H bağı yapabilir hem de proton vericisi olarak davranır. Bu özelliği kalıpla çeşitli etkileşimleri mümkün kılmaktadır. Ancak, bağlanmadaki bu çeşitlilik nedeniyle non-spesifik bağlanma bölgeleri ve arka plandaki iyonik etkileşimler MIP performansını etkilemektedir (Nguyen ve Ansell, 2011). Amid bazlı monomerlerin kullanımı ile metakrilik asitle yaşanan bu problemler, aşılmaya çalışılmıştır. Amid fonksiyonel grubunun kalıpla karboksil grubundan daha güçlü bir H bağı yaptığı önerilmektedir. Ayrıca, You ve Mosbach, amid içeren MIPlerin etkin tanıma gösterdiğini belirtmiştir (Yu and Mosbach, 1997). Ancak, akrilamid (AAM) kloroform gibi apolar çözügenlerde düşük çözünürlüğe sahiptir. Bu nedenle AAM kullanılan baskılamada daha polar çözügenler kullanılmalıdır, ancak bu durumda da H-bağları zayıflar. Monomer seçiminde bunların yanısıra kalıp moleküle uygunluğu da dikkate alınmalıdır.



Şekil 1.5 MIP oluşumunun genel prensibi

1.2.1.1 Moleküler Baskılama Yöntemleri

Kovalent baskılama için, kalıp molekülün polimerize olabilecek bir ürününü sentezlemek gerekir ve polimer sentezi sonrasında kalıp molekül, yapıdan kimyasal olarak uzaklaştırılabilir (Wulff ve diğer., 1977). Polimerizasyon işleminden önce fonksiyonel monomer ile kalıp molekül birbirlerine kovalent bağlarla bağlanır. Polimerizasyon işleminden sonra kovalent bağlar kırılır ve yuvayı oluşturmak amacıyla polimerden ayrılırlar. Hedef molekül, baskılanmış polimerle etkileştirildiğinde aynı kovalent bağ yeniden meydana gelerek baskı iyonu veya molekülü boşluğa seçici olarak yerleşir (Shea ve Dougherty 1986). Şekil 2.3' de kovalent moleküler baskılama yöntemi şematik olarak verilmektedir.

Moleküler baskılama tekniğinde kovalent bağlanmanın yanı sıra non-kovalent bağlanma da mümkündür. Bu bağlanmada, fonksiyonel monomer ile kalıp molekülün bağlanması non-kovalent (hidrojen bağı, elektrostatik etkileşimler gibi) etkileşimlerle gerçekleşir. Polimerizasyondan sonra uygun çözücülerle kalıp molekül polimerden ayrılır. Hedef molekül ile baskılanmış polimerler non-kovalent etkileşimlerle bağlanırlar (Molinelli, 2004; Öncel ve diğer., 2005).

Kovalent bağlanma ile kıyaslandığında daha zayıf olsa da çok yönlü bağlanma gerçekleştirme nedeniyle dikkatleri üzerine çekmiştir (Shea ve Dougherty, 1986).

Kompleks oluşumunda hidrojen bağı, iyonik bağ, hidrofobik etkileşimler gibi zayıf etkileşimler meydana gelmektedir. Dolayısıyla, kolay uzaklaştırılabilir özelliğe sahip olmaktadır.

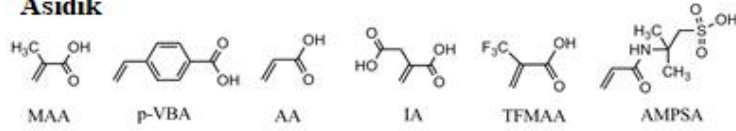
1.2.2 Moleküler Baskılamada Kullanılan Bileşenler

1.2.2.1 Fonksiyonel Monomerler

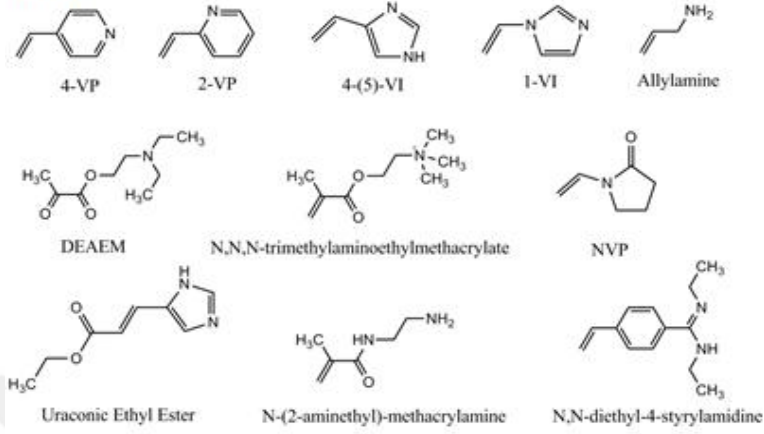
Baskılama işlemi sırasında monomer-kalıp kompleksinin kararlı olabilmesi için fonksiyonel monomer seçimi önemlidir. Fonksiyonel monomerde anahtar eleman, başarılı bir etkileşimin gerçekleşmesi için uygun fonksiyonel bağlanma bölgelerinin sayısıdır (Sellergren, 2001).

Kompleks oluşumu ve baskılama etkisini arttırmak için fonksiyonel monomerlerin ve baskılanacak molekül veya iyonun fonksiyonel gruplarının uyuşması gerekmektedir. Asidik, bazik ve nötral olan bazı monomerler Şekil 1.6'da verilmiştir.

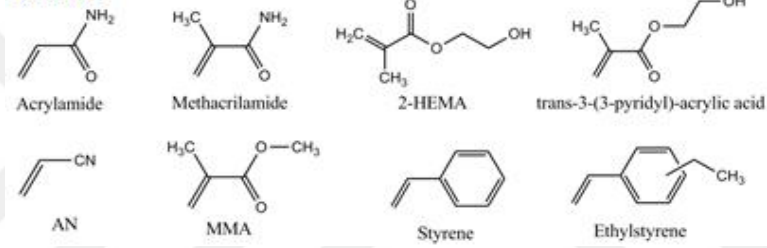
Asidik



Bazik



Nötral



Şekil 1.6 Moleküler baskılamada kullanılan monomerler

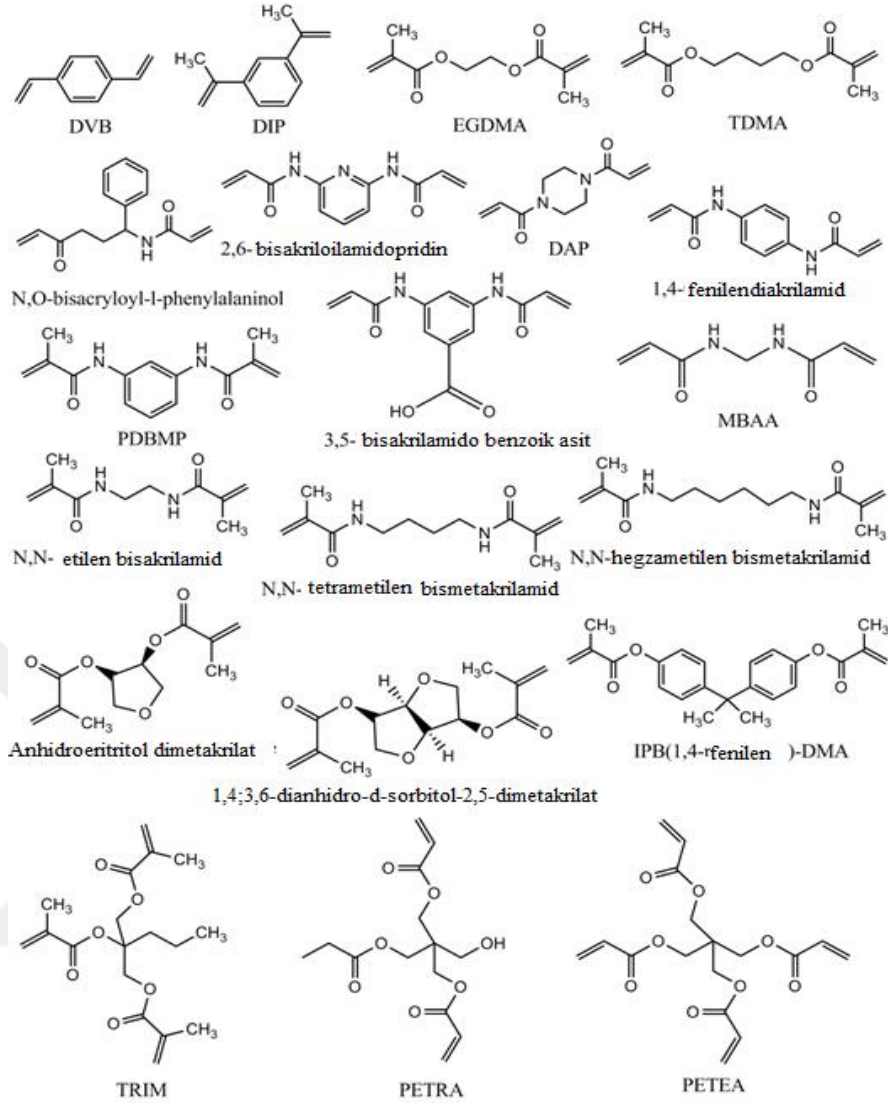
1.2.2.2 Kalıp (Hedef) Molekül

Moleküler baskılama tekniğinde baskılanacak olan molekül veya iyon, uygun fonksiyonel gruplara sahip monomerlerle etkileştirilir. Bu nedenle baskılanacak olan molekül çok önemlidir. Baskılanacak olan molekülün polimerleşecek grup içermesi, reaksiyonu engelleyecek veya yavaşlatacak grubun varlığı, ayrıca yüksek sıcaklıklarda baskılanan kalıp molekülün kararlılığı önemli parametrelerdir. Baskılanacak kalıp molekül olarak ilaçlar, aminoasitler, karbohidratlar, proteinler, nükleotid bazlar, hormonlar, pestisitler, koenzimler veya iyonlar kullanılabilir (Cormack ve Mosbach, 1999).

1.2.2.3 Çapraz Bağlayıcılar

Çapraz bağlayıcılar polimer matriksinin morfolojisinin (jel tipi, makro gözenekli ya da mikro jel toz halinde olması) kontrol edilmesini, baskılanmış molekülün veya iyonun bağlanma bölgelerinin kararlı olmasını ve polimer matriksinin mekanik kararlılığını sağlamaktadır. Etkin bir baskılama için, çapraz bağlayıcılarla fonksiyonel monomer ve kalıp molekül uyum içinde olmak zorundadır. Aksi takdirde fonksiyonel monomerden veya çapraz bağlayıcıdan biri, polimerizasyon sırasında baskın çıkarak kopolimerizasyon gerçekleşmesini engelleyebilir.

Çapraz bağlayıcı ile fonksiyonel monomer arasında stokiometrik dengenin olması gerekir; çok büyük mol oranlarında çapraz bağlayıcılar fonksiyonel monomerlerle veya kalıp molekülle kovalent olmayan etkileşimler gösterir ve bu da baskılamanın etkinliğini azaltmaktadır, çok küçük mol oranlarında ise, kalıp molekülün bağlanma bölgeleri birbirlerine çok yaklaşır ve kalıp molekülün bağlanma bölgeleri komşu bölgeler tarafından kapatılır, etkin bir sonuç elde edilemez (Chapuis ve diğer., 2004). Etilenglikoldimetakrilat (EGDMA) ve divinil benzen, yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcılar olmakla birlikte aşağıda moleküler baskılamada kullanılan çapraz bağlayıcılar verilmiştir (Şekil 1.7).



Şekil 1.7 Moleküler baskılamada kullanılan çapraz bağlayıcılar

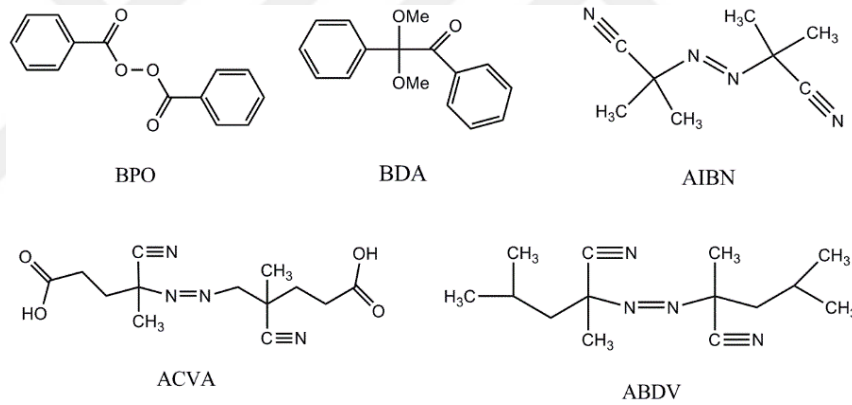
1.2.2.4 Çözücüler

Baskılama tekniğinin türüne bağlı olarak uygun çözücüler kullanma gerekmektedir. Kovalent olmayan baskılama polimerizasyonunda, baskılanacak molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki kompleks oluşumunu artırma görevine de sahiptir. Ayrıca kalıp molekül ve fonksiyonel monomer arasında kovalent olmayan etkileşim oluşumunu, baskılama etkisini arttırmak için çözücü seçimi önemlidir (Selligren, 2001).

Çözücü, polimerizasyon esnasında reaksiyon ısını eşit yayarak, istenmeyen yan ürünlerin oluşumunu engellemelidir.

1.2.2.5 Başlatıcılar

Farklı kimyasal özelliklere sahip birçok kimyasal başlatıcı mevcuttur ve serbest radikal polimerizasyonunda radikal kaynak olarak kullanılmaktadırlar (Şekil 1.8). Genellikle 2,2-azobis(izobütironitril) (AIBN) ve 2,2-azobis(2,4-dimetilvaleronitril) (ADV) kullanılmaktadır. Monomer ile kalıp molekül arasındaki etkileşimlerin çok zayıf olduğu bir durumda çok yüksek sıcaklıklara çıkılamaz ve bu koşullarda, ısıl bozunma yerine UV bozunma tercih edilmektedir (Cormack ve Elorza, 2004).



Şekil 1.8 Kimyasal başlatıcılar

Kalıp molekülün boyutunu, yapısını ve fizikokimyasal özelliklerini tanıyarak seçici ve etkin olarak hedef molekülü bağlayan moleküler baskılanmış polimerler son yıllarda kataliz, kontrollü ilaç salınımı, amino asitlerin ayrılması, kiral ayırmalar, geniş bir aralıkta analitlerin ekstraksiyonu, elektrokimyasal ve biyosensörler gibi birçok biyomedikal ve biyoteknolojik uygulamada kullanım alanı bulmuştur. Bu nedenle bu çalışmada, kompleks biyolojik matrikslerdeki melatoninin belirlenme ve kantitatif tayini için katı faz kartuşu olarak kullanılabilecek p(EGDMA-MATrp) mikrokürelerin hazırlanması, FTIR, SEM ve TG-DTA analizleri ile karakterize edilmesi ve kalıbın uzaklaştırılması ile melatonin adsorpsiyon koşullarının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen p(EGDMA-MATrp) mikrokürelerin tekrar kullanılabilirliği ve iklamurdaki melatoninin HPLC ile tayini öncesi ekstraksiyonunda uygulanabilirliği belirlenmiştir.

BÖLÜM İKİ

MATERYAL METOD

2.1 Reaktifler

N-metakriloil-L-triptofan metilester (MATrp) monomeri, Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi Doc. Dr. Bilgen Osman'dan, Melatonin Alfa Aesar'dan temin edilmiştir. Metanol (MeOH) ve asetonitril (ACN), HPLC saflıkta olup Sigma Aldrich firmasından temin edilmiştir. Kullanılan diğer tüm kimyasallar analitik saflıktadır. Çalışmalarda kullanılan su, Millipore ultra saf su cihazı [Millipore Corporation (France) Elix 5 ® reverse osmos ünitesi, elektrodeiyonizasyon (E.D.I) modülü (Elix ® 5 Water System), organik/kolloid uzaklaştırıcı iyon değişim sistemi] ile üretilmiştir.

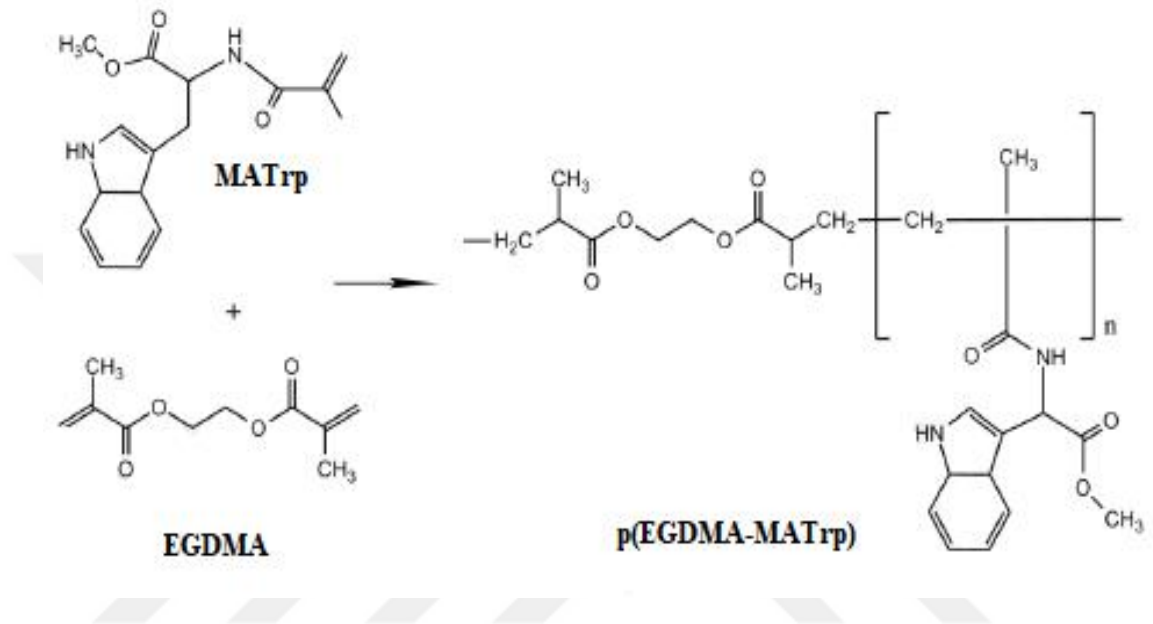
2.2 Kullanılan Cihazlar

Bu çalışmada, Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 LC, Millipore ultra saf su cihazı [Millipore Corporation (France) Elix 5 ® reverse osmos ünitesi, elektrodeiyonizasyon (E.D.I) modülü (Elix ® 5 Water Purification System), organik/kolloid uzaklaştırıcı iyon değişim sistemi], Hettich Rotina 380R santrifüj ve Barnstead Lab-Line Max Q 4000 kuru sistem orbital çalkalayıcı kullanılmıştır.

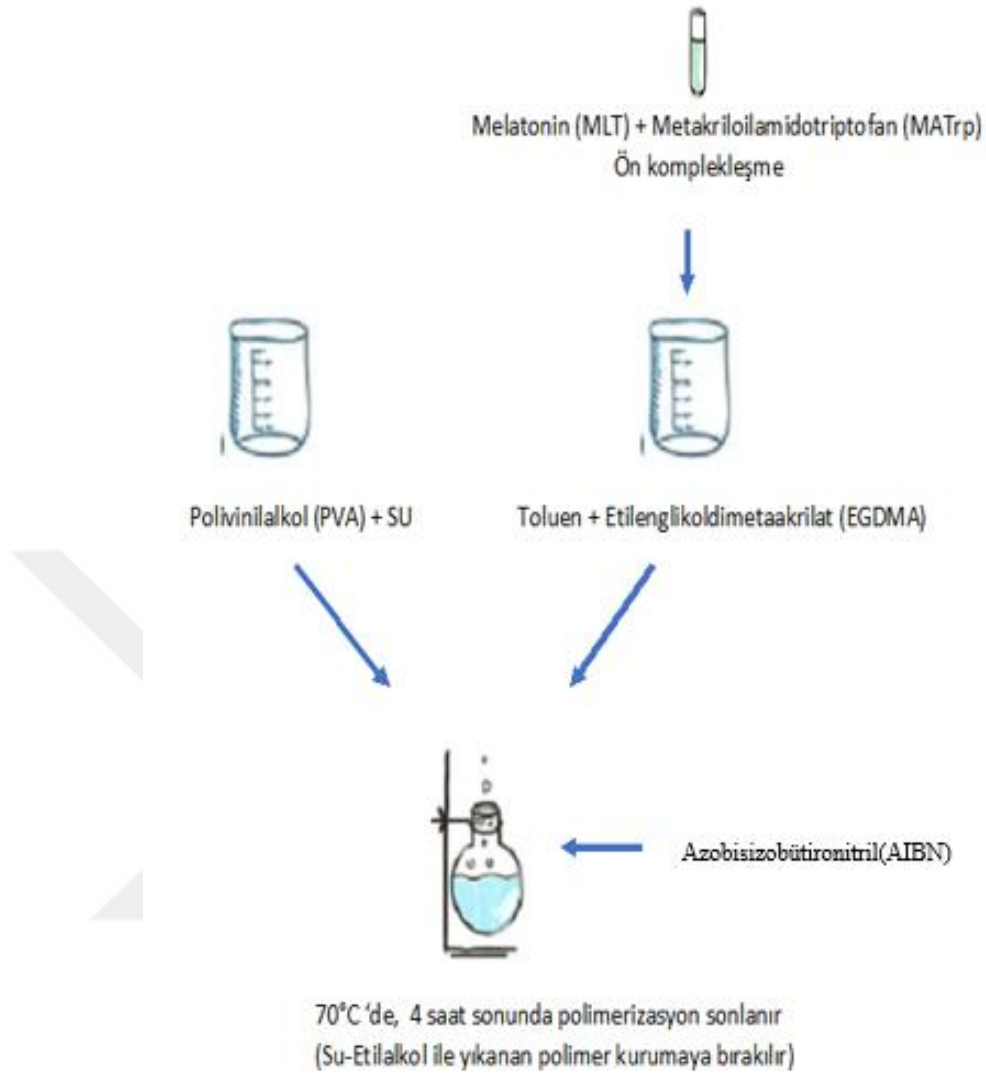
2.3 MLT Baskılanmış p(EGDMA-MATrp) Mikrokürelerin Hazırlanması

Çalışma kapsamında, MLT baskılanmış p(EGDMA-MATrp) mikroküreleri, metakriloilamidotriptofan (MATrp, fonksiyonel monomer), etilenglikol dimetakrilat (EGDMA, çapraz bağlayıcı), toluen (porojen), polivinilalkol (PVA, dispersiyon fazı) ve azobisizobütironitril (AIBN, serbest radikal başlatıcı) kullanılarak süspanse şekilde serbest radikal polimerizasyonuyla sentezlenmiştir (Osman ve diğer., 2013). İlk aşamada, 0,2 g PVA 40 ml saf su içinde çözülerek dispersiyon fazı hazırlanmıştır. 0,46 mmol MATrp ve 0,46 mmol MLT (1:1) bir gece boyunca ön kompleksleşme için bırakılmıştır. Daha sonra, çapraz bağlayıcı olan EGDMA'dan 5 mL eklenmiş ve 7 mL toluen ile oda sıcaklığında 15 dakika karıştırılmıştır. Toluene polimerizasyon reaksiyonuna seyreltici ve gözenek biçimlendirici olarak eklenmiştir. Polimerizasyonu başlatmak amacıyla, 0,1 g AIBN (serbest radikal başlatıcı) ilave edilmiş ve kapalı bir silindirik polimerizasyon reaktöründe bulunan karışım 150 rpm'de 65°C'de 4 saat boyunca çalkalayıcıda karıştırılarak polimerizasyon gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen mikroküreler, tepkimeye katılmayan monomer ve çözücülerini uzaklaştırmak için su ve etanol ile yıkanmış ve daha sonra kurutulmuştur. p(EDGMA MATrp) sentezine ait olası tepkime (Şekil 2.1) ve mikrokürelerin sentez şeması aşağıda verilmiştir (Şekil 2.2).



Şekil 2.1 p(EDGMA MATrp) sentezine ait olası reaksiyon şeması



Şekil 2.2 MLT baskılanmış p(EGDMA-MATrp) sentez şeması

MLT baskılanmış p(EGDMA-MATrp) sorbentten kalıbın (MLT) uzaklaştırılması amacıyla farklı ajanlarla [(etilasetat:metanol; 2:8), (triethylamin:metanol; 1:9), (asetik asit:metanol; 1:9), (1 M NaCl)], oda sıcaklığında 1 saat süreyle inkübe edilmiştir. Etilasetat:metanol (2:8), triethylamin:metanol (1:9), asetik asit:metanol (1:9) karışımları kalıbın uzaklaştırılmasında yetersiz kalmakla birlikte, kalıp molekül, 1 M NaCl kullanılarak $\geq 80,0$ oranında uzaklaştırılmıştır.

2.3.1 MLT Baskılanmış p(EGDMA-MATrp) Mikrokürelerin Karakterizasyonu

Sentezlenen MLT baskılanmış p(EGDMA-MATrp) mikroküreler, Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM), Fourier Dönüşümlü Infrared Spektroskopisi (FTIR), termal gravimetrik analiz (DTA-TGA) ve şişme analizleri kullanılarak karakterize edilmiştir.

MLT baskılanmış p(EGDMA-MATrp) mikrokürelerin FTIR spektrumu, FTIR spektrofotometresi (Perkin Elmer 100 FTIR) kullanılarak elde edilmiştir. Bu amaçla, kurutulmuş mikroküreler (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 çekilmiştir.

MLT baskılanmış p(EGDMA-MATrp) mikrokürelerin yüzey morfolojini belirlemek amacıyla Aksaray Üniversitesi'nde SEM görüntüleri alınmıştır. Örnekler analiz öncesi 7 gün süreyle 25°C'de kurutulmuş, iletkenliğini arttırmak amacıyla yüzeye altın kaplama yapıldıktan SEM cihazı (Zeiss Supra 55) ile görüntü alınmıştır. Örneğin yüzeyi, nanokürelerin morfolojisini belirlemek için istenilen büyüklükte taranmıştır.

Sentezlenen MLT baskılanmış p(EGDMA-MATrp) mikrokürelerin şişme davranışları incelenmiştir. Kuru ağırlığı bilinen mikrokürelerin 25 °C'de su banyosunda distile su içerisinde bekletilerek belirli zaman aralıklarında çıkartılıp etrafındaki fazla su uzaklaştırıldıktan sonra ağırlıkları hassas terazide ölçülmüş, mikrokürelerin şişmeleri denge değerine gelene kadar denemeye devam edilmiştir.

Deneme sonunda elde edilen tartım değerlerine göre mikrokürelerin % şişme değerleri aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlenmiştir (Uygun ve diğer., 2014):

$$\% S = [(W_t - W_0) / W_0] \times 100 \quad (2.3)$$

Eşitlikte W_t herhangi bir t anındaki şişmiş mikrokürelerin, W_0 ise başlangıçtaki kuru mikrokürelerin ağırlığıdır. Her bir mikroküre için yüzde şişme değeri olan % S değeri elde edilmiştir.

2.4 MLT Baskılanmış p(EGDMA-MATrp) Mikrokürelere Melatonin Adsorpsiyonu ve Desorpsiyon Koşullarının İncelenmesi

Kalıp (MLT) uzaklaştırılan polimer ile adsorpsiyon koşullarını optimize etmek amacıyla sorbent miktarı, süre, pH, sıcaklık, derişim, iyon şiddeti gibi parametrelerin adsorpsiyona etkisi incelenmiş desorpsiyon amacıyla uygun ajanın belirlenmesi için çalışmalar yapılmış ve sorbent tekrar kullanılabilirliği çalışılmıştır.

2.4.1 MLT Adsorpsiyonunun Optimizasyonu

Polimere en yüksek kapasitede MLT adsorpsiyonunu sağlamak amacı ile süre, sorbent miktarı, derişim, sıcaklık, pH etkisi ve iyon şiddeti gibi parametrelerin optimizasyonu kesikli sistemde gerçekleştirilmiştir.

2.4.1.1 MLT Adsorpsiyonuna Sürenin Etkisi

MLT adsorpsiyonu üzerine sürenin etkisini belirlemek amacıyla 5 ml 10 ppm MLT çözeltisi ve 0,01 g p(EGDMA-MATrp) mikroküreleri içeren 6 adet deney tüpü sırasıyla 15-30-45-60-90-120 dk süreyle 25°C sıcaklıkta 150 rpm hızla çalkalayıcıda çalkalanmış ve süre sonunda örnekler 20 dk 10000 rpm hızla santrifüjlenerek üst fazda MLT derişimleri belirlenmiştir. Adsorplanan MLT miktarı aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır:

$$Q = \frac{C_{\text{başlangıç}} - C_{\text{son}}}{m} \times V \quad (2.4)$$

Bu eşitlikte, Q, gram sorbent başına adsorplanan MLT miktarını (mg/g); C_{başlangıç}, başlangıç MLT derişimini (mg/L); C_{son}, adsorpsiyon sonrası belirlenen MLT derişimini (mg/L); m, kuru sorbent ağırlığını (g); V ise adsorpsiyon hacmini (L) ifade eder.

2.4.1.2 MLT Adsorpsiyonuna Sorbent Miktarının Etkisi

Sorbent miktarının adsorpsiyon üzerindeki etkisini değerlendirmek üzere sentezlenen p(EGDMA-MATrp) afinite sorbentinin; 0,01-0,1 g aralığındaki miktarları üzerine 5 mL 10 ppm MLT çözeltisi eklenerek 30 dk süre ile 25°C sıcaklıkta 150 rpm hızla çalkalayıcıda çalkalanmış ve sonrasında 20 dk 10000 rpm hızla santrifüjlenerek MLT miktarları belirlenmiştir.

2.4.1.3 MLT Adsorpsiyonuna Başlangıç Derişiminin Etkisi

Derişimin adsorpsiyon üzerindeki etkisini değerlendirmek üzere 1-300 ppm derişim aralığındaki MLT çözeltileri hazırlanmış ve her birine 0,01 g p(EGDMA-MATrp) mikroküreleri eklenmiştir. Her bir tüp 30 dk süre ile 25°C sıcaklıkta 150 rpm hızla çalkalayıcıda çalkalanmış ve sonrasında 20 dk 10000 rpm hızla santrifüjlenerek MLT miktarları belirlenmiştir.

2.4.1.4 MLT Adsorpsiyonuna Sıcaklık Etkisi

Sıcaklığın adsorpsiyon üzerindeki etkisini değerlendirmek üzere 5 ml 10 ppm MLT çözeltisi ve 0,01 g p(EGDMA-MATrp) mikroküreleri içeren 5 deney tüpü ayrı ayrı sırasıyla 15-60°C sıcaklık aralığında 30 dk 150 rpm hızla çalkalayıcıda çalkalanmış ve sonrasında 20 dk 10000 rpm hızla santrifüjlenerek MLT miktarları belirlenmiştir.

2.4.1.5 MLT Adsorpsiyonuna pH'ın Etkisi

pH'ın adsorpsiyon üzerindeki etkisini değerlendirmek üzere pH'ı 3,0-7,0 arasında değişen tampon çözeltiler kullanılarak 10 ppm MLT varlığında 0,01 g p(EGDMA-MATrp) mikroküreleri eklenerek 30 dk süre ile 25°C sıcaklıkta 150 rpm hızla çalkalayıcıda çalkalanmış ve sonrasında 20 dk 10000 rpm hızla santrifüjlenerek MLT miktarları belirlenmiştir. Kullanılan tamponlar aşağıdaki gibi hazırlanmıştır:

0,1 M Asetat Tamponu (pH 3,0; 4,0; 5,0): 15 mL 0,1 M asetik asit ve 10 mL 0,1 M sodyum hidroksit karıştırılmıştır.

0,1 M Fosfat Tamponu (pH 6,0; 7,0): 0,1681 g potasyum bifosfat ve 0,2089 g potasyum fosfat saf suda çözülmüş ve hacmi 25 mL'ye tamamlanmıştır.

2.4.1.5 MLT Adsorpsiyonuna İyon Şiddetinin Etkisi

İyon şiddetinin adsorpsiyon üzerindeki etkisini değerlendirmek üzere 10 ppm MLT çözeltisi oluşturacak şekilde 5 mL'lik 0,02; 0,04; 0,06; 0,08 ve 0,1 M NaCl çözeltileri hazırlanmıştır. Her birine 0,01 g p(EGDMA-MATrp) mikroküreler eklenerek 30 dk süre ile 25°C sıcaklıkta 150 rpm hızla çalkalayıcıda çalkalanmış ve sonrasında 20 dk 10000 rpm hızla santrifüjlenerek MLT miktarları belirlenmiştir.

2.4.2 Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

MLT baskılanmış p(EGDMA-MATrp) afinite sorbenti üzerinde adsorplanmış olarak bulunan MLT'nin etkin desorpsiyonunu sağlamak amacıyla, farklı desorpsiyon ajanlarıyla [(etilasetat:metanol; 2:8), (triethylamin:metanol; 1:9), (asetik asit:metanol; 1:9), (1M NaCl)] çalışılmıştır. Belirlenen desorpsiyon ajanı ile adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü 5 kez tekrarlanarak tekrar kullanılabilirliği çalışılmıştır.

2.5 İhlamur Örneklerindeki Melatoninin MLT Baskılanmış p(EGDMA-MATrp) Mikrokürelere Adsorpsiyonu

Birçok bitki türü doğal MLT kaynağı olarak bilinmektedir. Bu çalışmada kullanılan ıhlamur örnekleri çalışma öncesinde günlük ve çektirilmiş olarak alınmıştır.



Şekil 2.3 Kurutulmuş ıhlamur örneği

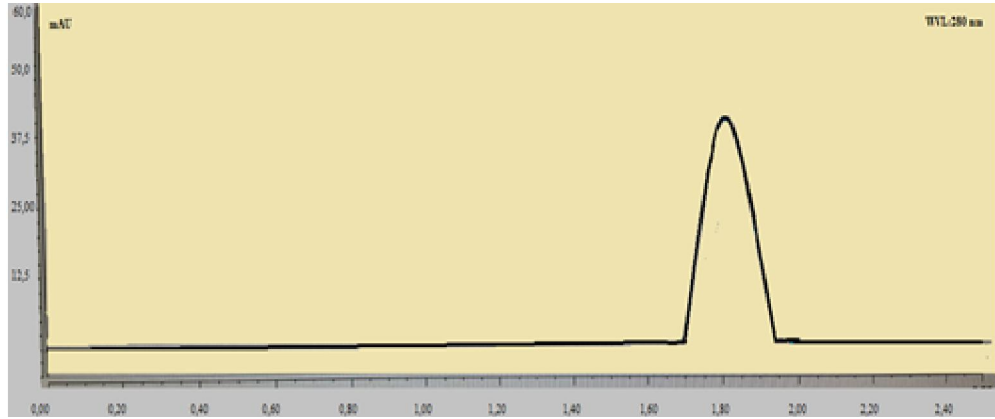
Çekilmiş olarak hazırlanan ıhlamur örneğinden 2 g alınarak 15 mL farklı ekstraksiyon çözeltilerinde [etanol, etilasetat, etilasetat:metanol] birkaç dakika havanda ezildikten sonra 2 saat ultrasonik banyo içerisinde ekstraksiyon sağlanmıştır. İki saat sonunda, 9000 rpm 20 dk santrifüjlenerek süpernatant fazları alınmış ve hazırlanan 10 mL'lik örnek çözeltilerinin herbirine 0,01 g MLT baskılanmış p(EGDMA-MATrp) mikrokürelere eklenerek 30 dk, 25°C sıcaklıkta, 150 rpm hızla çalkalayıcıda işlem görmüştür. Daha sonra örnekler, 20 dk 10000 rpm hızla santrifüjlenerek süpernatant fazları HPLC'ye uygulanmış ve MLT tayini gerçekleştirilmiştir.

2.6 Melatoninin HPLC ile Analiz Koşulları

MLT'nin HPLC ile analizi, Jian Lin ve diğer. (2012) yöntemi modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. Kromatografik koşullar aşağıdaki gibidir (Tablo 2.6):

Tablo 2.6 Melatonin HPLC ile tayininde kullanılan kromatografik koşullar

Cihaz	Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 LC sistem (diode array dedektör, oto-örnekleyici, kolon fırını)
Akış Hızı (mL/dk)	1.000
Sıcaklık (°C)	30
Enjeksiyon Hacmi (µL)	20
Kolon	Thermo ODS-2 Hypersyl C18 (150 mm x 4,6 mm x 3 µm)
DAD dedektör dalga boyu	280 nm
Çalışma şekli	İzokritik
Mobil Faz	ACN: MeOH: %0,5lik Asetik Asit (60:30:10)
t _R (dk)	1,80



Şekil 2.4 10 ppm MLT standardının kromatogramı

BÖLÜM ÜÇ

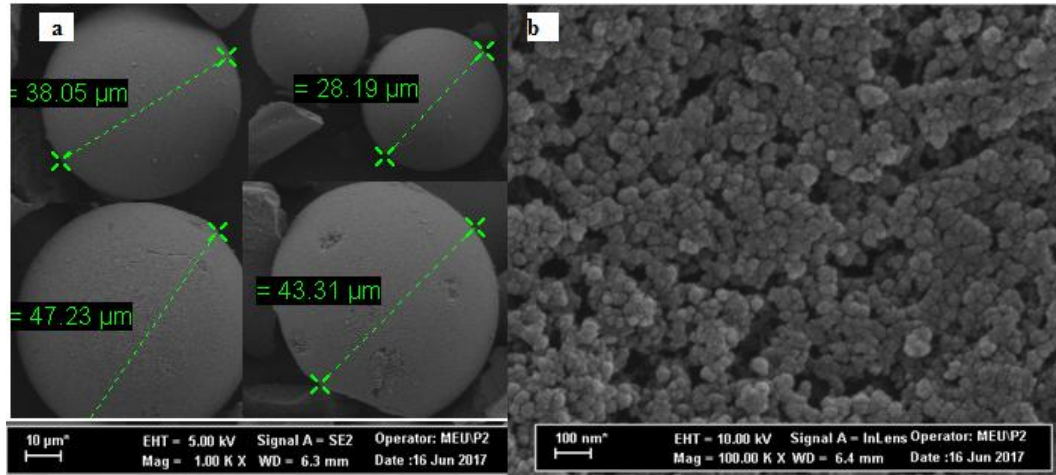
BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1 MLT Baskılanmış p(EGDMA-MATrp) Mikrokürelerin Karakterizasyonu

Hazırlanan MLT baskılanmış p(EGDMA-MATrp) mikrokürelerin karakterizasyonu FTIR, DTA-TGA, SEM ve şişme analizleri ile gerçekleştirilmiştir.

3.1.1 MLT Baskılanmış p(EGDMA-MATrp) Mikrokürelerin SEM Analizleri

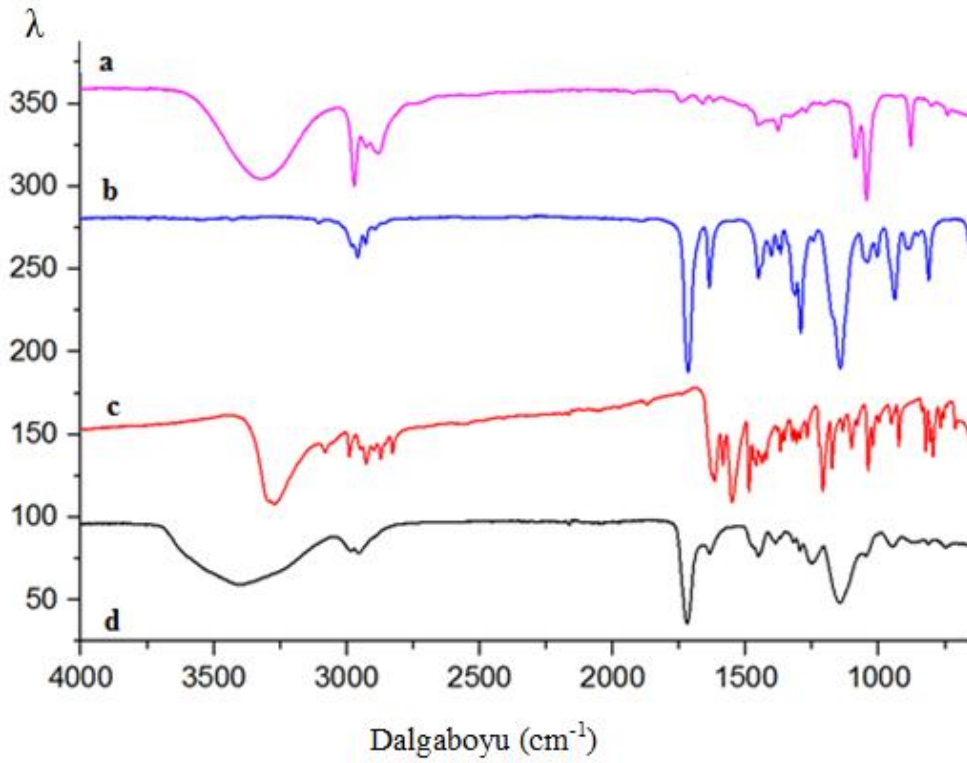
Küresel şekilli MLT baskılanmış p(EGDMA-MATrp) mikroküreleri, süspansiyon polimerizasyon yöntemi ile hazırlanmıştır. Mikrokürelerin SEM görüntüsü Şekil 3.1’de gösterilmiştir. SEM görüntülerinden görüldüğü üzere p(EGDMA-MATrp) mikroküreleri, ortalama 40 μm boyutta ve küresel iskelete sahiptir.



Şekil 3.1 MLT baskılanmış p(EGDMA-MATrp) polimerin SEM görüntüsü

3.1.2 MLT Baskılanmış p(EGDMA-MATrp) Mikrokürelerin FTIR Analizi

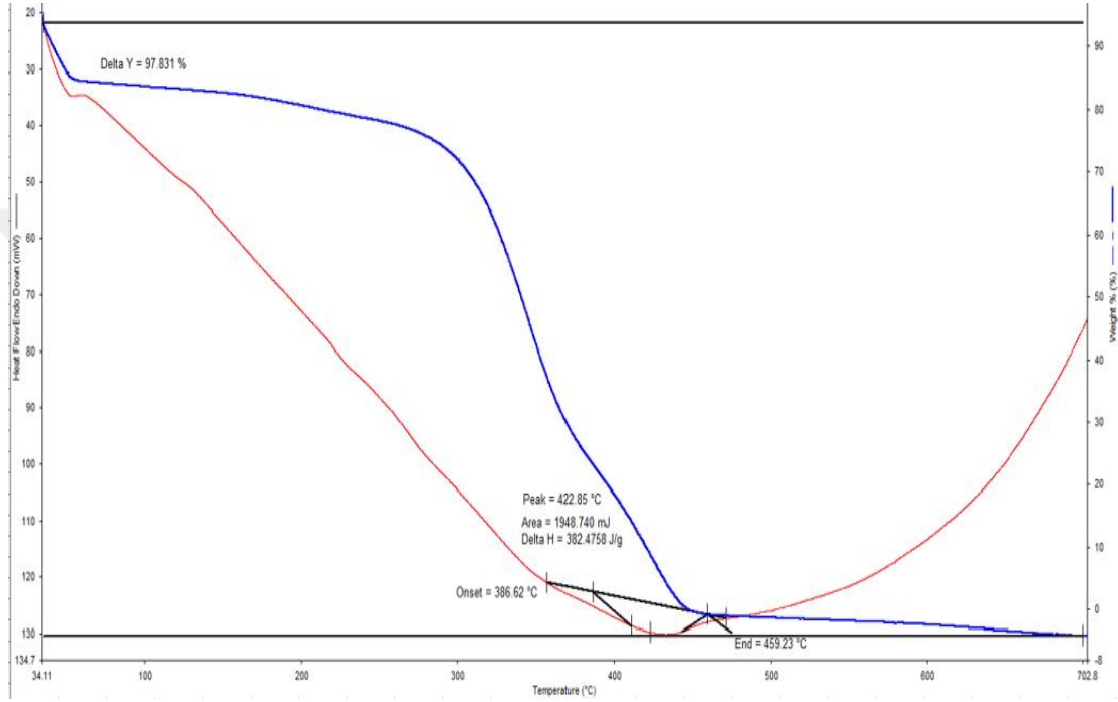
MLT ve MLT baskılanmış p(EGDMA-MATrp) mikrokürelerin FTIR sonuçlarına bakıldığında, MLT'e ait bandların polimere ait bandlarda da olduğu gözlenmektedir. 3388 cm^{-1} geniş bant MLT 'deki indol grubundaki aminin yapıya katıldığını göstermektedir (N-H aromatik), 1143 cm^{-1} bandı EGDMA molekülündeki C-O-C, 1719 cm^{-1} C=O ve 2986 cm^{-1} OH varlığını göstermektedir. 1636 cm^{-1} 'deki band da triptofanın yapısında bulunan karbonil grubundan kaynaklanmaktadır.



Şekil 3.2 FTIR spektrumları a) MATrp b) EGDMA c)MLT d) MLT-p(EGDMA-MATrp)

3.1.3 MLT Baskılanmış p(EGDMA-MATrp) mikrokürelerin DTA-TGA Analizi

TGA ile polimerin ağırlığının yani polimer kütlesinin, sıcaklığa ya da zamana bağlı olarak ölçümü yapılmıştır.

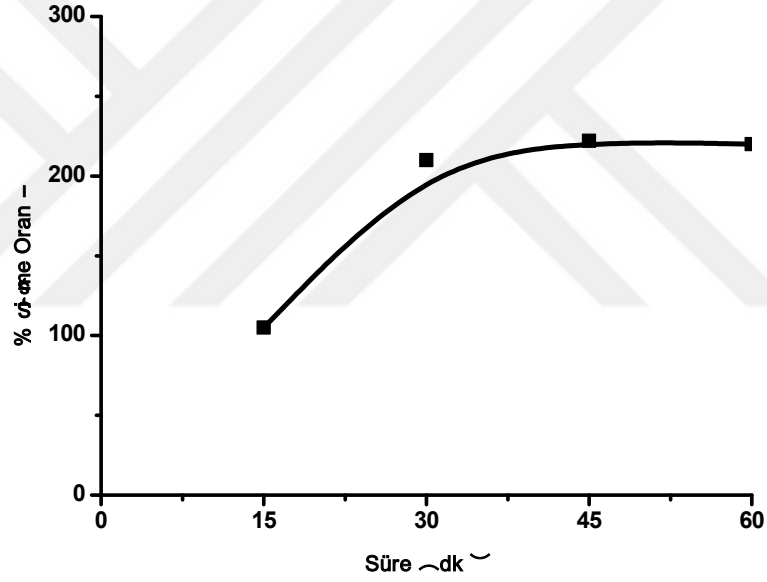


Şekil 3.3 MLT baskılanmış p(EGDMA-MATrp) polimerin DTA-TGA analizi

Şekil 3.3'ten görüleceği üzere, DTA-TGA analiz sonuçlarına göre polimerde 386,6° C'de başlayıp 459,2°C'de tamamlanan kütle kaybı yaklaşık %97,8 olarak belirlenmiştir.

3.1.5 MLT Baskılanmış p(EGDMA-MATrp) Mikrokürelerin Şişme Testi

p(EGDMA-MATrp) mikrokürelerin su alım oranı 15, 30, 45 ve 60 dk süreyle şişme testleri ile saptanmış ve denge şişme oranı % 220 olarak belirlenmiştir. Yüksek şişme oranı mikrokürelerin, sulı ortamda çözünmeyen fakat çapraz bağlanma derecesine bağlı olarak şişen çapraz bağlı hidrojeller olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.4 p(EGDMA-MATrp) mikrokürelerin zamana bağlı % şişme oranları

3.2 MLT Baskılanmış p(EGDMA-MATrp) Mikrokürelerin Adsorpsiyon ve Desorpsiyon Koşullarının İncelenmesi

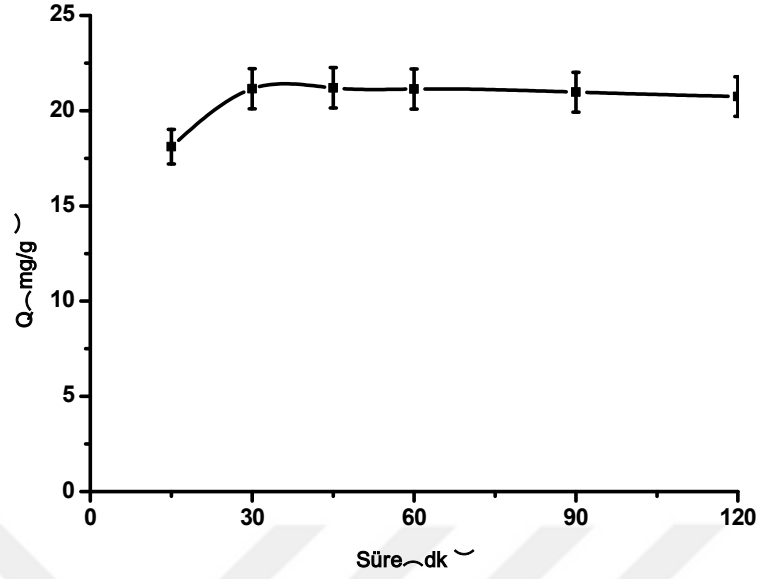
3.2.1 MLT Adsorpsiyonunun Optimizasyonu

MLT en yüksek kapasitede adsorpsiyonunu sağlamak amacı ile süre, derişim, sıcaklık, sorbent miktarı, pH etkisi ve iyon şiddeti gibi parametrelerin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. HPLC ile yapılan analiz sonucu MLT miktarları belirlenerek sonuçlar hesaplanmıştır.

3.2.1.1 MLT Adsorpsiyonuna Sürenin Etkisi

MLT adsorpsiyonu üzerine sürenin etkisini belirlemek amacıyla 5 mL 10 ppm MLT çözeltisi ve 0,01 g p(EGDMA-MATrp) mikroküreleri içeren 6 adet deney tüpü sırasıyla 15-30-45-60-90-120 dk süreyle 25°C sıcaklıkta 150 rpm hızla çalkalayıcıda çalkalanmış ve süre sonunda örnekler 20 dk 10000 rpm hızla santrifüjlenerak MLT derişimleri belirlenmiştir.

Şekil 3.5'ten görüleceğı üzere elde edilen adsorpsiyon kapasitesi (Q) değerlerinde 30. dakikaya kadar adsorplanan melatonin miktarında artış meydana geldiğı, 30. dakikada dengeye ulaştığı gözlenmiştir. MLT baskılanmış p(EGDMA-MATrp) sorbentindeki tüm bağlanma bölgelerinin dolması nedeniyle doygunluğa ulaştığı görülmüştür ve bu sürenin sonrası adsorpsiyon kapasitesinde değışim gözlenmemiştir. Bu nedenle, adsorpsiyon çalışmaları için optimum süre 30 dakika olarak belirlenmiştir.



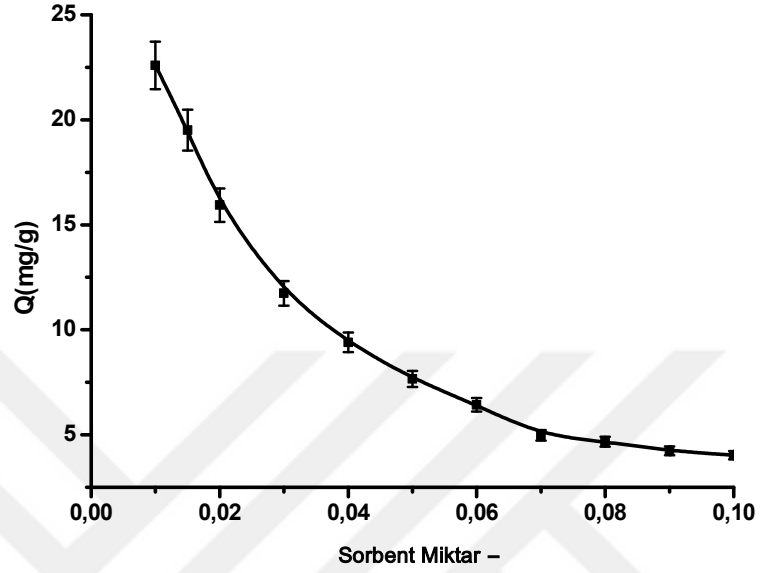
Şekil 3.5 MLT adsorpsiyonuna süre etkisi (Deneysel koşullar: 0,01 g sorbent; 25 °C; 10 ppm MLT)

3.2.1.2 MLT Adsorpsiyonuna Sorbent Miktarının Etkisi

Sorbent miktarının adsorpsiyon üzerindeki etkisini değerlendirmek üzere sentezlenen p(EGDMA-MATrp) afinite sorbentinin; 0,01-0,1 g miktarları üzerine 5 mL 10 ppm MLT çözeltileri eklenerek 30 dk süre ile 25°C sıcaklıkta 150 rpm hızla çalkalayıcıda çalkalanmış ve sonrasında 20 dk 10000 rpm hızla santrifüjlenerek MLT miktarları belirlenmiştir. 0,01 g polimer ile maksimum adsorpsiyon sağlandığı için çalışmaya 0,01 g polimer kullanılarak devam edilmiştir.

Şekil 3.6'ya bakıldığında, sorbent miktarı 0,01 g'dan 0,1 g'a arttırıldığında adsorpsiyon kapasitesinde %82,16 oranında düşüş gözlenmiştir. Ortamdaki sorbent düşük miktarda olduğunda, yeterli sorbent bulunmadığı için birim sorbent başına adsorplanan melatonin miktarı yükselmiştir. Ortamdaki sorbent miktarı yüksek olduğunda ise, ortamdaki sabit melatonin konsantrasyonunda sorbent miktarının arttırılmasıyla MLT baskılanmış p(EGDMA-MATrp) sorbentinin açık uçlarının melatonin ile tam olarak doyurulamadan kalması sonucunda adsorpsiyon kapasite değerinde düşüş gözlenmiştir (Vadivelan ve Vasanth Kumar, 2005).

Bu nedenle, daha yüksek adsorpsiyon kapasitesinin elde edilmesi nedeniyle çalışmalara 0,01 g sorbent ile devam edilmiştir.

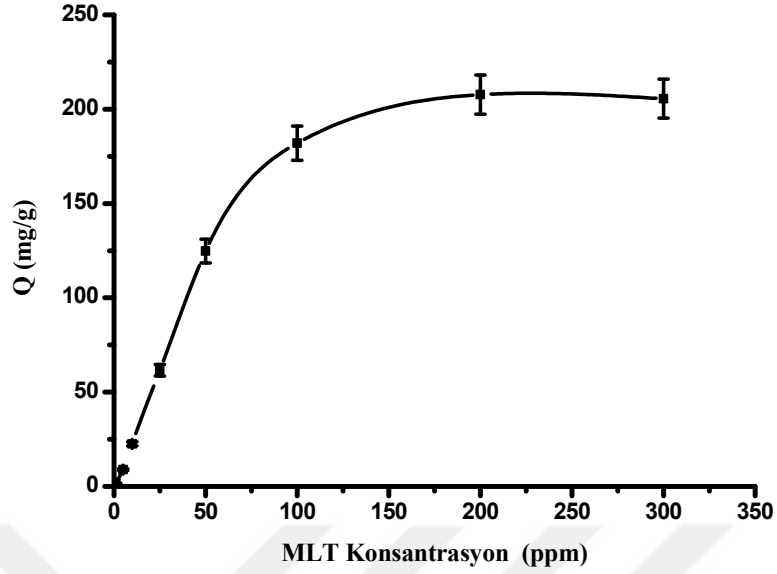


Şekil 3.6 MLT adsorpsiyonuna sorbent miktarı etkisi (Deneysel koşullar: 25°C; 10 ppm MLT, 30 dk çalkalama)

3.2.1.3 MLT Adsorpsiyonuna Başlangıç Derişiminin Etkisi

Derişimin adsorpsiyon üzerindeki etkisini değerlendirmek üzere 1-300 ppm derişim aralığındaki MLT çözeltileri hazırlanmış ve her birine 0,01 g p(EGDMA-MATrp) mikroküreleri eklenmiştir. Her bir tüp 30 dk süre ile 25°C sıcaklıkta 150 rpm hızla çalkalayıcıda çalkalanmış ve sonrasında 20 dk 10000 rpm hızla santrifüjlenerek MLT miktarları belirlenmiştir. Başlangıç derişimi 100 ppm olan melatonin ile polimer doygunluğa ulaşmaktadır.

Şekil 3.7'den görüleceği gibi, çözeltideki başlangıç melatonin konsantrasyonunun artmasıyla, sorbent tarafından birim kütle başına adsorplanan melatonin miktarı artmıştır, 100 ppm melatonin konsantrasyonunda dengeye ulaşmıştır. MLT baskılanmış p(EGDMA-MATrp) mikrokürelerin maksimum adsorpsiyon kapasitesi 207,71 mg/g sorbent olarak belirlenmiştir.

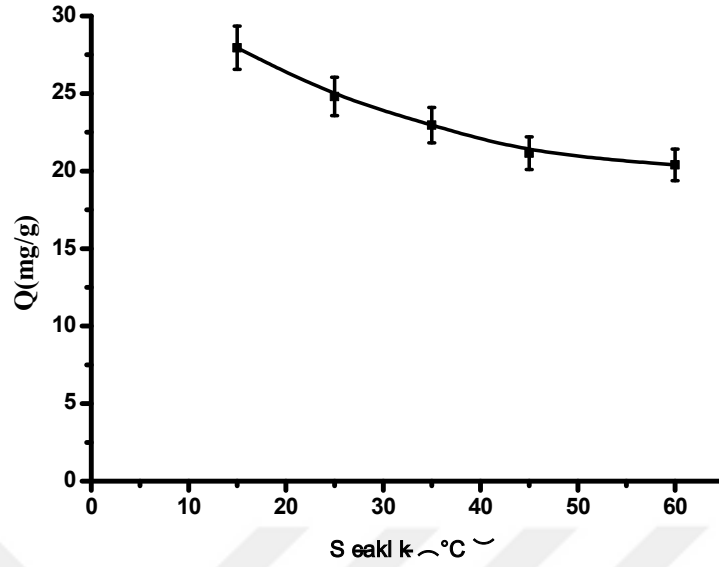


Şekil 3.7 MLT adsorpsiyonuna derişimin etkisi (DeneySEL koşullar: 0,01 g sorbent; 25°C; 30 dk çalkalama)

3.2.1.4 MLT Adsorpsiyonuna Sıcaklık Etkisi

Sıcaklığın adsorpsiyon üzerindeki etkisini değerlendirmek üzere 5 ml 10 ppm MLT çözeltisi ve 0,01 g p(EGDMA-MATrp) mikrokürelere içeren 5 deney tüpü ayrı ayrı sırasıyla 15-60°C sıcaklık aralığında 30 dk 150 rpm hızla çalkalayıcıda çalkalanmış ve sonrasında 20 dk 10000 rpm hızla santrifüjlenerek MLT miktarları belirlenmiştir.

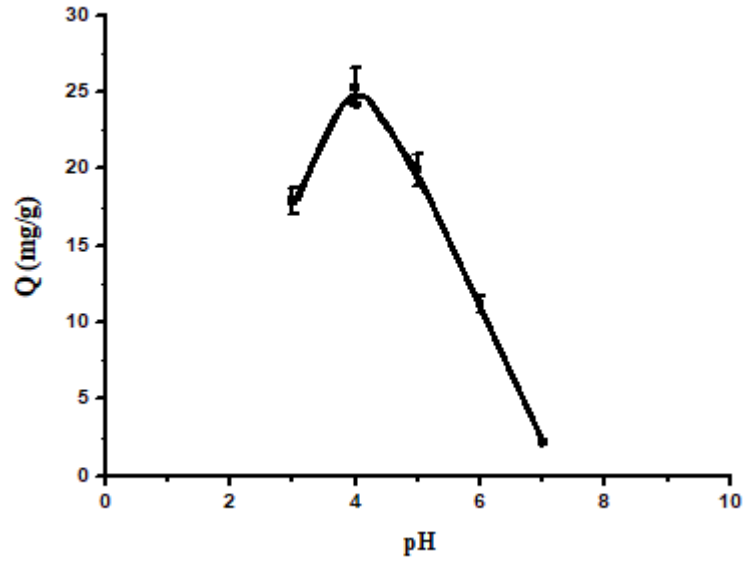
Şekil 3.8'den görüleceği üzere p(EGDMA-MATrp) mikrokürelere MLT adsorpsiyonu sıcaklık 15°C'den 60°C'ye çıkarıldığında %27,02 oranında azalmıştır. Adsorpsiyon teorisine göre, artan sıcaklıkla adsorpsiyon azalır ve yüzeyde tutunan moleküller desorplanma eğiliminde olur. Bu yüzden, adsorpsiyon kapasitesinde artan sıcaklıkla gözlenen bu düşüşün nedeni, adsorpsiyonun ekzotermik doğası olabilir.



Şekil 3.8 MLT Adsorpsiyonuna Sıcaklık Etkisi (Deneysel koşullar, 0,01 g sorbent; 10 ppm MLT; 30 dk çalkalama)

3.2.1.5 MLT Adsorpsiyonuna pH'in Etkisi

pH'in adsorpsiyon üzerindeki etkisini değerlendirmek üzere MLT pH'ı 3,0-7,0 aralığında değişen tampon çözeltiler ile çalışılmıştır. 0,01 g p(EGDMA-MATrp) mikroküreleri üzerine farklı pH değerine sahip tampon çözeltileri eklenerek 30 dk süre ile 25°C sıcaklıkta 150 rpm hızla çalkalayıcıda çalkalanmış ve sonrasında 20 dk 10000 rpm hızla santrifüjlenerek MLT miktarları belirlenmiştir. pH 3,0-4,0 arası MLT adsorpsiyonu artmış, daha yüksek pH değerlerinde ise bir düşüş göstermiş; maksimum adsorpsiyon pH 4'te elde edilmiştir.

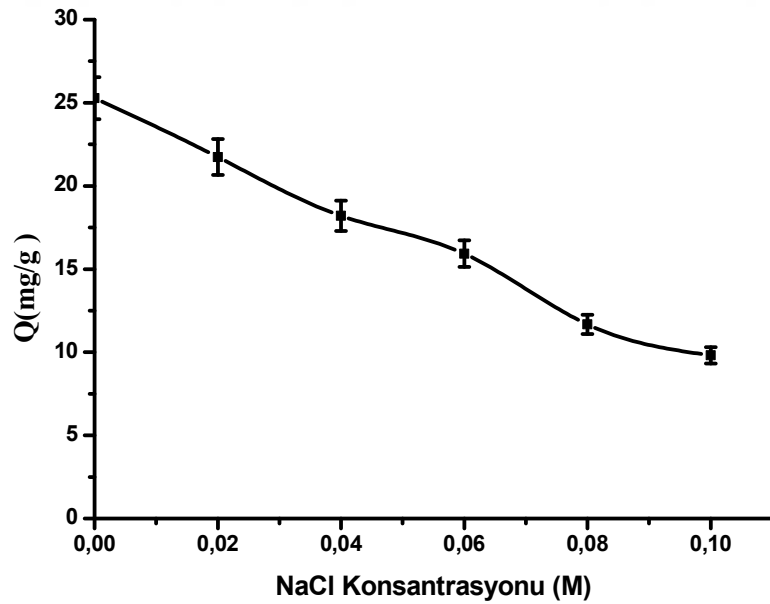


Şekil 3.9 MLT Adsorpsiyonuna pH Etkisi (Deneysel koşullar: 0,01 g sorbent; 25 °C; 10 ppm MLT; 30 dk çalkalama)

Afinite kromatografide bağlanmada baskın olan kuvvetler, hidrojen bağları, dipol-dipol etkileşimleri, elektrostatik etkileşimler, van der Waals etkileşimleri, hidrofobik etkileşimler gibi ikincil etkileşimlerdir. MLT ve MLT baskılanmış p(EGDMA-MATrp) mikroküreleri arasında gerçekleşen bağlanmada baskın olan etkileşimin, hidrofobik etkileşimler olduğu düşünülmektedir. MLT'nin pKa değeri 4,4-4,7 olarak bilinmektedir (Shah ve Hassan, 2012). Bu nedenle, MLT baskılanmış p(EGDMA-MATrp) mikroküreler ve MLT molekülü üzerindeki hidrofobik bölgelerde net yükün sıfır olduğu pH 4,0 civarında daha fazla etkileşim söz konusudur. Daha yüksek ve düşük pH değerlerinde protonasyon ve deprotonasyon nedeniyle yük dengeleri değişmektedir. Bu nedenle pH 4,0'ün altındaki ve üstündeki pH değerlerinde adsorpsiyon kapasitesinde gözlenen düşüşün nedeninin bu durumdan kaynaklanan elektrostatik itme kuvvetleri olabileceği düşünülmektedir.

3.2.1.6 MLT Adsorpsiyonuna İyon Şiddetinin Etkisi

İyon şiddetinin adsorpsiyon üzerindeki etkisini değerlendirmek üzere 10 ppm MLT çözeltisi oluşturacak şekilde 5 mL'lik 0,02; 0,04; 0,06; 0,08 ve 0,1 M NaCl çözeltileri hazırlanmıştır. Her birine 0,01 g p(EGDMA-MATrp) mikroküreleri eklenerek 30 dk süre ile 25°C sıcaklıkta 150 rpm hızla çalkalayıcıda çalkalanmış ve sonrasında 20 dk 10000 rpm hızla santrifüjlenerek MLT miktarları belirlenmiştir. Polimerin MLT adsorpsiyonunda, iyonik şiddet 0,02 M'dan 0,1 M'a çıkarıldığında adsorpsiyon kapasitesi %18 oranında azalmıştır. Tuz konsantrasyonu arttıkça tuz iyonları arasındaki elektrostatik itmeler de artmaktadır. Bu nedenle, melatonin molekülleri arasındaki etkileşimler de artar ve agregasyon ve/veya çökme meydana gelebilir (Vinu et al., 2005). Bu oluşan melatonin agregatları p(EGDMA-MATrp) sorbente adsorpsiyonu ve diğer moleküllerin polimerin iç kesimlerine ulaşmasını engelleyebilir ve bunun sonucunda p(EGDMA-MATrp) sorbente melatonin adsorplama kapasitesi azalabilir.

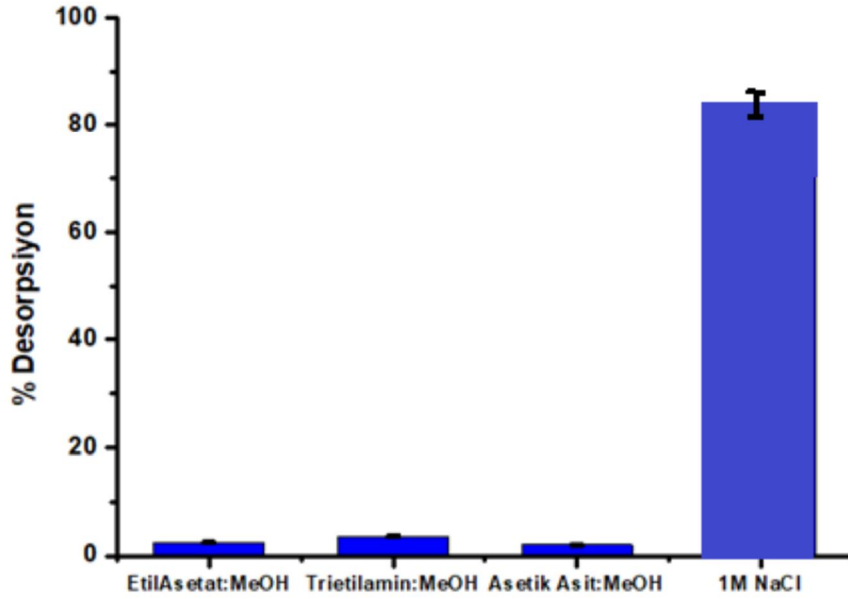


Şekil 3.10 MLT Adsorpsiyonuna İyon Şiddetinin Etkisi (Deneyel koşullar: 0,01 g sorbent; 25 °C; 10 ppm MLT; 30 dk çalkalama)

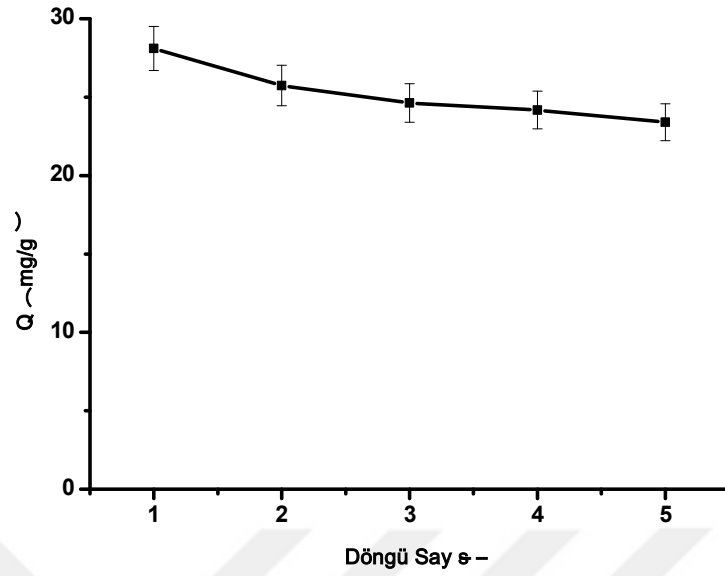
3.2.2 Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

MLT baskılanmış p(EGDMA-MATrp) mikrokürelere adsorplanan melatoninin desorpsiyonu amacıyla Şekil 3.11’de gösterildiği gibi farklı ajanlar ile çalışılmış ve en yüksek desorpsiyon verimi 1 M NaCl kullanılarak elde edilmiştir. MLT adsorplanmış polimer, 1 M NaCl ile 1 saat süre inkübe edilmiş ve süre sonunda desorpsiyon oranı, %85 olarak belirlenmiştir.

MLT baskılanmış p(EGDMA-MATrp) mikrokürelerin tekrar kullanılabilirliğini belirlemek üzere adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü 5 kez tekrarlanmış ve 5 tekrar sonunda adsorpsiyon kapasitesinde sadece %14 oranında bir düşüş gözlemlenmiştir. Her bir döngü sonrasındaki adsorpsiyon kapasiteleri Şekil 3.12’de verilmiştir.



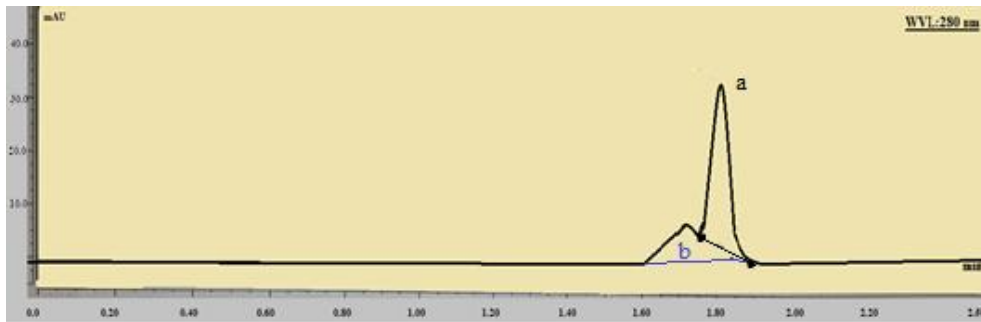
Şekil 3.11 MLT baskılanmış p(EGDMA-MATrp) mikrokürelere adsorplanan MLT’nin desorpsiyonu



Şekil 3.12 MLT baskılanmış p(EGDMA-MATrp) polimerin adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü

3.3 İhlamur Örneklerindeki Melatoninin MLT baskılanmış p(EGDMA-MATrp) Mikrokürelere Adsorpsiyonu

Bölüm 2.5'te belirtildiği gibi hazırlanan ıhlamur örneklerindeki MLT, etilasetat ile ekstraksiyonundan sonra optimize edilmiş koşullar altında MLT baskılanmış p(EGDMA-MATrp) mikrokürelere adsorpsiyon sağlanmıştır. Şekil 3.13'den görüleceği üzere MLT baskılanmış p(EGDMA-MATrp) mikrokürelere ıhlamurda bulunan MLT'nin tamamını adsorplayabildiği belirlenmiştir.



Şekil 3.13 a) İhlamur ekstratı ve b) MLT baskılanmış p(EGDMA-MATrp) mikrokürelere ıhlamur örneğinin adsorpsiyonuna ait kromatogramlar

BÖLÜM DÖRT

SONUÇLAR

Bu çalışmada, kompleks biyolojik matrislerdeki melatoninin önderiştirilmesi, kantitatif tayini ve aynı zamanda izolasyonu amacıyla katı faz kartuşu olarak kullanılabilecek ve radikal başlatıcılı polimerizasyonla hazırlanmış olan MLT baskılanmış p(EGDMA-MATrp) mikroküreler SEM, FTIR ve DTA-TGA analizleri ile karakterize edilmiştir. Daha sonra polimere melatonin adsorpsiyonu için süre, derişim, sıcaklık, pH gibi sistem parametrelerinin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan MLT baskılanmış p(EGDMA-MATrp) polimerler kullanılarak 10 mg gibi çok az miktarda sorbent ile 30 dk gibi kısa sürede melatonin adsorpsiyonunun tamamlanabileceği belirlenmiştir. p(EGDMA-MATrp) polimere baskılanan MLT, 1 M NaCl çözeltisi ile %85 oranında desorbe edilmiş ve oluşan melatonine seçici ve spesifik olan bölgelere baskılanmış p(EGDMA-MATrp) polimere melatonin adsorsiyonu sağlanarak etkin şekilde tekrar kullanılabilirliği belirlenmiştir. Literatürde bitkilerdeki melatonin tayinine yönelik ticari sorbentlerin kullanıldığı birçok çalışma mevcuttur, ancak yeni bir polimerik sorbentin geliştirilmesi ve 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. Bu çalışmada, ıhlamur gibi kompleks bitki örneklerindeki MLT'nin HPLC ile analizi öncesi ekstraksiyonunda kullanılabilecek seçiciliği yüksek, maliyeti düşük bir katı faz sorbenti geliştirilmiş ve başarıyla uygulanmıştır.

Sonuç olarak, bu çalışma ile daha az destek materyali kullanılarak, kısa sürede ve az maliyetle etkin bir şekilde melatonin tayinine olanak sağlayan bir yeni nesil afinite sistemi geliştirilmiştir. Geliştirilen MLT baskılanmış p(EGDMA-MATrp) polimerin biyoteknolojik çalışmalarda uygulama bulabileceği ve ayrıca polimerin tekrar kullanılabilirliğinin olması geniş ölçekli biyoteknolojik uygulamalarda ekonomik avantaj sağlayabileceği söylenebilir.

KAYNAKLAR

- Alkan H., Bereli N., Baysal Z., Denizli A., 2009, Antibody purification with protein A attached supermacroporous poly (hydroxyethyl methacrylate) cryogel, *Biochemical Engineering Journal*, 45, 201-208.
- Altıntaş E.B., Denizli A., 2006, Efficient removal of albumin from human serum by monosize dye-affinity beads, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 832, 216-223.
- Anspach F.B., 2004, Fundamentals and applications of chromatography and related differential migration methods; part A: fundamentals and techniques, *Journal of Chromatography Library*, 69(A), 139-169.
- Arshady R., Mosbach K., 1981, Synthesis of substrate-selective polymers by host-guest polymerization, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 182: 687–692.
- Asghari M.H., Moloudizargari M., Ghobadi E., Fallah M., Abdollahi M., 2017, Melatonin as a multifunctional anti-cancer molecule: Implications in gastric cancer, *Life Sciences*, 185, 38–45.
- Arendt J., 1988, Melatonin, *Clinical Endocrinology*, 29:205-229.
- Arendt J., Aldhous M., Wright J., 1988, Synchronisation Of A Disturbed Sleep-Wake Cycle In A Blind Man By Melatonin Treatment, *The Lancet*, 331, 8588, 772-773.
- Babaç C., Yavuz H., Galaev I.Y., Pişkin E., Denizli A., 2006, Binding of antibodies to concanavalin A-modified monolithic cryogel, *Reactive and Functional Polymers*, 66, 1263-1271.

- Bereli N., Akgöl S., Yavuz H., Denizli A., 2005, Antibody purification by concanavalin A affinity chromatography, *Journal of Applied Polymer Science*, 97, 1202-1208.
- Celinski K., Konturek., Konturek S., Slomka M., Cichoz-Lach H., Brzozowski T., et al., 2011, Effects of melatonin and tryptophan on healing of gastric and duodenal ulcers with helicobacter pylori infection in humans, *Journal of Physiology and Pharmacology*, 62(5), 521-6.
- Chapuis F., Pichon V., Hennion M.C., 2004, Molecularly Imprinted polymers: Developments and applications of New selective Solid-Phase Extraction Materials. *LC-GC Europe*, 17(7), 408-417
- Chegini B., Ehrhart-Hofmann A., Kaider and F. Waldhauser., 1995, Direct enzyme-linked immunosorbent assay and a 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 Chinese medicinal herbs. *Life Sciences*, 73, 19-26.
- Cormack P.A.G., Elorza A.Z., 2004. Molecularly Imprinted Polymers: Synthesis And Characterisation, *Journal Chromatography B*, 804, 173-182.
- Cormack P.A.G., Mosbach K., 1999, Molecular Imprinting: Recent Developments and the Road Ahead. *Reactive and Functional Polymers*, 41, 115-124.
- Dolberg, O.T., Hirschmann, S., Grunhaus, L., 1998, Melatonin for the treatment of sleep disturbances in major depressive disorder, *American Journal of Psychiatry*, 155(8), 1119-21.

Dubbels R, Reiter RJ, Klenke E, Goebel A, Schnakenberg E, Ehlers C, Schiwara HW, Schloot W. 1995, Melatonin in edible plants identified by radioimmunoassay and by high performance liquid chromatography-mass spectrometry, *Journal of Pineal Research*, 18, 28-31.

Ganguly K., Sharma A.V., Reiter R.J., Swarnakar S., 2010, Melatonin promotes angiogenesis during protection and healing of indomethacin-induced gastric ulcer: role of matrix metaloproteinase-2, *Journal of Pineal Research*, 49(2), 130–140.

Goldfaden G., Goldfaden R., 2010, Getting Your Beauty Sleep with Topical Melatonin, *Life Extension Magazine*.

Hattori, A., Migita, H., Iigo, M., Itho, M., Yamamoto, K., Ohtanikaneko, R., Hara, R., Suzuki, T., 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(3), 627-34.

Haupt, K.; Mosbach K., 2000, Molecularly Imprinted Polymers and Their Use in Biomimetic Sensors, *Chemical Reviews*, 100, 2495–2504.

Jan J.E., Freeman R.D., Fast D.K., 1999, Melatonin treatment of sleep–wake cycle disorders in children and adolescents, *Developmental Medicine & Child Neurology*, 41, 491-500.

Jaworek J., Brzozowski T., Konturek S.J., 2005, Melatonin as an organoprotector in the stomach and the pancreas, *Journal of Pineal Research*, 38(2), 73–83.

Jian L., Chunchan Z., Yaoxiang G., Xiaojun Z., Xican L., 2012, A validated HPLC method for determining melatonin in capsule dosage form, *Spatula DD*, 2(3), 147-151.

- Kandimala V.B., Ju H., 2004, Molecular imprinting: a dynamic technique for diverse applications in analytical chemistry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 380, 587-605.
- Karbownik M., Reiter R. J., 2000, Antioxidative Effects of Melatonin in Protection Against Cellular Damage Caused by Ionizing Radiation, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 225(1), 9-22.
- Koca Çalışkan U., Aka C., Bor E., 2017, Melatonin in Edible and Non-Edible Plants, *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14(1), 75-83.
- Lee C.R., Esnaud H., 1988, Determination of melatonin by GC-MS: Problems with solid phase extraction (SPE) columns, *Biological Mass Spectrometry*, 15, 12, 677-679.
- Lekic T., Hartman R., Rojas H., et al., 2010, Protective effect of melatonin upon neuropathology, striatal function, and memory ability after intracerebral hemorrhage in rats, *Journal of Neurotrauma*, 27, 627–637.
- Lissoni P., Barni S., Mandala M., Ardizzoia A., Paolorossi F., Vaghi M., Longarini R., Malugani F., Tancini G., 1999, Decreased toxicity and increased efficacy of cancer chemotherapy using the pineal hormone melatonin in metastatic solid tumour patients with poor clinical status, *European Journal of Cancer*, 35(12), 1688-92.
- Lowe C.R., 1996, Affinity chromatography and related techniques: perspectives and trends, *Advances in Molecular and Cell Biology*, 15, 513-522.
- Maestroni G.J.M., 1993, The immunoneuroendocrine role of melatonin, *Journal Of Pineal Research*, 14, 1-10.

- Mayes A.G., Mosbach K., 1997, Molecularly imprinted polymers: useful materials for analytical chemistry, *Trends in Analytical Chemistry*, 16(6), 321.
- Mefford I.N., 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 Chromatography*, 181, 187-193.
- Miles A, Philbrick DRS, Tidmarsh SF, Shaw DM., 1985, Direct radioimmunoassay for Stimulated melatonin in saliva [Letter], *Clinical Chemistry*, 31, 1412-3.
- Molinelli A., 2004, Molecular imprinted polymers: Towards a rational understanding of biomimetic materials, Georgia institute of technology-In partial fulfillment of the requirement for the degree doctor of philosophy in chemistry, Doktora Tezi, Atlanta.
- Murch S.J., Simmons C.B., Saxena P.K., 1997, Melatonin in fever few and other medicinal plants, *The Lancet*, 350, 9091, 1598-1599.
- Nguyen T. H., Ansell R.J. 2011, N-isopropylacrylamide as a functional monomer for noncovalent molecular imprinting, *Journal of Molecular Recognition*, 25, 1–10.
- Nicholls I.A., Rosengren J.P., 2002, Molecular imprinting of surfaces, *Bioseparation*, 10 (6), 301-5.
- Nomachi M., Kubo T., Hosoya K., 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, 6, 1291.

- Ohashi Y., Okamoto N., Uchida K., Iyo M., Mori N., Morita Y., 1999, Daily rhythm of serum melatonin levels and effect of light exposure in young and elderly healthy subjects, *Biological Psychiatry*, 45(12), 1646-1652.
- Osman B., Tümay Özer E., Demirbel E., Güçer Ş., Beşirli N., 2013, Synthesis and characterization of L-tryptophan containing microbeads for removal of dimethyl phthalate from aqueous phase, *Separation and Purification Technology* 109, 40-47.
- Öncel Ş., Uzun, L., Garipcan B., Denizli A., 2005, Synthesis of phenylalaninecontaining hydrophobic beads for lysozyme adsorption, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 44 (18), 7049-7056.
- Özcan, A.A., Say, R., Denizli, A., Ersöz, E. 2006, L-histidine imprinted synthetic receptor for biochromatography applications, *Analytical Chemistry*, 78, 7253-7258.
- Pandi-Perumal S.R., BaHammam A.S., Brown G.M., et al., 2013, Melatonin antioxidative defense: therapeutical implications for aging and neurodegenerative processes, *Neurotoxicity Research*, 23, 267–300.
- Pardeshi, S.; Dhodapkar, R.; Kumar, 2014, Molecularly imprinted microspheres and nanoparticles prepared using precipitation polymerisation method for selective extraction of gallic acid from *Emblica officinalis*, *Food Chemistry*, 146, 385–393.
- Peniston-Bird J.F., Di W., Street C.A., Kadva A., Stalteri M.A., Silman R.E., 1993, HPLC Assay Of Melatonin In Plasma With Fluorescence Detection, *Clinical Chemistry*, 39, 2242-2247.

Plebani M., Masiero A.R., Burlina M.L., Chiozza M., Scanarini and A. Burlina, 1990, Measurement of melatonin in blood by radioimmunoassay, *Childs Nervous System*, 6, 220-221.

Raynaud F. and Pivet P., 1991, Determination of 5-methoxyindoles in pineal gland and plasma samples by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *Journal of Chromatography*, 564, 103-113.

Reiter R.J., 1980, The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals, *Endocrine Reviews*, 1, 109-131.

Reiter R.J., Britt H., Armstrong J.D., 1987, Absence of a nocturnal rise in either norepinephrine, N-acetyltransferase, hydroxyindole-O-methyltransferase or melatonin in the pineal gland of the domestic pig kept under natural environment photoperiods, *Neuroscience Letters*, 81, 171-176.

Reiter, R.J., 1991, Melatonin: The chemical expression of darkness, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 79 (1-3), C153-8.

Reiter R.J., Pablos M., Agapito T. T., Guerrero J. M., 1996, Melatonin in the context of the free radical theory of aging, *Annals of the New York Academy of Science*, 786, 362.

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

Reiter R.J., 1973, Comparative physiology: pineal gland, *Annual Review Of Physiology*, 35, 305-328.

- Sagara Y., Okatani Y., Yamanaka S., Kiriya T., 1988, Determination of plasma 5-hydroxytryptophan, 5-hydroxy-tryptamine, 5-hydroxyindoleacetic acid, tryptophan and melatonin by high performance liquid chromatography with electrochemical detection, *Journal of Chromatography*, 431, 170–176.
- Sanders DC, Chaturvedi AK, Hordinsky JR ,1999, Melatonin: aeromedical, toxicopharmacological, and analytical aspects, *Journal of Analytical Toxicology*, 23, 159-167.
- Sellergren B. (Ed.), 2001, Molecularly Imprinted Polymers. Man Made Mimicsof Antibodies and Their Applications in Analytical Chemistry, *Elsevier Science-Amsterdam*.
- Shah S.M. ve Hassan D., 2012, Controlled-release melatonin composition and related methods, Patent No: WO 2012103411 A2.
- Sieghart W., Ronca E., Drexler G., and Karall S., 1987, Improved radioimmunoassay of melatonin in serum, *Clinical Chemistry*, 33, 604-605.
- Simonin G., Bru L., Lelièvre E., Jeanniot J.P., Bromet N., Walther B., 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.
- Shea KJ., Dougherty TK., 1986, Molecular recognition on synthetic amorphous surfaces: the influence of functional group positioning on the effectiveness of molecular recognition, *Journal of the American Chemical Society*, 108, 1091-1093.

- Sturmer Q., Lynch H.J., Deng M.H., Gleason R.E., Wurtman R.J., 1990, Melatonin levels in body fluids of SIDS infants, *Forensic Science International*, 45, 171-180.
- Subrahmanyam S., Guerreiro A., Poma A., Moczko E., Piletska E., Piletsky S., 2013, Optimisation of experimental conditions for synthesis of high affinity MIP nanoparticles, *European Polymer Journal*, 49, 100–105.
- Touitou Y., 2001, Human aging and melatonin, *Clinical relevance Experimental Gerontology*, 36, 1083-1100.
- Watanabe H, Kobayashi T, Meibou T, Sekiguchi Y, Uchida K, Aoki T, Cyong JC., 2002, Effects of Kampo herbal medicine on plasma melatonin concentration in patients, *The American Journal of Chinese Medicine*, 30, 65-71.
- Wilchek M., Miron T., 1999, Thirty years of affinity chromatography, *Reactive and Functional Polymers*, 41, 263-268.
- Wu Y.H., Swaab D.H., 2005, The human pineal gland and melatonin in aging and Alzheimer's disease, *Journal of Pineal Research*, 38, 145–152.
- Wulff G., Grobe-Einsler R., Vesper W., Sahran A., 1977, Enzyme-analogue built polymers, 5. On the specificity distribution of chiral cavities prepared in synthetic polymers, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 178, 2817-2825.
- Wurzbarger RJ., Kawashima K., Miller RL., Spector S., 1976, Determination of rat pineal gland melatonin content by a radioimmunoassay, *Life Sciences*, 18, 867–877.
- Vieira R., Miguez J., Lema M., Aldegunde M., 1992, Pineal and plasma melatonin as determined by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *Analytical Biochemistry*, 205, 300-305

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

Yie SM., Johansson E., Brown GM., 1993, Competitive solidphase enzyme immunoassay for melatonin in human and rat serum and rat pineal gland, *Clinical Chemistry*, 39, 2322–2325.

Yu C. ve Mosbach K., 1997, Molecular imprinting utilizing an amide functional group for hydrogen bonding leading to highly efficient polymers, *Journal of Organic Chemistry*, 62, 4057–4064.