

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KAPİLER ELEKTROFOREZ-ÖRNEK SIKIŞTIRMA YÖNTEMİ İLE
MELATONİNİN (UYKU HORMONU) TAKVİYE TABLETLERİNDE VE GIDA
ÖRNEKLERİNDE TAYİNİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ezgi KIZILKONCA

Kimya Anabilim Dalı

Kimya Programı

OCAK 2013

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KAPİLER ELEKTROFOREZ-ÖRNEK SIKIŞTIRMA YÖNTEMİ İLE
MELATONİNİN (UYKU HORMONU) TAKVİYE TABLETLERİNDE VE GIDA
ÖRNEKLERİNDE TAYİNİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Ezgi KIZILKONCA
509111014**

Kimya Anabilim Dalı

Kimya Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. F. Bedia ERİM BERKER

OCAK 2013

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 509111014 numaralı Yüksek Lisans / Doktora Öğrencisi **Ezgi KIZILKONCA**, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “**KAPİLER ELEKTROFOREZ-ÖRNEK SIKIŞTIRMA YÖNTEMİ İLE MELATONİNİN (UYKU HORMONU) TAKVİYE TABLETLERİNDE VE GIDA ÖRNEKLERİNDE TAYİNİ**” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. F. Bedia ERİM BERKER**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Ayşen YARAT**
Marmara Üniversitesi

Doç. Dr. Nevin ÖZTEKİN
İstanbul Teknik Üniversitesi

Teslim Tarihi : **17 Aralık 2012**
Savunma Tarihi : **17 Ocak 2013**

Aileme,

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince benden yardımını ve desteğini esirgemeyen, tez çalışmamda akademik bilgisini ve tecrübesini benimle paylaşan saygıdeğer hocam Prof. Dr. F. Bedia ERİM BERKER'e teşekkürü bir borç bilirim. Laboratuvar çalışmalarımın her aşamasında bana içtenlikle yardımcı olan Araş. Gör. Sesil Uzaşçı'ya , Çalışma ortamında güzel günleri paylaştığımız Araş. Gör. Filiz Tezcan Tekeli'ye, Ebru Çelik'e ve Esin Kaftanoğlu'na, Çağdaş yapısı, bilime ışık tutan çalışmaları ve çok değerli eğitim kadrosu ile her zaman gurur duyduğum, beni yetiştiren üniversiteme, İTÜ'deki yıllarımı tebessümle hatırlayacak olmamı sağlayan Dilek Suadiye'ye ve sevgili arkadaşlarıma, Her zaman desteğiyle yanımda olan Burak Duran'a, Yürüdüğüm yolda güvenle adımlar atmamı sağlayan, beni bugünlere getiren aileme, Sevgi ve saygılarımı sunarım.

Ocak 2013

Ezgi Kızılkonca
Kimyager

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	vii
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMALAR	xi
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xv
ÖZET.....	xvii
SUMMARY	xix
1. GİRİŞ	1
2. KAPİLER ELEKTROFOREZ	3
2.1. Kapiler Elektroforez Temel Prensipleri	3
2.2 Elektroosmotik Akış.....	4
2.2.1 Elektroosmotik akış hızı ve göç süreleri	5
2.2.2 Elektroosmotik akış hızını etkileyen faktörler	6
2.2.2.1 Elektrik alanı	6
2.2.2.2 pH.....	6
2.2.2.3 İyonik şiddet.....	6
2.2.2.4 Sıcaklık.....	7
2.2.2.5 Organik modifiye edici madde ilavesi	7
2.2.2.6 Kapiler kolonlarının polimerik maddelerle kaplanması.....	7
2.2.2.7 Yüzey aktif madde ilavesi	7
2.3 Kapiler Elektroforezde Analitik Parametreler	7
2.3.1 Ayırma etkinliği	7
2.3.2 Pik genişlemesi.....	8
2.3.3 Rezolüsyon	9
2.4 Kapiler Elektroforez Cihaz Bileşenleri	9
2.4.1 Kapiler kolon.....	9
2.4.2 Enjeksiyon yöntemleri	10
2.4.2.1 Hidrodinamik enjeksiyon.....	10
2.4.2.2 Elektrokinetik enjeksiyon	10
2.4.2.3 Örnek sıkıştırma.....	11
2.4.3 Elektrotlar.....	11
2.4.4 Voltaj kaynağı	11
2.4.5 Dedektörler.....	12
2.4.5.1 UV dedektör	12
2.5 Kapiler Elektroforez Çeşitleri	13
2.5.1 Kapiler zon elektroforez (CZE)	13
2.5.2 Kapiler jel elektroforez (CGE).....	13
2.5.3 Kapiler izotakoforez (CITP)	13
2.5.4 Kapiler izoelektrik odaklama (CIEF).....	13
2.5.5 Kapiler elektrokromatografi (CEC)	13
2.5.6 Misel elektrokinetik kromatografi (MEKC)	14

3. MELATONİN	17
3.1 Melatoninin Molekül Yapısı ve Sentezi	17
3.2 Melatonin Hormonunun İnsan Vücuduna Etkileri	19
3.3 Melatonin Analizleri	21
3.3.1 Gıdalarda melatonin tayini	22
4. DENEYSEL KISIM	25
4.1 Kullanılan kimyasallar ve Çözeltilerin Hazırlanması.....	25
4.2 Cihazlar ve Enjeksiyon Koşulları	25
4.3 Misel Elektrokinetik Kromatografi Koşulları	26
4.4 Örnek Sıkıştırma Yöntemi	26
5. SONUÇLAR	27
5.1 MEKC Yöntemi ile Melatonin Tayini.....	27
5.1.1 Ayırma şartlarının seçimi	27
5.1.2 MEKC yöntemi ile takviye tabletlerinde melatonin miktar tayini	27
5.1.2.1 Kalibrasyon grafiğinin oluşturulması.....	28
5.1.2.2 Miktar Tayini.....	28
5.2 MEKC Örnek Sıkıştırma Yöntemi İle Melatonin Tayini	29
5.2.1 Ayırma şartlarının seçimi	29
5.2.2 Örnek sıkıştırma yöntemi ile hardal tohumunda melatonin tayini	30
6. TARTIŞMA VE YORUM	33
KAYNAKLAR	35
ÖZGEÇMİŞ	43

KISALTMALAR

MEKC	: Misel Elektrokinetik Kromatografi
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
LOD	: Tayin Sınırı (Limit of Detection)
GC-MS	: Gaz kromatografi-Kütle Spektrometresi
HPLC	: Yüksek Bacınçlı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography)
UV-GB	: Ultraviyole-Görünür Bölge
RIA	: Radyoimmunoassay
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
CE	: Kapiler Elektroforez
EOA	: Elektroosmotik Akış
CZE	: Kapiler Zon Elektroforez
CGE	: Kapiler Jel Elektroforez
CITP	: Kapiler İzotakoforez
CIEF	: Kapiler İzoelektrik Odaklama
CEC	: Kapiler Elektrokromatografi
ECD	: Elektrokimyasal Dedektör
LIF	: Lazer İndüklenmiş Florosans Dedektör

ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1 : CE’de detektör türleri.....	13
Çizelge 3.1 : Melatonin analizlerinde çalışılmış CE yöntemleri ve LOD değerleri. .	22
Çizelge 3.2 : Gıdalarda melatonin miktarları.	23
Çizelge 5.2: MEKC ile takviye tabletlerinde Melatonin tayinine ait geri kazanım değerleri	29

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : Elektroosmotik akış gösterimi.....	4
Şekil 2.2 : (a) Elektroosmotik akış (b) Parabolik akış.	5
Şekil 2.3 : Yüklü taneciklerin geliş sıraları.	6
Şekil 2.4 : Kapiler elektroforez cihazı şematik gösterimi.....	9
Şekil 2.5 : Sulu fazda bir miselin görünüşü.	14
Şekil 3.1 : Melatonin.	17
Şekil 3.2 : Melatonin sentezi	19
Şekil 5.1 : Melatonin kalibrasyon grafiği	28
Şekil 5.2 : Takviye tableti elektroferogram	29
Şekil 5.3 : 6 saniye ve 48 saniye örnek enjeksiyonuna ait elektroferogramlar	30
Şekil 5.4 : Hardala ait elektroferogram (a) Hardal örneğinin kendisine ait pik (b)Hardal örneği + melatonin spike piki.	31
Şekil 5.5 : Standart ekleme grafiği	31

KAPİLER ELEKTROFOREZ-ÖRNEK SIKIŞTIRMA YÖNTEMİ İLE MELATONİNİN (UYKU HORMONU) TAKVİYE TABLETLERİNDE VE GIDA ÖRNEKLERİNDE TAYİNİ

ÖZET

Melatonin ilk kez Lerner ve arkadaşları tarafından 1958’de keşfedilen, memeli hayvanlarda pineal bez tarafından sentezlenen ve bitkilerde de bulunan, indolamin türevi bir hormondur. Melatonin pineal salgı bezinin, retina tarafından uyarılmasıyla karanlıkta salgılanır bu yüzden uyku hormonu olarak adlandırılır.

Melatoninin insan vücudunda pek çok fiziksel etkileri bulunmaktadır. Uykuya dalış hızını, uyku kalitesini, süresini ve vücudun biyolojik saatini dengeleyen melatoninin aynı zamanda depresyon gibi duygu-durum bozukluklarında da yapıcı etkileri vardır. Üreme sistemi, solunum sistemi, dolaşım sistem ve immün sisteme etki eden melatoninin en önemli özelliklerinden biri güçlü antioksidan olma özelliği taşımasıdır. Serbest radikallerle ilişkiye giren ve çeşitli antioksidatif enzimleri de stimüle eden melatonin pek çok antioksidan vitamin ve minerallerden daha fazla etkili olabilir. Pineal bezde depolanmayan ve salınımıyla birlikte kana karışan melatonin, suda ve yağda kolay çözünen bir molekül olmasından ötürü hücre zarlarından kolayca geçerek hücrelere ve hücre organellerine hızla ulaşır. Bu özelliği ile güçlü bir antioksidan olan melatonin, lipidlerin, proteinlerin ve DNA’nın serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunmasında oldukça etkilidir.

İnsan vücudunda çeşitli yararları olan melatonin pineal bezden salgılanacağı gibi takviye tabletleri ile de alınabilir. Bitkilerdeki miktarları oldukça düşük olmakla birlikte çeşitli gıdalarla da vücuda alınabilen melatonin analizleri araştırma dünyasında önemli yer tutmaktadır.

Denenen pek çok metot melatoninin çeşitli analiz zorluklarından ötürü yetersiz kalabilmektedir. Bunun için melatonin analizlerinde yeni yöntemler geliştirilmelidir.

İyonların farklı yük/büyükölük oranlarına göre ayrılması prensibine dayanan kapiler elektroforez yöntemi, az örnek hacmi gerektirmesi, hızlı ayırma sağlaması, ve yüksek ayırma etkinliğı gibi pek çok avantajı bakımından diğler yöntemlere göre üstünlük sağlamaktadır.

Yapılan çalışmada melatonin analizi için kapiler elektroforez cihazında misel elektrokinetik kromatografi (MEKC) yöntemi ile çalışılmıştır. Melatoninin MEKC yöntemi ile ayrılmasında, ayırma ortamında kullanılan yüzey aktif madde sodyumdodesilsülfat (SDS) konsantrasyonu, tampon çözelti olarak seçilen fosfat konsantrasyonu, ortamın pH’ı, uygulanan voltaj değıştirilerek pik simetrisi, pik tespit sınırı, geliş süresi açısından optimal ayırma şartları sağlanmıştır. Denemeler sonucu, melatonin ayrılmasında en uygun ayırma şartlarının, tampon ortamı olarak pH 3’te 30 mM fosfat ve 70 mM SDS çözeltisi , -30 kV voltaj, 50 mBar basınçla 6 saniye örnek enjeksiyonu olduğı tespit edilmiştir. Bu optimal şartlar altında yöntemin

melatonin için tayin sınırı (LOD) 0.298 µg/mL olarak tespit edilmiştir ve bu yöntem ile melatoninin takviye tabletlerindeki miktarı bulunmuştur.

Yöntemin tayin sınırı gıdalardaki melatonin miktarının tespiti için yeterli olmadığından, LOD değerini düşürmek amacıyla örnek sıkıştırma-MEKC yöntemi denenmiştir. Çalışılan yöntemde örnekler 10 mM SDS çözeltisi içinde hazırlanarak, 48 saniye hidrokinamik enjeksiyon ile 50 mBar basınçta enjekte edilmişlerdir. Örnek sıkıştırma-MEKC yöntemi ile 28,8 ng/mL tayin sınırına kadar inilmiş ve melatoninin beyaz hardal tohumunda miktarı tespit edilmiştir. Uygulanan yöntemlerin validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş ve tatmin edici sonuçlar alınmıştır.

MELATONIN ANALYSIS WITH CAPILLARY ELECTROPHORESIS- SAMPLE STACKING METHOD AND DETERMINATION OF MELATONIN IN SUPPLEMENT DRUGS AND FOOD SAMPLES

SUMMARY

Melatonin, a neurohormone produced in vertebrates by pineal gland and retina, has been intensively investigated over past years with regard to its several interesting biological properties. It was an indoleamine which discovered and isolated in 1958 by Lerner et al. The indole is derived from tryptophan and in all vertebrates is mainly synthesized by the pineal gland.

In mammals melatonin is a potent sleep-inducing mediator and modulates seasonally reproductive cycles in some mammals. Once released, melatonin can act on different organs through specific receptors and directly on the hypothalamus influencing the circadian rhythms. For this reason melatonin is considered to be potentially useful in the management of various forms of insomnia and sleep disorders.

Melatonin has several physiological functions including a role as immunomodulator and as neuroprotective agent in Alzheimer and Parkinson's disease models. It also has possible role in metal regulation in central nervous system and could form complexes with aluminum, cadmium, copper, iron and other metals.

Melatonin is also reported to be a potent free radical scavenger and broad-spectrum antioxidant. In addition melatonin detoxifies a variety of free radicals and reactive oxygen intermediates, including the hydroxyl radical, the peroxy nitrite anion, singlet oxygen and nitric oxide. Melatonin has been shown to synergize with vitamins C and E among others to reduce free radical damage. It overcomes cardiac hypertrophy and oxidative alterations associated with treatment of hyperthyroidism.

Besides these effects, several possibilities for the use of melatonin in therapy should also be taken into account, including jet-lag, co-treatment in cancer patients, depressive disorders, tumors and oral contraception. Recent investigations suggest that melatonin treatment could improve sex life, fight the ravages of AIDS and slow aging. There are only a few side effects such as nightmares, hypertension, sleep disorders, abdominal pain.

Melatonin consumed in plant products is absorbed, enters the circulation and could have physiological effects via receptor or non-receptor mediated processes. The relation between diet and health has developed an intense research in bioactive compounds in foods. Moreover the increased performance of techniques makes the elucidation of more and more chemical structures possible. There is consensus in the scientific community that the whole diet has a larger impact on health than one single food component. This is the reason that melatonin, one of the biological activate component, has a wide research area in food analysis.

In addition to this, for its therapeutically properties, melatonin has been praised as a panacea leading to great increase in pharmaceutical preparations containing this drug and consequently, the need to have analytical methods available for quality control is even greater.

During the 1970s, melatonin analysis was carried out basically by bioassay, radio-immunoassay and by fluorometric methods. Analysis of melatonin has focused research attention and in the last 40 years several analytical methods have been developed. Some of these methods are GC-MS with derivization of melatonin, HPLC with fluorescence, electrochemical, UV and MS detector.

However, some of these methods have good sensitivity and low LOD values, they have some disadvantages such as high cost, need to derivization or preconcentration of samples, and taking long analyze times. Besides that, analysis of melatonin has own difficulties. Its amphipatic molecule characteristic makes difficult it to choose a solvent yielding a complete recovery and accurate results. Secondly, because of its potent antioxidant property, it reacts quickly with other food constituents and need careful handling of the sample is thus a prerequisite. Third, concentration of melatonin in some samples is too low, so that analysis of it can be impossible with some methods.

Recently also capillary electrophoresis has been applied in melatonin separation and determination. High efficiency, minimal sample volume and relatively short analysis time make CE an important separation technique, especially in bioanalysis.

This technique based on the movement of sample ions under the influence of an applied voltage. The ion will move toward the appropriate electrode and pass through the detector. The migration rate, or mobility of the solute ion is governed largely by its size and number of ionic charges.

A typical CE system consist a high voltage supply which generates potential from -30 kV to +30 kV, a capillary columns, generally are composed of fused silica with dimensions 25-100 μm wide and 25-100 cm long, and a detector. Sample injections can be hydrodynamic (driven by a pressure difference over the capillary) or electrokinetic (by applying a voltage).

There are some kinds of capillary electrophoresis techniques: capillary zone elctrophoresis, micellar electrokinetic chromatography, capillary gel electrophoresis, isoelectric focusing, isotachophoresis in capillaries and electro chromatography.

Uncharged molecules can be separated by means of micellar electrokinetic chromatography (MEKC). Detergents are added to the buffer and neutral molecules distribute themselves between the buffer and the micelles according to their hydrophobicity. Separation is based on the mobility of the most negatively charged micelles and the transport of the solutes outside the micelles via the electroosmotic flow (EOF). This involves a partition process so that one is dealing with a real chromatographic method .In this case too, the solutes are separated from each other by electrolyte. The range of separation lies between the compounds that do not reside within the micelles and hence migrate with EOF, and those that are permanently enclosed within the micelles.

In this study, a new method for melatonin analyses with MEKC-UV detection was developed and optimal conditions were achieved using a system consisting of 70 mM SDS in phosphate buffer (30 mM, pH 3). The sample solutions were injected into capillary by a pressure of 50 mbar for 6 s. The instrument was operated at -30 kV

and at 25 °C. The calibration curve, reproducibility, recovery and limit of detection were examined and validation of the method was performed. The LOD of the method was calculated as 0.298 µg/mL and the amount of melatonin in supplement drugs was analyzed with this method.

The LOD value of the that method is not enough low to determine the melatonin in food samples. Thus, sample stacking- MEKC method was developed under same buffer and instrument conditions.

Sample stacking occurs when the conductivity of the injected sample is lower than that of the surrounding buffer, and hence results in concentration of the analyte zone. The reason for the narrowing of the analyte zone can be attributed to the fact that the electric field depends inversely on the specific conductivity, higher electrical field at lower conductivity. Therefore, the electric field strength increases in the sample zone of lower conductivity. The electrophoretic velocity increases at the higher field and hence the analyte zone becomes narrower between the sample solution zone and buffer zone. This effect, described as stacking, can be utilized in both hydrodynamic and electrokinetic injections to enhance efficiency.

For applying sample stacking-MEKC method to melatonin analyses, sample solutions are prepared with lower concentration solution of the buffer solution and ejected to the system with 50 mbar pressure for 48 s. Method validations were performed and reached the LOD of 28,8 ng/mL. Under these stacking conditions melatonin amounts in white mustard seeds was examined. 84, 29 ng/g melatonin was found in white mustard seeds.

Results show that, the methods, were developed for analyzing melatonin, have satisfied reproducibility, recovery and LOD values and even low concentration amounts of melatonin can be analyzed with sample stacking-MEKC technique.

1.GİRİŞ

Elektroforez, doğru akımın uygulandığı bir tampon çözeltide yüklü taneciklerin diferansiyel göç hızlarına dayanan bir ayırma yöntemidir. İlk olarak İsveçli kimyacı Arne Tiselius tarafından serum proteinleri üzerinde çalışırken bulunmuş ve bu çalışmasından dolayı kendisi 1948’de Nobel ile ödüllendirilmiştir.

Elektroforez ile inorganik anyon ve katyonlar, aminoasitler, kateşolaminler, ilaçlar, vitaminler, karbonhidratlar, peptitler, proteinler, nükleik asitler, nükleotidler, polinükleotidler gibi çok çeşitli türlerin analizi gerçekleştirilebilir. Elektroforezin en önemli özelliği biyoteknoloji endüstrisinde biyolojik ve kimyasal araştırmalarda yüklü makromolekülleri ayırmasıdır [1].

Kapiler elektroforezin diğer yöntemlere göre pek çok üstünlüğü bulunmaktadır. Az çözücü sarfıyatı, küçük hacimlerde örnek enjeksiyonu, aynı kolonla hem polar hem apolar maddelerin, katyon ve anyonların büyük moleküllerinin analiz edilebilmesi, basitliği, yüksek ayırım gücü gibi avantajlarından dolayı son yıllarda hızla gelişen ve sıklıkla kullanılan bir yöntemdir [2] .

Melatonin memelilerde pineal bez tarafından sentezlenen ve canlılarda uyku düzeni ve vücut saatini dengelemek, duygu-durum bozukluklarını gidermek, vücut ısını düzenlemek ve korumak, üreme sistemi, solunum sistemi, dolaşım sistem ve immün sistemde çeşitli roller oynamak, yaşlanmayı geciktirmek ve kansere karşı savaşmak gibi pek çok etkisi bulunan bir hormondur.

Günümüze kadar melatoninin analizi için çok çeşitli yöntemler denenmiştir. Bu yöntemler arasında RIA, ELISA, GC-MS, HPLC ve CE sayılabilir. Melatoninin biyolojik ve kimyasal özelliklerini araştırmak için yeni metotların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır [3] .

Bu nedenle yapılan çalışmada, melatoninin kapiler elektroforezde tayini için misel elektrokinetik kromatografi (MEKC) metodu geliştirilmiş ve bu metot ile takviye tabletlerindeki melatonin miktarı belirlenmiştir. Yöntemin tayin sınırı gıdalarda bulunan melatonin miktarını belirlemeye yeterli olmadığından, tayin sınırını

düşürmek amacıyla örnek sıkıştırma-MEKC yöntemi geliştirilmiş ve amaçlanan tayin sınırı değerlerine inilmiştir. Örnek sıkıştırma-MEKC yöntemi beyaz hardal tohumunda melatonin miktar tayini için uygulanmış ve geliştirilen yöntemlerin validasyon değerleri hesaplanmıştır.

2. KAPİLER ELEKTROFOREZ

2.1 Kapiler Elektroforez Temel Prensipleri

Kapiler elektroforez (CE), elektroforez ile kromatografinin bileşimi olan bir tekniktir. Elektroforez, sıvı veya yarı katı bir ortam içinde, elektriksel potansiyel ile çözelti içindeki yüklü taneciklerin belirli bir pH'da göç etmesi ve etkin yükleri ile büyüklüklerine göre ayrılmaları prensibine dayanır [4] .

Elektrik alan, uygulanan voltaj ile kapiler uzunluğunun bir fonksiyonudur. Yüklü bir parçacığın bu elektriksel alan altındaki hızı aşağıdaki gibi tanımlanır.

$$v = \mu_e \cdot E \quad (2.1)$$

v = İyonun hızı

μ_e = Elektroforetik mobilite

E = Elektrik Alan

Elektroforetik mobiliteye, elektrik alandan kaynaklanan elektrostatik kuvvet ve sürtünme kuvveti etki eder. Elektrostatik kuvvet, parçacık yükü (q) ve uygulanan elektrik alanla orantılıdır ve bu kuvvet parçacıkla ters yüklü elektroda doğrudur [5] .

$$F = q \cdot E \quad (2.2)$$

Sürtünme kuvveti ise bu hareketi engellemeye yöneliktir ve aşağıdaki denklemle ifade edilir.

$$F_s = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot v \quad (2.3)$$

η = çözeltinin viskozitesi

r = iyon yarı çapı

Bu iki kuvvet dengeye ulaştığında iyonik partiküller sabit hızla hareket ederler. Bu durumda aşağıdaki eşitlik ortaya çıkar.

$$q \cdot E = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot v \quad (2.4)$$

2.4'teki eşitlikte v yerine $\mu_e \cdot E$ yazılınca, μ_e 2.5 eşitliğindeki gibi tanımlanır.

$$\mu_e = q / 6\pi\eta r \quad (2.5)$$

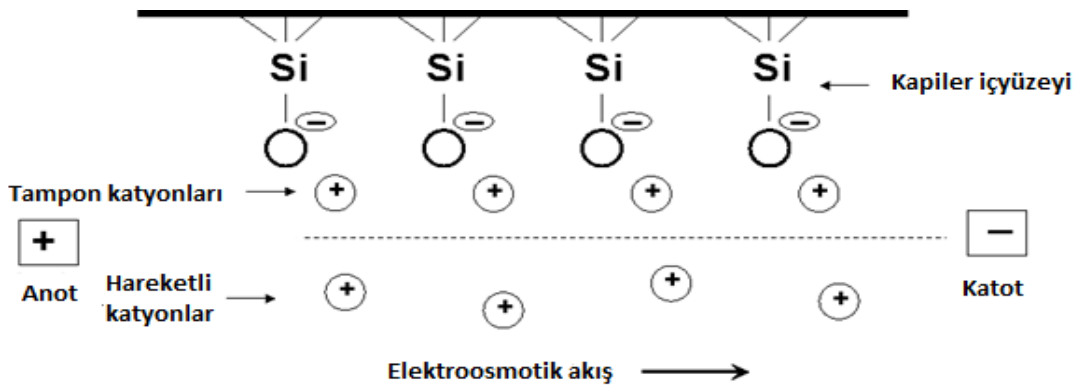
Bu eşitlikten de anlaşılacağı üzere iyonlar farklı yük/büyükölük oranlarına göre ayrılırlar [5]. Küçük çaplı ve büyük yüklü moleküllerin mobiliteleri daha yüksekken büyük çaplı ve az yüklü türlerin ise mobiliteleri daha düşüktür.

Tamponun pH'ının değışmesi ile analitlerin yükü değışir, böylece analitlerin elektroforetik mobiliteleri de değışir [6,7] .

2.2 Elektroosmotik akış

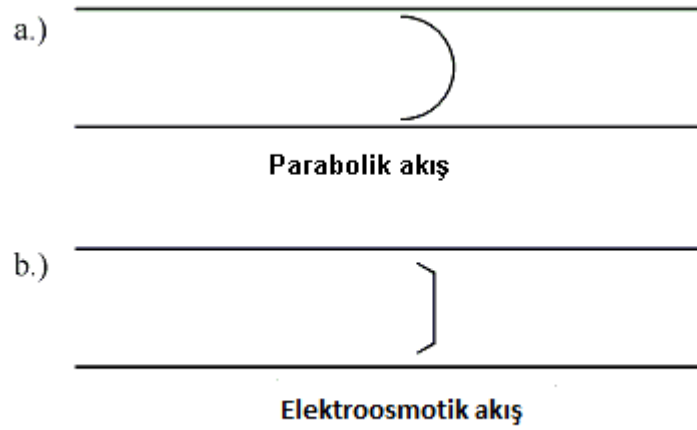
Tampon çözelti içeren bir kapiler tüpe yüksek bir potansiyel uygulandığında, kapiler içinde bir elektroosmotik akış oluşur, bu akış nedeniyle silika kolonda çözölücü katoda doğru göç eder.

Elektroosmotik akışın sebebi, silika/çözölteri ara yüzeyinde meydana gelen elektrik çift tabakasıdır. pH 2'nin üzerinde silika kapilerinin iç yüzeyi, yüzeydeki silanol grubunun iyonlaşması ($\text{Si OH (k)} \leftrightarrow \text{SiO}^-(\text{k}) + \text{H}^+(\text{aq})$) nedeniyle negatif yüklüdür. Tamponun katyonları, elektriksel çift silika kapilerinin negatif yüzeyine bitişik olan tabakada birikir. Çift tabakanın dış bölümündeki katyonlar, katot veya negatif elektrot tarafından çekilirler; katyonlar solvatize oldukları için çözölçüyü de beraberinde sürüklerler [1,8].



Şekil 2.1 : Elektroosmotik akış gösterimi

Elektroosmoz kolon içinde parabolik olmayan düz kesitli bir yığın çözölteri akışına neden olur. Halbuki sıvı kromatografide basıncın etkisi ile oluşan akış parabolik kesitlidir. Akış profilinin düz olması nedeniyle elektroosmotik akış sıvı kromatografide olduğu gibi bant genişlemesine önemli ölçüde etki etmez [1] .



Şekil. 2.2 : (a) Elektroosmotik akış, (b) Parabolik akış

2.2.1 Elektroosmotik akış hızı ve göç süreleri

Elektroosmotik akış (EOA) hızı eşitlik 2.1 dekine benzer şekilde;

$$v = \mu_{eo} \cdot E \quad (2.6)$$

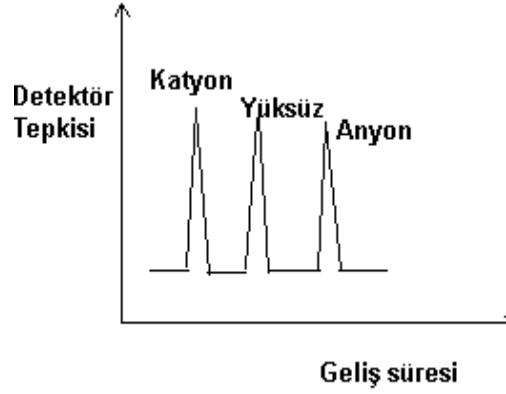
olarak verilir.

Elektroosmotik akış durumunda, bir iyonun hızı, onun elektroforetic hızı ve elektroosmotik akış hızının toplamıdır. Böylece;

$$v = (\mu_e + \mu_{eo}) E \quad (2.7)$$

olur.

Bu durumda katot bölgesine yakın yerleştirilen dedektöre elektroforetik mobilitesi EOA yönünde olan katyonlar ilk olarak ulaşır. Daha sonra gelen nötral moleküllerin kendi elektroforetik mobiliteleri olmadığından EOA ile hareket ederler. Takiben gelen anyonların elektroforetik mobiliteleri EOA'a ters yönde olduğundan dedektörden en geç bu iyonlar geçerler.



Şekil 2.3: Yüklü taneciklerin geliş sıraları

2.2.2. Elektroosmotik akışı hızını etkileyen faktörler

Elektroosmotik akış kontrolü, kapiler yüzey yükünü ve tampon viskozitesini ayarlamayı gerektirir. Elektroosmotik akışa etki eden faktörler aşağıdaki başlıklar altında toplanabilir.

2.2.2.1 Elektrik alanı

Elektrik alan arttıkça zaman EOA da artar. Fakat yüksek voltajlarda oluşan akım kapiler içinde joule ısısına sebep olur. Düşük voltajlarda ise ayırma etkinliği ve pik ayrılması azalır [5] .

$$E = V/L \quad (2.8)$$

E = elektrik alan

V = voltaj

L = kapilerin boyu

2.2.2.2 Ph

EOF ve pH birbiriyle doğru orantılıdır. pH arttıkça silanol gruplarının iyonizasyonu artacağından EOA da artar. EOA'nın ayarlanmasında en kullanışlı parametre pH değişimidir. Fakat pH değişimi maddelerin yapılarında ve yüklerinde değişiklik meydana getirebilir [8] .

2.2.2.3 İyonik şiddet

Tamponun iyonik şiddetinin artırılması ile zeta potansiyeli düşer ve bu düşüş EOA da düşürür. İyonik kuvvetin artmasıyla ortamda daha fazla iyon olacağından akım

artacak dolayısıyla joule ısısı oluşacaktır. İyonik kuvvet çok azaldığında ise duvar adsorpsiyonu meydana gelir.

2.2.2.4 Sıcaklık

Sıcaklığın arttırılması her 1 °C için %2-3 oranında viskozitenin azalmasına sebep olur ve elektroosmotik akış hızının artmasına neden olur.

2.2.2.5 Organik modifiye edici madde ilavesi

Etil alkol, metil alkol gibi suyla karışabilen organik çözücülerin ilavesi, zeta potansiyeli ve viskoziteyi, dolayısıyla elektroosmotik akış hızını etkiler. Genellikle organik çözücülerin ilave edilmesi EOA yavaşlar [7] .

2.2.2.6 Kapiler kolonlarının polimerik maddelerle kaplanması

Kapiler kolonunun içi polimerik bir madde ile (polietilenimin, polietilenglikol, poliakrilamid vb.) kaplanmasıyla, kaplanan maddenin hidrofilik ve hidrofobik olma durumuna göre elektroosmatik akış hızı yavaşlayabilir, yok olabilir veya tersine çevrilebilir.

2.2.2.7 Yüzey aktif madde ilavesi

Kapiler yüzeyinde adsorplanan yüzey aktif maddeler EOA'ı değiştirirler. Anyonik yüzey aktif maddeler EOF'ı arttırırken, katyonik yüzey aktif maddeler EOF'yi azaltır veya EOA'ın yönünü tamamen değiştirebilir. Ayrıca yüzey aktif maddeler seçimliliği büyük ölçüde etkilerler.

2.3 Kapiler Elektroforezde Analitik Parametreler

2.3.1 Ayırma etkinliği

Ayırma etkinliği sıvı kromatografi de olduğu gibi teorik plaka sayısı ile ifade edilir.

$$N = (l/\sigma)^2 \quad (2.9)$$

N = teorik plaka sayısı

l = kapilerin etkin uzunluğu

σ = pikin standard sapması

Teorik plaka sayısı elektroferogramdan yararlanarak da eşitlik (2.10) ile belirlenebilir.

$$N = 5,54 \cdot (t / w_{1/2})^2 \quad (2.10)$$

t = göç süresi

$w_{1/2}$ = yarı yükseklikteki pik genişliği

2.3.2 Pik genişlemesi

En önemli pik genişleme nedeni difüzyon dolayısıyla pik genişlemesidir. Göç süresi kısa olduğunda ve difüzyon katsayısı düşük maddelerde pik genişlemesi düşüktür bu yüzden kapiler elektroforezde uygulanan yüksek voltaj (yüksek elektrik alan) göç sürelerinin kısalmasını ve analitin kapiler içinde az süre geçirip fazla difüzyona uğramamasını sağlar. Difüzyonun pik genişlemesine etkisi varyans cinsinden şu şekilde verilir;

$$\sigma^2 = 2 \cdot D \cdot t \quad (2.11)$$

D = analitin difüzyon katsayısı

t = pikin geliş süresi

Protein ve DNA gibi düşük difüzyon katsayısına sahip büyük moleküller, küçük moleküllere göre difüzyondan daha az etkilenmektedirler. Bu nedenle CE’de protein ve DNA ayırmalarında, çok yüksek teorik plaka sayılarına ulaşmak mümkün olur [9].

Pik genişlemesine etki eden diğer bir etken ise joule ısısidir. Kapiler içerisindeki çözeltinin iç kısımlarında viskozite daha az dolayısıyla iyon mobilitesi daha yüksekken, kapiler duvarına yakın bölgelerde sıcaklık düşük, çözelti viskozitesi yüksek, iyon mobilitesi ise düşüktür bu da pik genişlemesine neden olur [10]. Daha düşük elektrik alan uygulanması ayırma tamponunun etkinliğini azalttığı için joule ısısı da azalacaktır. Daha genel bir yaklaşım olarak ise yüzey/hacim oranı yüksek olan kapilerler kullanmakla ısısının yayılımı geliştirilebilir. Elektriksel direnç dar kapilerde daha yüksek olduğundan ohm yasası gereği kapilere ulaşan voltaj da daha düşük olacak ve bu da joule ısısının daha az olmasına neden olacaktır [11]. Joule ısısı, etkin bir termostat sistemiyle de kontrol edilebilir.

Bunların dışında geniş enjeksiyon bölgesi, analitin kapilerin iç duvarına adsorpsiyonundan kaynaklanan duvar adsorpsiyonu ve örnek bölgesi ile tampon bölgesi arasındaki iletkenlik farkından kaynaklanan elektrodisorpsiyon, pik genişlemesinin diğer nedenlerindendir [7].

2.3.3 Rezolüsyon

İki pikin birbirinden ayrılması yani rezolüsyon şu eşitlik ile formüle edilir;

$$R = 2 (t_2 - t_1) / (w_1 + w_2) = (t_2 - t_1) / 4 \sigma \quad (2.12)$$

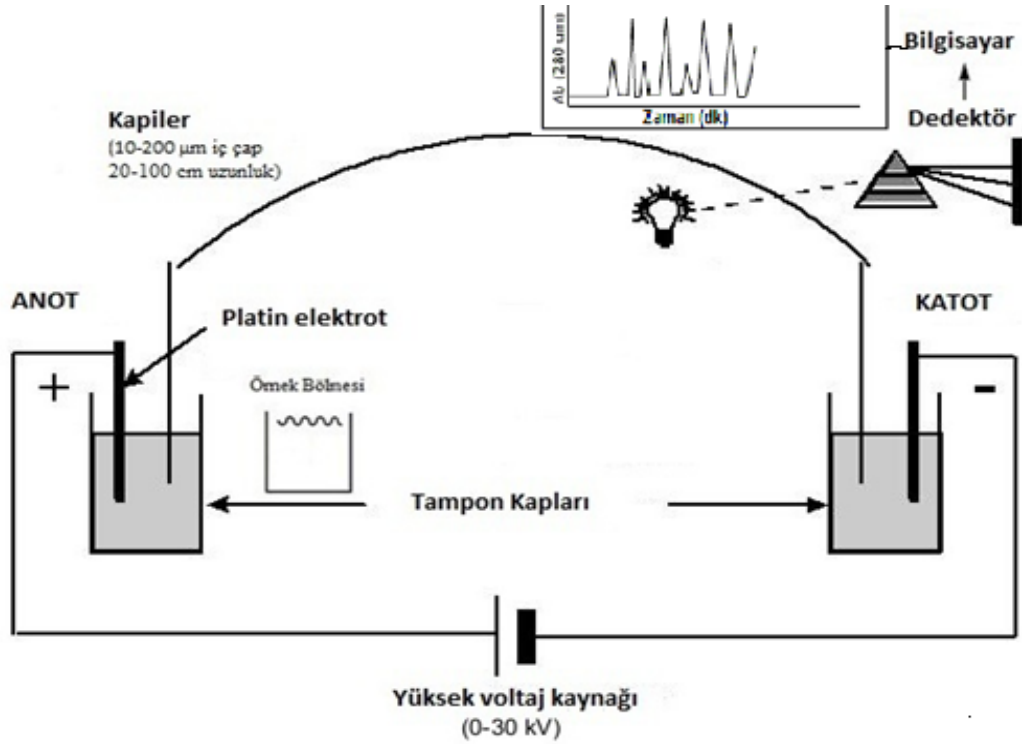
t = göç süresi

w = süre olarak pikin taban genişliği

σ = zamana ait standart sapma

2.4. Kapiler Elektroforez Cihaz Bileşenleri

Kapiler elektroforez cihazının şematik gösterimi Şekil 2.4'deki gibidir.



Şekil 2.4 : Kapiler elektroforez cihazı şematik gösterimi

2.4.1. Kapiler kolon

Kapiler elektroforezde genellikle hem UV bölgede analiz yapılabilmesi hem de sağlam olması nedeniyle silika kapiler borular kullanılmaktadır. Kapiler borunun dış yüzeyi kırılganlığı azaltmak için poliimid ile kaplanmıştır. Bu polimer tabakanın çok küçük bir kısmı yakılarak dedeksiyon için gereken optik pencere elde edilir [8]. Kapiler boruların iç çapı 10 ile 200 µm, dış çapı 350 ile 400 µm ve etkin uzunlukları (kolonun dedeksiyon bölgesine kadar olan uzunluğu) 50 ile 75 cm arasında değişmektedir. Toplam uzunluk ise etkin uzunluktan 5-15 cm daha uzundur.

Kapiler ilk kullanımda, silanol gruplarının iyonlaşması ve kapiler iç yüzeyinin dengeye gelmesi için 1 M NaOH çözeltisi ile yaklaşık 30 dakika yıkanmalı ve ardından su ve en son olarak tampon çözelti ile yıkanmalıdır [8] .

2.4.2. Enjeksiyon yöntemleri

Kapiler elektroforezde ayrımı yapılacak olan numuneyi kapilere almak için hidrodinamik ve elektrodinamik enjeksiyon uygulanır [12].

2.4.2.1. Hidrodinamik enjeksiyon

Bu enjeksiyon çeşidinde örnek uygulanan basınç vasıtasıyla kapiler içine alınır. Bu basınç farkı kapilerin dedektör ucuna vakum, numune ucuna basınç uygulayarak veya numune ucunun yükseltilmesi (sifon etkisi) ile meydana getirilir.

Kapiler kolona enjekte edilen örnek zonunun uzunluğu ve örnek hacmi sırasıyla (2.13) ve (2.14) eşitlikleri ile hesaplanır.

$$I_{enj} = (3,5 \times 10^6) r^2 \cdot P \cdot t_{enj} / L \quad (2.13)$$

$$H_{enj} = \Delta P \pi r^4 t_{enj} / 8 \eta L \quad (2.14)$$

I = örnek zonunun uzunluğu

$3,5 \times 10^6 = 25^\circ \text{C}$ 'de su için hesaplanmış bir sabit

r = kapilerin iç çapı

P = basınç

t_{enj} = enjeksiyon süresi

L = kapilerin toplam uzunluğu

H_{enj} = Enjekte edilen örnek hacmi

η = tampon çözeltisi viskozitesi

Basınç ile enjeksiyonda iyon yükünden dolayı hareketlilikte bir fark meydana gelmez; fakat jelle doldurulmuş kapilerde bu yöntem kullanılamaz [1].

2.4.2.2. Elektrokinetik enjeksiyon

Bu enjeksiyon çeşidinde kapiler örnek kabının içindeyken kısa bir süre voltaj uygulanarak örnek kapiler içerisine alınır. Elektrokinetik enjeksiyonun tekrarlanırlığı

hidrodinamik enjeksiyona göre daha azdır ve hızlı hareket eden iyonlar yavaş hareket eden iyonlara göre daha fazla oranda kapilere alınmaktadır.

2.4.2.3. Örnek sıkıştırma

CZE metodunda kapilerdeki kısa optik pencere ve küçük enjeksiyon hacimleri çok seyreltik örneklerin direkt fotometrik analizlerini önlemektedir. Bu sebepten dolayı HPLC ile karşılaştırıldığında özellikle güçlü kromofor içermeyen analitlerin tayin sınırları daha yüksek olabilmektedir. Bu yüzden CE’de duyarlılığı arttırmak için kullanılan yöntemlerden biri de örnek sıkıştırma (sample stacking) metodudur [13].

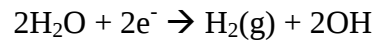
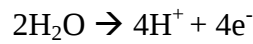
Örnek sıkıştırma yönteminin temeli enjekte edilen analit örnek bölgesi ile ayırma tamponu arasında iletkenlik farkı yaratmaktır. Kapiler içinde, düşük iletkenlikteki örnek bölgesinde elektrik alan yüksek olacağından analit bu bölgede hızlı ilerlerken, yüksek iletkenlikteki dolayısıyla düşük elektrik alanlı tampon bölgesiyle karşılaşınca hızı düşecek ve tampon zonu ile örnek çözeltisi zonu sınırına yığılacaktır. Tampon sınırına yığılmış konsantre analitler ile tayin sınırını önemli miktarda düşürülebilir.

Örnek sıkıştırmada optimum koşul tampon çözeltisinin yaklaşık on kat seyreltik çözeltisinde hazırlanan örneklerdir.

Örnek sıkıştırma verimliliği arttırmak için hem hidrodinamik enjeksiyonda hem de elektrokinetik enjeksiyonda kullanılabilir [14].

2.4.3. Elektrotlar

CE’de kullanılan elektrotlar platin elektrotlardır ve elektrotlardaki reaksiyonlar genellikle suyun ayrışması ile olur. Anotta ve katotta oluşan reaksiyonlar sırası ile aşağıdaki gibidir.



2.4.4. Voltaj kaynağı

Ayrımlar genellikle 5 ile 30 kV voltaj uygulanmasıyla gerçekleştirilir. Voltaj arttığında oluşan elektrik alan da artacağından kapiler içerisindeki elektroosmotik akış hızlanacaktır. Bu yüzden yüksek voltaj kaynağı kullanılır. Voltajın sabit olması göç süresinin tekrarlanabilirliği açısından önemlidir [15].

2.4.5. Dedektör

Dedektörler konsantrasyon değişikliklerinden doğan kimyasal sinyalleri elektrik sinyallerine dönüştürürler. Kapiler elektroforezde kullanılan farklı özelliklerdeki dedektörler çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1 : CE’de dedektör türleri [7]

Dedeksiyon Türü	LOD Değerleri (mol/L)	Özellikleri
UV-GB absorpsiyon	10^{-7} - 10^{-4}	Çok kapsamlı uygulama alanı Diodarray dedektörler ile spektral dedeksiyon
İndirek UV	10^{-16} - 10^{-13}	Aminler, şekerler, organik , inorganik iyonlara uygulama Kromofor grup içeren bir bileşik ile türevlendirilme
Floresans	10^{-9} - 10^{-4}	Aminoasitler, DNA, peptidler Hassastır Örnek türevlendirilmesi gerekebilir
Lazer indüklenmiş floresans	10^{-14} - 10^{-16}	Pahalıdır Çok hassastır Örnek türevlendirilmesi gerektirir
Amperometri	10^{-8} - 10^{-6}	Kolay indirgenebilen ve yükseltgenebilen maddelere uygulama Hassastır Özel kapiler modifikasyonu gerekli
Potansiyometri	10^{-8} - 10^{-7}	Alkali iyonlarına uygulama
Kütle Spektrometrisi	10^{-8} - 10^{-7}	Protein, peptid, ilaç uygulamaları Hassastır Yapı hakkında bilgi sağlar
Alev Fotometrisi	10^{-3} - 10^{-5}	İyonik organik bileşiklere uygulama
Konduktivite dedektörleri	10^{-7} - 10^{-8}	Özel kapiler modifikasyonu gerekli

En çok kullanılan dedektörler UV-GB absorpsiyon ve Lazer indüklenmiş floresan dedektörlerdir.

2.4.5.1 UV dedektör

Bu sistemin temel prensibi bir ışık kaynağından gelen UV ışınları kapiler üzerine odaklamaktır. Işığın emilmesi her bir iyon için farklı olduğundan nicel ve nitel analizler yapılmasına olanak sağlar [16].

Absorbans veya floresans dedeksiyonun dezavantajı, tüm analitlerin UV-GB (180-800 nm) bölgede floresans veya absorbans yapan kromofor grup içermemesidir. Bu analitler için direk dedeksiyon mümkün değildir. Bu tip analitlerin dedeksiyonu

kromofor grup içeren bir bileşik ile türevlendirilmesi, başka bir dedeksiyon yönteminin kullanılması veya dolaylı dedeksiyon ile mümkün olmaktadır.

2.5. Kapiler Elektforez Çeşitleri

Şimdiye kadar ayırma prensibi anlatılan, kapiler elektforezin en basit şekli olan kapiler zon elektforezdir. Diğer kapiler elektforez yöntemleri dayandıkları ayırma prensiplerine göre farklılıklar göstermektedir.

2.5.1. Kapiler zon elektforez (CZE)

Numune, tampon tarafından çevrelenen dar bir zon (şerit) halinde uygulanır. Elektrik alan uygulandığında, numune zonundaki her bir bileşen kendi mobilitelerine göre göç ederler. Bütün numune komponentleri saf materyale ait zonlar oluşturmak üzere ayrılırlar [4].

2.5.2. Kapiler jel elektforez (CGE)

Kapiller jel elektforezinde temel ayırma mekanizması; jelle doldurulmuş kapillerde gözeneklerden geçerek göç eden moleküllerin büyüklükleri arasındaki farka dayanır. Jeller diğer jel elektforezinde olduğu gibi moleküler elek gibi davranırlar ve zon genişlemesinin önüne geçerler. Ayrıca kapiller duvarına analizi yapılan molekül veya türlerin yapışmasını engellerler [17].

2.5.3. Kapiler izotakofrez (CITP)

CITP'de ayırma, örneğin, mobilitesi farklı iki tampon arasında sıkıştırılarak göçüne dayanır.

2.5.4. Kapiler izoelektrik odaklama (CIEF)

Klasik elektforezden farklı olarak izoelektrik odaklama, analiz edilecek numunenin bir pH gradientinde izoelektrik noktalarına göre ayrılması prensibine dayanır.

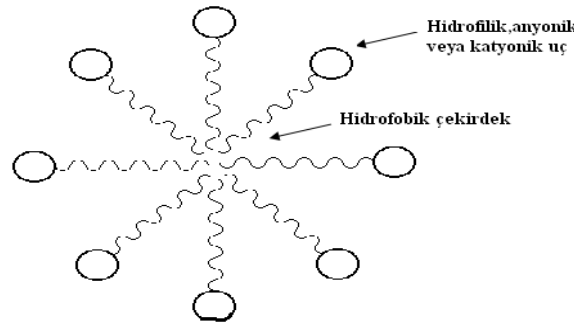
2.5.5. Kapiler elektrokromatografi (CEC)

Kapiller elektforezin yüksek etkinliği mikro-HPLC'nin yüksek seçiciliği ile kombine edilebilir. CEC tekniğinde ayırım mekanizması, kromatografik ayrılma ve elektforetik migrasyonun bir kombinasyonudur. Kapiler içerisi, çapı çok küçük kromatografik sabit faz ile doldurulur. HPLC ve CEC arasındaki tek fark, mobil

fazın sürüklenmesi için HPLC'deki gibi bir basınç pompası değil, bir yüksek voltajın kullanılmasıdır.

2.5.6. Misel elektrokinetik kromatografi (MEKC)

Misel ile yapılan kapiler elektroforez, misel elektrokinetik kapiler kromatografi diye isimlendirilir ve bu teknikte çalışılan tampon içine kritik misel derişimini aşacak şekilde yüzey aktif madde ilave edilir. Günümüze kadar yapılan çalışmaların çoğunda yüzey aktif madde olarak sodyum dodesil sülfat (SDS) kullanılmıştır. Bu tip anyonik misellerin yüzeyi büyük negatif yüke sahip oldukları için pozitif elektroda doğru hareket ederler. Tampon çözeltilerin çoğu negatif elektroda doğru yüksek bir elektroosmotik akışa sahiptirler; anyonik miseller de aynı yönde hareket ederler (fakat çok daha düşük hızlarda). Böylece, bir deneyde tampon karışımı hızlı hareket eden su faz ile yavaş hareket eden misel fazlarından meydana gelir. Böyle bir sisteme numune ilave edildiğinde, numune bileşenleri sulu faz ve miselin iç kısmı olan hidrokarbon fazı arasında dağılırlar. Buradaki dağılıma dengesi çözünen maddenin polaritesine bağlıdır. Çözünenin polar olması durumunda sulu faz tercih edilirken, polar olmayan maddeler ise hidrokarbon faz olan miseli tercih eder [1,12].



Şekil 2.5 : Sulu fazda bir miselin görünüşü

MEKC'de kullanılacak miselin fiziksel özellikleri (büyüklük, yük, geometri) ayarlanarak seçicilik değiştirilebilir. Yüzey aktif maddeler; katyonik, anyonik, yüksüz, çiftiyon veya bunların karışımı şeklinde olabilir. Ayrıca, tampon konsantrasyonu, pH ve sıcaklık değiştirilerek veya üre, metal iyonu, kiral seçici gibi katkıları eklenerek seçicilik değiştirilebilir.

Kromatografik yöntemlerde olduğu gibi, organik çözücüler eklenerek misel ile analit arası etkileşim azaltılabilir. Metanol, asetonitril ve 2-propanol gibi çözücüler

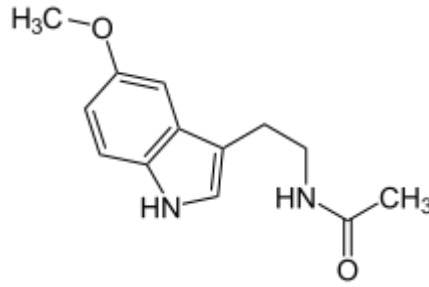
MEKC’de sıkça kullanılan organik katkılarıdır. Tampon çözeltinin % 50’sinden fazla eklenen organik çözücüler, misel yığınları bozabilir [18].

Bu yöntem HPLC sistemine benzemekle birlikte, kolon verimliliğinin daha yüksek olması (100.000 tabaka veya daha fazla) ve ikinci fazı değiştirmek için HPLC’ deki gibi kolon dolgu tipinin değiştirilmesine ihtiyaç duyulmadan tampon içindeki misel bileşenin değiştirilebilmesi gibi avantajlara sahiptir [1].

3. MELATONİN

3.1. Melatoninin Molekül Yapısı ve Sentezi

Melatoninin (N-asetil-5-metoksitriptamin - 232,278 g/mol) pineal bezden ilk olarak keşfi Lerner ve arkadaşları tarafından 1958’de gerçekleşmiştir. Melatoninin bu dönemde tanımı “melanophorecontracting hormon” olarak yapılmış ve gerek kurbağa derisindeki melanoforların beyaz görünüşüne neden olduğu için ve gerekse serotoninenden türediği için bu isim verilmiştir [19].



Şekil 3.1 : Melatonin

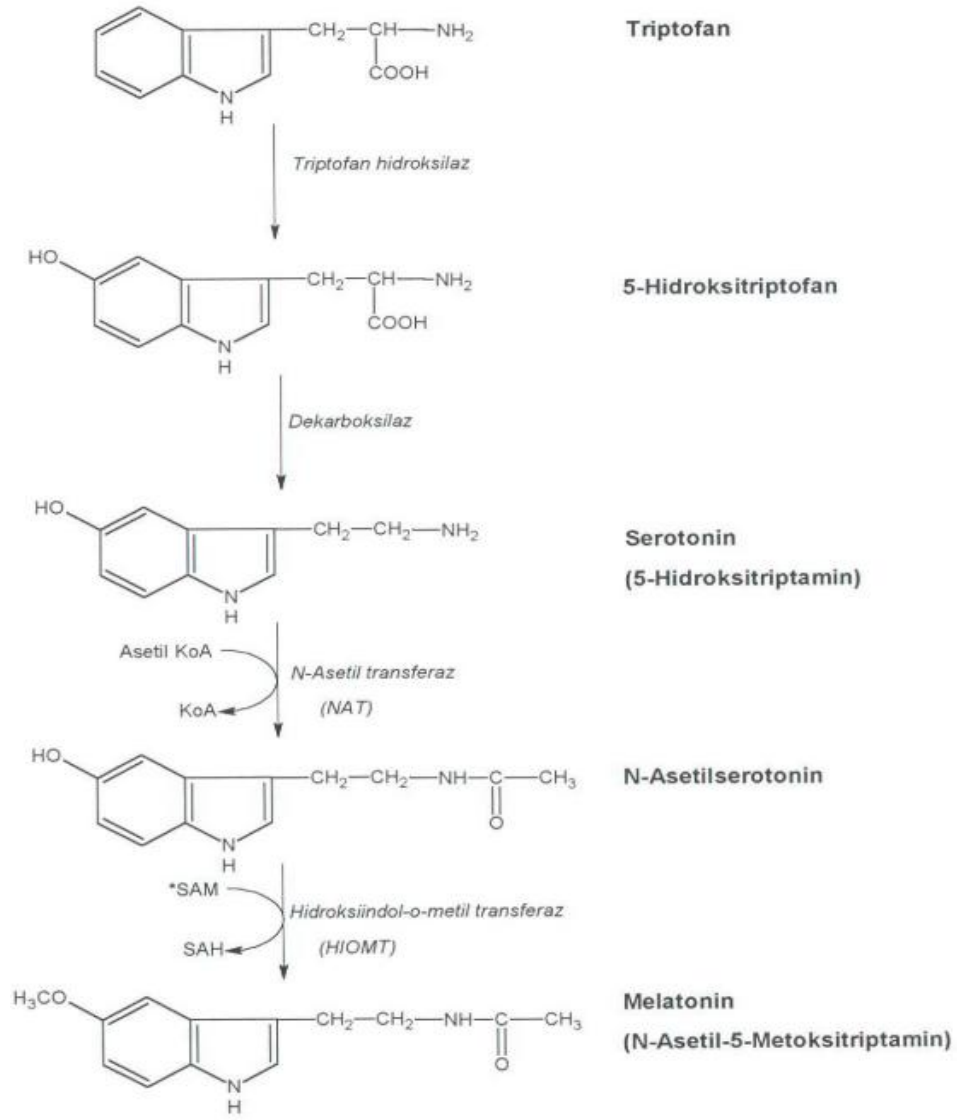
Melatonin karanlıkta pineal salgı bezinin uyarılmasıyla salgılanmaya başlar ve bu yüzden de geceleri maksimum konsantrasyona ulaşır [20]. Melatonin sentezi beyindeki pineal bezde triptofandan başlar. Triptofan, triptofan-5-hidroksilaz enzimi tarafından 5-hidroksitriptofana (5-HTP), 5-HTTP ise aromatik aminoasit-dekarboksilaz ile serotonine, serotonin arilalkilamin-N-transferaz ile N-asetilserotonine ve N-asetilserotonin ise hidroksiindol-O-metiltransferaz enzimi ile melatonine dönüştürülür (Şekil 3.1.) [21].

Ortamın ışık durumu, kişinin yaşı, mevsim, ortam sıcaklığı, hormonlar, manyetik alanlar gibi pek çok faktör melatonin sentezini etkiler. Bunlardan en iyi bilineni ve en etkili ortamın ışık durumudur [22].

Melatonin salgılanması gecenin ortasında zirvededir ve gecenin ikinci yarısından sonra giderek düşer [23]. Birçok türde melatonin sekresyonu gecenin uzunluğu ile ilişkilidir. Gece ne kadar uzunsa, melatonin salgılanması o kadar uzun sürer [24].

Melatonin salgılanması mevsimsel farklılık da gösterir. Yazın daha geç salınırken, kışın salınım daha erken başlar. Uzun süreli melatonin salınımı (sekresyonu) kısa günlerde, kısa süreli melatonin salınımı uzun günlerde görülür. Gün uzunluğu ve sinyalin yorumu söz konusu olan canlı türünün fizyolojisine de bağlıdır. Kısa süreli ama yeterli miktarda ışık maruziyeti melatonin salgısını baskılar. İnsanlarda geceleri melatonin salgısını baskılayacak doz 2005 lux'tür ve en etkilisi yeşil ışıktır [25].

Birçok endokrin bez oluşturdıkları hormonları depolarlar. Pineal bez için bu geçerli değildir. Çünkü pineal bezde melatonin oluşumu yükseldiği anda kandaki titreleri de yükselmektedir. Melatonin oluşur oluşmaz hemen kana serbestlenir, böylece pineal bezde melatonin oluşumu ile plazmadaki seviyeleri arasında güçlü bir ilişki görülür [26]. Melatonin kanda daha çok plazma proteinlerine bağlı olarak bulunur. Melatoninin albümine bağlı bulunması idrarla dışarı atılımını sınırlar. İdrarda melatoninin ancak %1 kadarının formu değişmemiş olarak bulunur [22]. İnsanda melatoninin metabolize olduğu primer yer karaciğerdir.



Şekil 3.2 : Melatonin sentezi

3.2. Melatonin Hormonunun İnsan Vücudundaki Etkileri

Melatonin etkileri endokrinolojik ve non-endokrinolojik olarak ikiye ayrılabilir [27].

Endokrinolojik olarak, hipotalamus-hipofiz-gonadlar sistemi, diğer hipofiz hormonlarının salgılanması, tiroid bezi ve böbrek üstü bezi fonksiyonları üzerinde inhibitör etkisi vardır [28].

Non-endokrinolojik olarak ise melatoninin çok çeşitli etkisi bulunmaktadır. Bunlar arasında uyku-uyanıklık, duygu-durum, vücut ısısı, üreme, solunum, dolaşım sistemi, immün sistem, yaşlanma ve kansere etkileri sayılabilir.

Melatonin alınması uykuya dalış hızını, uykunun süresini ve kalitesini etkiler. Melatoninin gece boyunca düşük düzeyde salgılanması uykunun azalmasına, fazla miktarda ve uzun süre sekresyonu ise uyku isteğinin artmasına neden olur. Mevsimsel duygu-durum bozukluğu ve depresyon gibi hastalıklarda da rolü olduğu düşünülmektedir [29].

Melatoninin üreme işlevine etkisi oldukça iyi incelenmiştir. Bu etkinin hipotalamik-hipofizer- gonadal eksenini baskılaması ile gerçekleşebileceği, böylece üreme sürecinin baskılanmasına neden olabileceği üzerinde durulmaktadır [30].

İmmün sistem üzerindeki etkisini ise hem endojen opioidler aracılığıyla hem de doğrudan T hücreleri üzerinde etkili olmak suretiyle gösterir. Melatonin sentezinin engellenmesi durumunda humoral ve hücreli immün reaksiyonlarda azalma ortaya çıkar. Yeniden melatonin verilmesi ile immün fonksiyon tekrar uyarılır [31]. İmmün yanıtın melatonine bağlı artması sonucu melatoninin tümör büyümesinin baskılanmasında rol alabileceği düşünülmüştür [32,33].

Melatonin vücutta birçok biyolojik ritmin düzenlenmesinde rol oynar. Örneğin kardiyovasküler sistemde sirkadiyen ritim gösteren en önemli parametreler kalp hızı, kan basıncı ve damar tonusundaki değişimlerdir. Gece kan basıncı, kalp hızı ve damar tonusu azalır bu yüzden de melatoninin kalp hızı sirkadiyen ritmini etkilediği düşünülmektedir [34].

İnsan vücudu her gün aynı saatte otomatik olarak belirli fonksiyonları yerine getirir, vücut ısını değiştirir, hormonları salgılar. Örnek olarak, biyolojik saatine uygun olarak akşam saatlerinde ısı kaybını önlemek için beden ısını düşürür, sabahları ise bedeni günlük aktivitelere hazırlamak için arttırır. Yani melatonin sayesinde vücut ısı insanlarda, bir günde yaklaşık bir derece iner ve çıkar [35].

Melatonin antioksidan özelliği olan, elektrondan zengin bir moleküldür. Suda ve yağda çözünürlüğü oldukça yüksek olduğundan bütün hücre zarlarından kolayca geçerek hücrelere ve hücre organellerine hızla ulaşır. Bu özelliği lipidlerin, proteinlerin ve DNA'nın korunmasında oldukça etkilidir. DNA moleküllerini, proteinleri ve biyolojik membran lipidlerini serbest radikallerin zararlı etkilerinden korur [36].

Serbest radikallerle kolayca ilişkiye girer ve N-asetil-N-formil-5-metoksikinuramin ve N-asetil-5-metoksi-kinuramin gibi birçok metabolit oluşturur. Bu moleküller

kuvvetli serbest radikal gidericidir. Ayrıca glutatyan peroksidaz, glutatyan redüktaz, glükoz-6 fosfat dehidrogenaz ve nitrik oksit sentaz gibi çeşitli antioksidatif enzimleri de stimüle eder. Böylece diğer antioksidan vitamin ve minerallerden daha fazla etkili olabilir [37,38].

İndirekt olarak melatonin reseptörlerini uyararak antioksidan enzimler üzerine etkili olduğu ve bu şekilde de doku koruyucu etki gösterebildiği görülmüştür [39].

3.3. Melatonin Analizleri

İnsan vücudunda pek çok fonksiyonel görevi bulunan melatoninin eksikliği sağlık açısından önemli problemler oluştururken, takviye olarak alınan fazla melatoninin yan etkilerinin de olabilmesi melatonin analizlerini önemli kılmaktadır.

1958’de Lerner tarafından bulunan melatoninin çalışmaları 1970’lerde ağırlık kazanmış ve gelişen teknolojiyle birlikte günümüze kadar önemini kaybetmeden devam etmiştir [40]. Literatürde, biyolojik örneklerde ve gıda örneklerinde melatonin analizlerine ilişkin çeşitli çalışmalar bulunmaktadır.

Geçmiş yıllara bakıldığında 1970’ler boyunca melatonin analizleri ağırlıklı olarak bioassay, radyo-immunassay ve florometrik yöntemlerle yapılmıştır. Son kırk yıl içerisinde gelişen analitik metotlarla melatonin analizleri de artmıştır. Bu analizlerin bazılarında GC-MS , HPLC-MS-MS cihazları ve floresans, elektrokimyasal ve UV dedektörler kullanılmıştır [40].

Hassas ve seçici bir yöntem olan RIA (radyoimmunoassay) ile melatoninin pg/mL seviyelerindeki tayinleri gerçekleştirilebilmektedir [41]. ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) yöntemi ise RIA kadar hassas değildir, bu yüzden bazı analizlerde önderiştirme çalışmalarının yapılması gerekli olabilir [42-43]. Birçok avantajlarına rağmen yüksek maliyetleri ve genellikle tek bir analit ile çalışılabilmelerinden ötürü bu yöntemler daha az tercih edilir.

GC-MS, melatonin analizlerinde 1 pg/mL [44] tayin sınırlarına kadar inmiş, en hassas tekniklerden biridir. Ancak gerektirdiği türevlendirme basamakları ve pahalı bir yöntem oluşu tercih edilmemesine neden olmaktadır.

HPLC, florometrik ve elektrokimyasal dedektörlerle melatoninin çeşitli matrislerde tayinlerinde yaygın bir kullanışa sahiptir. Dedeksiyon limitleri florometrik ve

elektrokimyasal dedektörler için sırasıyla 0,5-3 pg/mL ve 15-250 pg/mL olarak verilmiştir. HPLC kütle spektrometrisi ile de melatonin analizlerinde uygulanmış fakat düşük dedeksiyon sınırları için uğraşlı örnek hazırlama basamaklarına ihtiyaç duyulduğu görülmüştür [45].

Diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında CE yüksek verimliliği, minimum örnek hacmi gerekliliği ve daha kısa analiz süreleri bakımından biyoanalizlerde daha çok tercih edilmeye başlanmıştır.

Yapılan çalışmalar incelendiğinde CE ile melatonin tayinlerinde genellikle elektrokimyasal (ECD) ve UV dedektör kullanıldığı ve oldukça düşük tayin sınırlarına inilebildiği görülmektedir. Melatonin analizlerinde CE ile yapılan bazı çalışmalara ait yöntem ve LOD değerleri çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1 : Melatonin analizlerinde çalışılmış CE yöntemleri ve LOD değerleri

Yöntem	LOD değerleri	Referans
EC-LIF	2 ng/mL	[46]
CE-Amperometrik Dedeksiyon	7 ng/mL	[47]
	0,3 ng/mL	[48]
	0,3 µg/mL	[49]
MEKC-UV	2 µg/mL	[50]
	25 ng/mL	[51]
	0,5 µg/mL	[52]
	44 ng/mL	[40]

Melatonin tayinlerinde kapiler elektroforezde UV dedektör ile çalışıldığında, küçük hacimde örnek enjeksiyonundan ve kısa optik yol uzunluğundan kaynaklanan zayıf dedeksiyon, optik yol uzunluğunu arttırarak, LIF veya ECD dedektör kullanılarak giderilebilir [53].

Düşük tayin sınırlarına inebilmenin bir diğer yolu da MEKC’de örnek sıkıştırma gibi örnek zenginleştirme yöntemlerinin uygulanmasıdır [54,55].

3.3.1 Gıdalarda melatonin tayini

Sağlıklı yaşam için diyetin önemi arttıkça, gıdalardaki biyoaktif bileşiklerin araştırılmaları önem kazanmıştır. Bu nedenle araştırması yapılan bileşiklerin sayısı yıldan yıla artmaktadır. Gelişen teknolojiyle birlikte gıdalardaki bu bileşiklerin analizleri kolaylaşmaktadır. Yapılan tüm çalışmalara rağmen gıdalarda halen analizi yapılmamış bileşiklerin bulunması bu konuya eğilimi arttırmaktadır. Melatonin de

gıdalarda bulunan biyoaktif bir molekül olması ve fizyolojik etkilerinin öneminden ötürü araştırmalara sıklıkla konu olmaktadır [56].

Gıdalarda melatonin analizlerinin bazı güçlükleri bulunmaktadır. Melatoninin bazı gıdalarda çok düşük konsantrasyonlarda (çoğu zaman mg/g veya daha az oranda) bulunmasından dolayı uygulanan analitik metodun oldukça hassas olması gerekmektedir. Amfipatik yapısından dolayı çözücü seçiminin önem arz etmesi ve güçlü antioksidan özelliğinden dolayı ortamdaki diğer bileşenlerle kolayca reaksiyona girebilmesi melatoninin gıda analizlerindeki diğer zorluklarından [57,58].

Gıdalarda melatonin analizleri için immunolojik, kromatografik, spektrofotometrik ve kemilüminesans yöntemleri denenmiştir. Çizelge 3.1’de çeşitli çalışmalarda gıda örneklerinde bulunan melatonin miktarları verilmiştir.

Çizelge 3.2 : Gıdalarda melatonin miktarları

Gıda örneği	Örnek şekli	Miktar	Yöntem	Referans
domates	meyve	2 pg/g	GC-MS	[59]
domates	meyve	1068,5 pg/g	HPLC-florosans	[60]
zeytinyağı	yağ	53-119 pg/mL	ELISA	[61]
ceviz	çekirdek	3,5 ng/g	HPLC-EC	[62]
badem	çekirdek	39 ng/g	HPLC-EC	[63]
ay çiçeği	çekirdek	29 ng/g	HPLC-EC	[63]
siyah hardal	çekirdek	129 ng/g	HPLC-EC	[63]
beyaz hardal	çekirdek	189 ng/g	HPLC-EC	[63]
şarap		50-80 pg/mL	ELISA	[64]
kahve (arap)	yeşil çekirdek	6,8 µg/g	HPLC-MS	[65]
kahve (arap)	kavrulmuş çekirdek	9,6 µg/g	HPLC-MS	[65]
kahve (arap)	kaynamış kahve	3,9 µg/g	HPLC-MS	[65]

4. DENEYSEL KISIM

4.1. Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltilerin Hazırlanması

Stok çözeltilerinin hazırlanmasında kullanılan dodesilsülfat desodyum tuzu (SDS) Merck'ten (Darmstadt, Germany), %85'lik ekstra saf orto fosforik asit çözeltisi Riedel-de Haen'den, katı haldeki melatonin standardı Sigma Aldrich'ten (Steinheim, Germany) temin edilmiştir. Toz hardal marketten, melatonin takviye tableti eczaneden alınmıştır.

Optimum şartları sağlamak için farklı tampon çözeltiler ve farklı örnek çözücü sistemleri denenmiş ve çözeltilerin uygun pH değerlerine ayarlanması için 1M NaOH çözeltisi kullanılmıştır. Kalibrasyon grafiklerinin oluşturulmasında ve spike örneklerinin hazırlanmasında kullanılmak üzere 2 mM melatonin stok çözeltisi hazırlanmıştır.

Hardalda melatonin tayini için 30 gram toz hardal 90 mL etanolde 30 dakika karıştırıldıktan sonra süzgeç kağıdı ile süzülüp elde edilen süzüntüden etanol dönen buharlaştırıcı vasıtasıyla uçurulmuştur. Kalıntı 15 mL suda çözülüp mikro filtre ile süzülerek cihaza enjekte edilecek örnekler hazırlanmıştır.

Takviye tabletlerinde melatonin tayini için 1 adet tablet toz hale getirilip 50 mL suda çözülmüştür.

4.2. Cihazlar ve Enjeksiyon Koşulları

Çözeltiler Elga Purelab Option-Q sistemi ile elde edilen saf su kullanılarak hazırlanmıştır. Tampon çözeltilerinin pH'ları Thermo Scientific Orion Dual Star marka pH metre ile ayarlanmıştır. Analizler Prince Technologies (Emmen, Netherlands) kapiler elektroforez cihazında, Polymicro Technologies marka (Phoenix, AZ, USA) kapiler kolon ile gerçekleştirilmiştir. Dedeksiyon için Bischoff Lambda 1010 UV dedektörü kullanılmıştır. Veri eldesi DAX 8.0 Data Acquisition and Analysis programında yapılmıştır.

Kullanılan silika kapiler kolon 75 µm iç çapına, 65 cm toplam uzunluğa ve 55 cm etkin uzunluğa sahiptir. Kapiler kolon ilk kullanımda 30 dakika 1M NaOH çözeltisi, 10 dakika su ve 20 dakika tampon çözeltisi ile yıkanmıştır. Gün başlarında 20 dakika 1 M NaOH çözeltisi, 5 dakika su ve 10 dakika tampon çözeltisi ile ve enjeksiyon aralarında 1,5 dakika tampon çözeltisi ile yıkama yapılmıştır.

Hidrodinamik enjeksiyonlar 50 mbar basınçla, ayırımlar 25°C’de -30 kV potansiyel uygulayarak gerçekleştirilmiştir. Pikler UV dedeksiyon ile 222 nm’de elde edilmiştir.

4.3. Misel Elektrokinetik Kromatografi Koşulları

pH 3’de yüksüz bir molekül olan melatoninin analizi SDS yüzey aktif maddesi içeren tamponlarda gerçekleştirilmiştir. Bu pH’da kapiler içindeki EOM çok düşük olduğundan, negatif yönden enjeksiyon yapıldığında SDS misel agregatları ile etkileşmesi sonucu negatif yüklenen melatonin zıt yöndeki elektroosmatik akımı yenerek pozitif elektroda doğru göç ederek dedekte olacaktır.

4.4. Örnek Sıkıştırma Yöntemi

Melatoninin tespit limitini (LOD) düşürmek için uygulanan örnek sıkıştırma yönteminde SDS konsantrasyonu örnek çözeltilerinde 10 mM iken tampon çözeltilerinde daha yüksek miktarda tutulmuştur. Negatif uçtan enjekte edilen örnek çözeltisi düşük iletkenliğe dolayısıyla yüksek elektrik alana sahip olduğundan örnek çözelti bölgesinde hareket eden melatonin moleküllerinin bu bölgede elektroforetik mobiliteleri yüksek olacaktır. Melatonin molekülleri, yüksek iletkenlikteki ve düşük elektrik alana sahip tampon bölgesiyle karşılaştığı anda yavaşlamış, örnek zonu ve tampon zonu ara sınırında konsantre olmuşlardır. Konsante örnek bölgesi, kapiler içindeki zayıf EOM yi yenerek pozitif uca yani detektöre doğru hareket edecek ve melatonin dedektör sinyali bu şekilde artacaktır. Bu esnada zıt yöndeki elektroosmotik akış seyreltik tampon bölgesini negatif uçtan dışarıya atacaktır.

Bu yöntem denenirken örnekler 50 mbar basınç ile 6, 12, 18, 24, 36, 48, 54 ve 60 saniye sürelerle enjekte edilmiştir ve en düşük LOD değerine sahip enjeksiyon süresi belirlenmiştir.

5. SONUÇLAR

Bu çalışmada melatoninin kapiler elektroforez ile analizi için MEKC ve örnek sıkıştırma-MEKC yöntemleri geliştirilmiştir. MEKC yönteminin tayin sınırı melatoninin takviye tabletlerinde tayini için yeterli olduğundan bu yöntem tabletlerdeki melatonin miktarının kontrolü için uygulanmıştır. Bitki ve tohumlar içeriğinde melatonin miktarı çok düşük olduğundan doğal gıda ürünlerinde melatonin analizi için örnek sıkıştırma-MEKC yöntemi geliştirilerek daha düşük tayin sınırlarına ulaşılmış ve bu yöntem hardal tohumlarında melatonin tayinini için uygulanmıştır.

5.1. MEKC Yöntemi ile Melatonin Tayini

5.1.1 Ayırma şartlarının seçimi

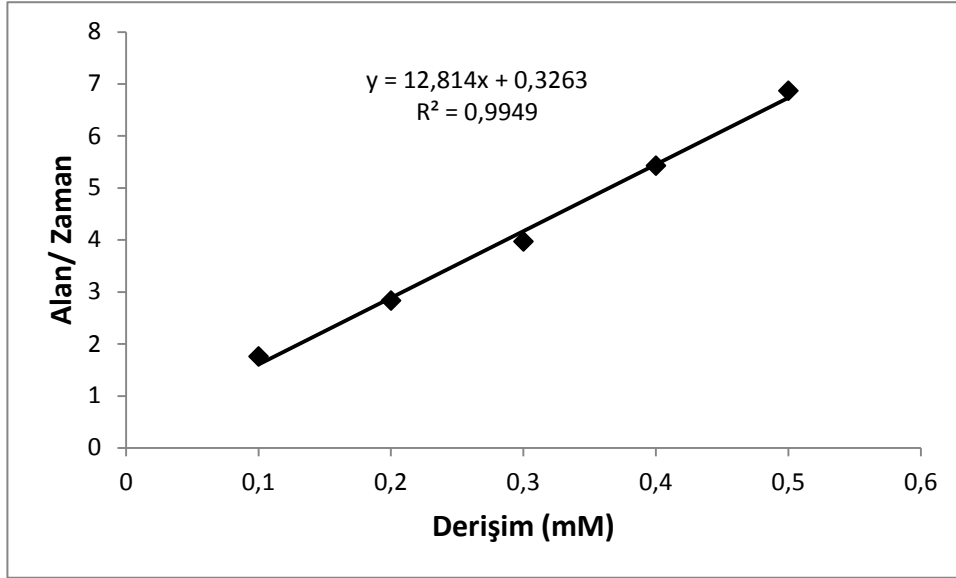
Melatoninin MEKC yöntemi ile ayrılmasında, ayırma ortamında kullanılan yüzey aktif madde sodyumdodesilsülfat (SDS) konsantrasyonu, tampon çözelti olarak seçilen fosfat konsantrasyonu, ortamın pH'ı, uygulanan voltaj değiştirilerek pik simetrisi, pik tespit sınırı, geliş süresi açısından optimal ayırma şartları sağlanmıştır. Denemeler sonucu, melatonin ayrılmasında en uygun ayırma şartlarının, tampon ortamı olarak: 30 mM fosfat, 70 mM SDS, pH: 3; Voltaj: -30 kV; Kapiler iç çapı: 75 µm, etkin boyu 55 cm, tam boyu 65 cm; enjeksiyon basıncı ve süresi 50 mBar, 6 s olduğu tespit edilmiştir.

5.1.2. MEKC yöntemi ile takviye tabletlerinde melatonin miktar tayini

Melatonin standart çözeltisi için en uygun MEKC yöntemi saptandıktan sonra yöntem ticari melatonin takviye tabletlerinde melatonin analizi için uygulanmıştır.

5.1.2.1. Kalibrasyon grafiğinin oluşturulması

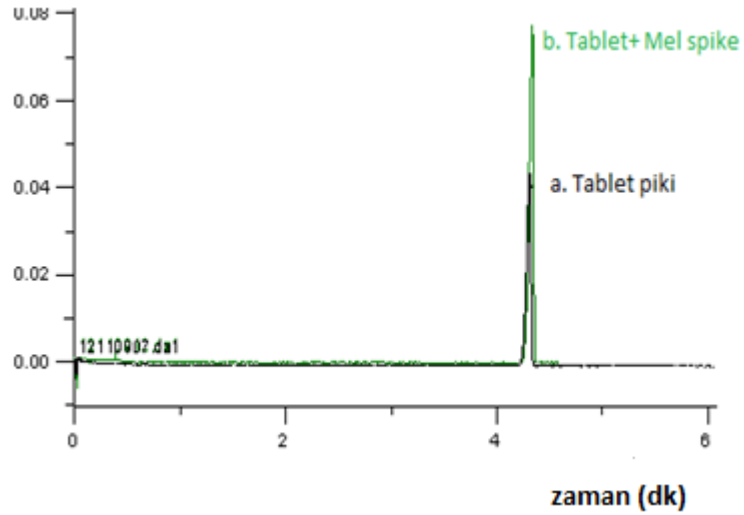
10,20,30,40 ve 50 mM konsantrasyonlara sahip melatonin standartları ile kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Kalibrasyon grafiği, kalibrasyon denklemi ve regresyon değeri Şekil 5.1 de verilmiştir.



Şekil 5.1 : Melatonin kalibrasyon grafiği

5.2.1.2. Miktar tayini

Şekil 5.2’de takviye tabletine ait elektroferogram verilmiştir. Tablette sadece melatonin piki görülmesine rağmen, tablet çözeltisi melatonin örneği ile spike yapılarak melatonin varlığı kontrol edilmiştir. Burada gözlenen melatonin pikinin alan/zaman değeri kalibrasyon eğrisine ait denklemde yerine konularak, tabletteki melatonin miktarı $5,03 \pm 0,04$ mg/tablet olarak hesaplanmıştır. Bulunan değer ticari tabletin etiketinde belirtilen miktar 5 mg ile uyumludur.



Şekil 5.2 : Takviye tableti elektroferogramı

Tekrarlanırlık sonuçları düzeltilmiş pik alanları için %RSD cinsinden %2,58 olarak bulunmuştur. Yöntemin LOD değeri, ortalama gürültü miktarının üç katı sinyale eşdeğer konsantrasyon değerleri olarak 298 ng/mL olarak tespit edilmiştir.

Geri kazanım çalışmaları, örneklere üç ayrı derişimde melatonin standartları eklenmesi ile gerçekleştirilmiştir. Tatmin edici geri kazanım değerleri bulunmuş ve sonuçlar çizelge 5.2’de verilmiştir.

Çizelge 5.2 : MEKC ile takviye tabletlerinde melatonin tayinine ait geri kazanım değerleri

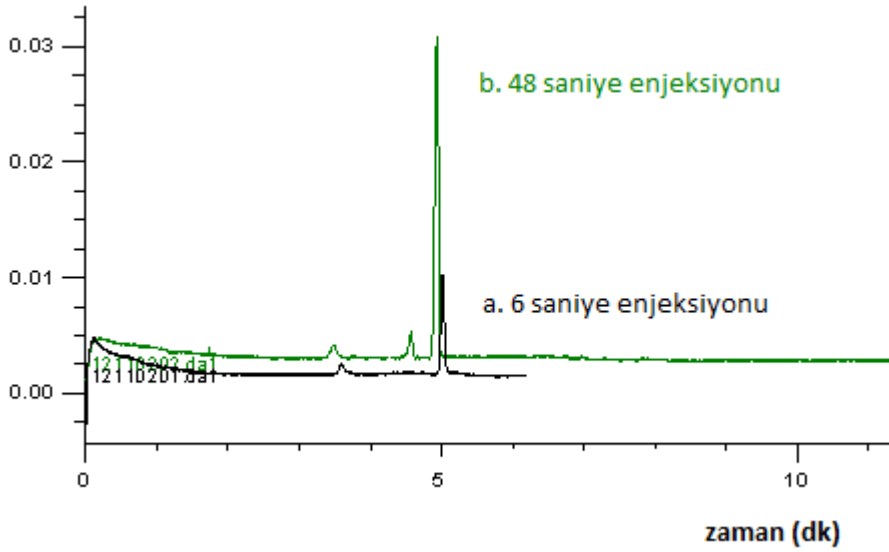
Örnek	Eklenen Miktar (mM)	% Geri Kazanım
Tablet	0,2	96
Tablet	0,3	95
Tablet	0,4	99,9

5.2. MEKC’de Örnek Sıkıştırma Yöntemi İle Melatonin Tayini

5.2.1 Ayırma şartlarının seçimi

0.05 mM melatonin standart çözeltisi ve 10 mM SDS içeren örnek çözeltisi içinde hazırlanarak, 70mM SDS ve 30mM fosfat içeren pH 3 deki ayırma ortamına 50 mBar basınçta sırasıyla 6, 12, 18, 24, 36, 48, 54 ve 60 saniye enjeksiyon sürelerinde enjekte edilmiş ve her bir enjeksiyon süresi için melatonin pikinin LOD değerleri

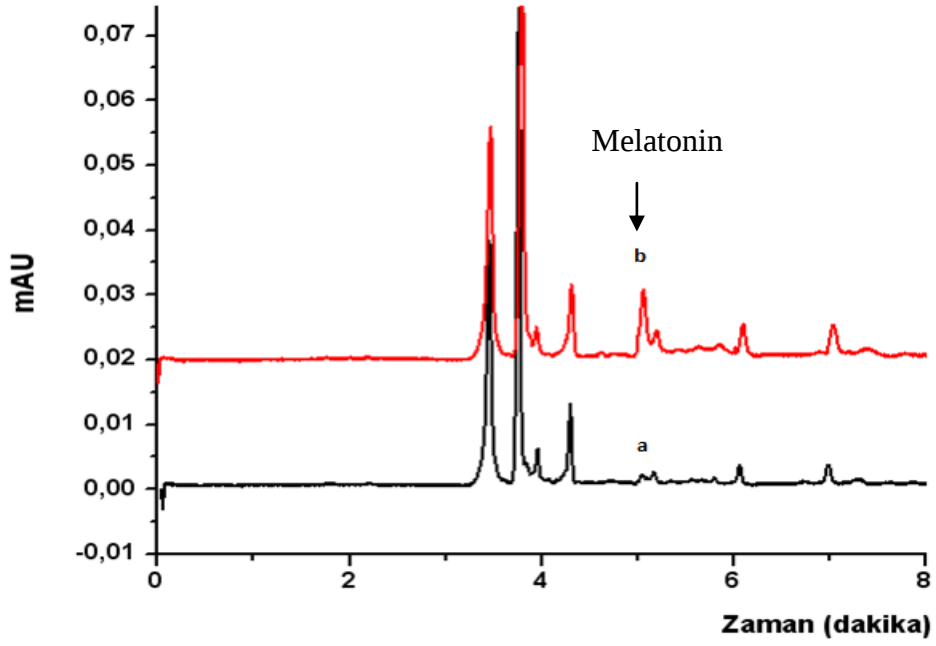
tespit edilmiştir. 48 saniyeye kadar pik boylarının arttığı ve LOD değerlerinin düştüğü, 48 saniyeden sonra ise pik şekillerinin bozulduğu ve dişli piklerin gelmeye başladığı gözlenmiştir. Bu nedenle 48 saniye optimal enjeksiyon süresi olarak tespit edilmiştir. Örnek çözeltisine alkol ilavesi denenmiş ancak alkol ilavesinin LOD değerini iyileştirmediği ve melatonin pikinin geliş süresini arttırdığı gözlenmiştir. Şekil 5.3’de normal MEKC ayırımında kullanılan 6 saniye enjeksiyon süresi ve örnek sıkıştırma şartlarında kullanılan 48 saniye enjeksiyon süresinde enjekte edilen melatonin pikinin karşılaştırılması görülmektedir. Aynı örnek çözeltisi için örnek sıkıştırma ile sinyal/gürültü oranı 10 kat arttırılmıştır.



Şekil 5.3 : 6 saniye ve 48 saniye örnek enjeksiyonuna ait elektroferogramlar

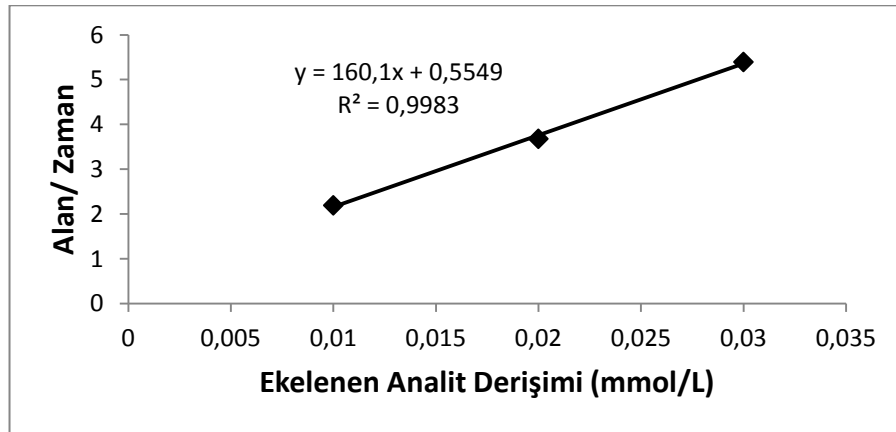
5.2.2 Örnek sıkıştırma yöntemi ile hardal tozunda melatonin tayini

Hardalda melatonin tayini için 48 saniye enjeksiyon ile örnek sıkıştırma yöntemi uygulanmıştır. Hardal örneğinin elektroferogramında, hardal içeriğinde bulunan çok sayıda bileşene ait pik gözlenmiştir. Örneğe melatonin standardı eklendiğinde, diğer piklerin boyları sabit kalırken melatonine ait olduğu düşünülen pikin boyunun artması melatonin tespitinin gerçekleştiğini göstermiştir. Hardala ait elektroferogram şekil 5.4’de verilmiştir.



Şekil 5.4: Hardala ait elektroferogram ((a) Hardal örneğinin kendisine ait pik
(b)Hardal örneği + melatonin spike piki)

Gözlenen bu pikten, melatoninin hardaldaki miktarı standart ekleme metodu ile tespit edilmiştir. Şekil 5.5 bu metoda ait standart ekleme grafiğini, kalibrasyon doğrusu denklemini ve regresyon değerini göstermektedir.



Şekil 5.5: Standart ekleme grafiği

Grafikte eğilim çizgisinin x eksenini kestiği noktadan yararlanarak hardaldaki melatonin miktarı $84,29 \pm 0,12$ ng/g olarak bulunmuştur. Bulunan değer literatür değerleri ile uyumludur [63].

Tekrarlanırlık sonuçları düzeltilmiş pik alanları için %RSD cinsinden %2,42 olarak bulunmuştur. Yöntemin LOD değeri 28.8 ng/mL olarak tespit edilmiştir.

6. TARTIŞMA VE YORUM

Yapılan denemeler sonucu melatonin hormonunun MEKC yöntemi ile analizleri uygun tampon olarak seçilen pH 3'te 70 mM SDS ve 30 mM fosfat çözeltisinde 6 saniye hidrokinamik enjeksiyon ile gerçekleştirilmiştir. Yöntemin tekrarlanırlık değeri % 2,58 (%RSD) olarak hesaplanmıştır. Melatonin minimum tespit sınırı (LOD) 0,288 µg/mL olarak saptanmıştır. Bu metot ile 5 mg/tablet melatonin içeren takviye tabletlerinde melatonin analizine uygulanmış ve melatonin miktarı 5,03±0,04 mg/tablet olarak bulunmuştur. Analizin geri kazanım değerleri ise %96-99,9 değerleri arasında çıkmıştır.

Gıda örneklerinde melatonin analizini gerçekleştirebilmek amacıyla metodun LOD değerini düşürmek için örnek sıkıştırma yöntemi geliştirilmiş, örnekler 10 mM SDS çözeltisi içinde hazırlanarak, 48 saniye hidrokinamik enjeksiyon ile 50 mBar basınçta enjekte edilmişlerdir. Melatonin ayrımı bu şartlar altında sağlanmış ve metoda ait tekrarlanırlık değerleri %RSD cinsinden %2,42 olarak bulunmuştur. LOD değeri 28,8 ng/g olarak hesaplanmıştır. Örnek sıkıştırma yöntemi toz hardalda melatonin miktarı tayinine uygulanmış ve melatonin miktarı 84,29±0,12 ng/g olarak tayin edilmiştir.

Çalışmada geliştirilen MEKC yönteminin tayin sınırı takviye tabletleri içinde melatonin içeriğinin kontrolü için uygun bir yöntem olarak saptanmıştır.

Örnek sıkıştırma yöntemi uygulanarak, MEKC yönteminde melatonin tayini için minimum tespit sınırı 10 kat düşürülmüştür. Bu yöntem de bitki, tohum ve meyve örneklerinde melatonin varlığını ve miktarını tespit etmek için uygun bir yöntem olarak sunulmuştur.

KAYNAKLAR

- [1] **Skoog, D.A., Holler, F.J., and Nieman, T.A.** (1998) .Enstrümantal Analitik İlkeleri, Bilim Yayıncılık, Ankara.
- [2] **Baker, D.R.** (1995). Capillary Electrophoresis, John Wiley and Sons Inc, USA.
- [3] **Hevia, D., Botas, C., Sainz, R.M. , Quiros, I., Blanco, D., Tan, D.X., Gomez Cordoves, C., Mayo, J.C.** (2010). Development and Validation of New Methods for the Determination of Melatonin and Its Oxidative Metabolites by HPLC and CE, Using Multivariate Optimization, *Journal of Chromatography*, 1217, 1368-1374.
- [4] **Özden S., Ertan, R., Akı-Şener, E., Yalçın İ.** (2004). Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Pratikleri 1-2.
- [5] **Kok, W.** (2000). Capillary Electrophoresis: Instrumentation and Operation, Wiesbaden : Vieweg, Germany.
- [6] **Cansever M.Ş.** (2010). *Metabolik Hastalıkların Teşhisinde Kapiler Elektroforez*, (doktora tezi), İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [7] **Heiger D.** (2000). High Performance Capillary Electrophoresis An Introduction, Agilent Technologies, Germany.
- [8] **Engelhardt, H., Beck, W., Schmitt, T.** (1996). Capillary Electrophoresis Methods and Potentials, Vieweg , Germany.
- [9] **Hjérten, S.** (1990). Zone Broadening in Electrophoresis With Special Reference to High Performance Electrophoresis in Capillaries: An Interplay Between Theory and Practice, *Electrophoresis*, 11, 665–690.
- [10] **Grossman, P. D.** (1992). Capillary Electrophoresis: Theory and Practice, Academic, London.
- [11] **Manz, A., Pamme, N., Jossifidis, D.** (2004). Bioanalytical Chemistry, Imperial College Press, London.
- [12] **Altria, K.D.** (1996). Capillary Electrophoresis Guidebook: Principles, Operations and Applications, Humana Pres Inc., New Jersey.
- [13] **Osborn, D., M., Weiss, D., J., Lunte, C.E.** (2000). Online Preconcentration methods for Capillary Electrophoresis, *Electrophoresis*, 21, 2768-2779.
- [14] **Li, S.F.Y.** (1992). Capillary Electrophoresis Principles, Practice and Applications, Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- [15] **Kocatürk, N.** (2002). *İnorganik Anyonların Kapiler Elektroforez Yöntemi ile Tayininde Yüksek Tuz Etkisinin İncelenmesi ve Deniz Suyunda Bromat Tayini*, (yüksek lisans tezi) , İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

- [16] **Everaerts, F.M., Beckers, J.L., Verheggen, P.E.M.** (1976). *Isotachophoresis: Theory, Instrumentation and Applications*, Elsevier, Amsterdam.
- [17] **Cinnioglu C., Cengiz S.** (2004). STR HUM THO1'in PCR Ürünlerinin Kapiller Jel Elektroforezi, *Adli Tıp Dergisi*, 18(1), 1-5.
- [18] **Terabe, S.** (1989). Electrokinetic chromatography: an interface between electrophoresis and chromatography, *Trends Analytical Chemistry*, 8, 129-134.
- [19] **Şener, G.** (2010). Karanlığın Hormonu: Melatonin, *Marmara Eczacılık Dergisi*, 14, 112-120.
- [20] **Reiter, R.J.** (1991). Pineal Melatonin: Cell Biology of Its Synthesis and of Its Physiological Interactions, *Endocrine Reviews*, 12, 151-180.
- [21] **Gürkök, A. G.** (2007). *Biyolojik Önemi Olan İndol Türevi Bileşiklerin Sentezleri, Yapı Aydınlatmaları Ve Aktivitelerinin Değerlendirilmesi*, (yüksek lisans tezi), Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [22] **Palabıyık, O.** (2003). *Farklı Türlerde Kanserli Hastalarda Melatonin Salınım Ritmi Ve G Protein Mutasyonları*, (yüksek lisans tezi), Trakya Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Edirne.
- [23] **Shermhammer, E. , Rosner, B. , Willett, W., Laden, F., Colditz, G., Hankinson, S.** (2004). Epidemiology of Urinary Melatonin in Women and Its Relation to Other Hormones and Night Work, *Cancer Epidemiology*, 6(1), 10-14.
- [24] **Arendt, J.** (1995). *The Pineal Gland: Basic Physiology and Clinical Implications*, Endocrinology, 3rd Edition, W.B. Saunders, Philadelphia, 433-442.
- [25] **Lewy, A.J., Wehr, T.A., Goodwin, F.K.** (1980), Light Suppresses Melatonin Secretion in Humans, *Science*, 210, 1267-9.
- [26] **Özkay, M., Yıldırım, M., Yıldırım, N.** (1987). Pineal Organ ve Fonksiyon Bozuklukları, *Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 4(2-3), 283-295.
- [27] **Erlich, S.S., Apuzzo, M.L.J.** (1985) The Pineal Gland: Anatomy, Physiology and Clinical Significance, *Journal of Neurosurgery*, 63, 321-341.
- [28] **Pekmez, H.** (2004). *Melatonin Hormonunun Miyometriyum Kasılması Üzerindeki Etkileri*, (doktora tezi), Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- [29] **Brzezinski, A.** (1997). Melatonin in Humans, *The New England Journal of Medicine*, 336, 186-195.
- [30] **Rojansky, N., Brzezinski, A., Schenker, J.G.** (1992). Seasonality in Human Reproduction : an Update, *Human Reproduction*, 7, 735-745.
- [31] **Keleştimur, H.** (1996). İnsanda Pineal Bezin Fonksiyonları, *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 10(1), 141-147.

- [32] Poon, A.M., Liu, Z.M., Pang, C.S., Brown, G.M., Pang, S.F. (1994). Evidence for a Direct Action of Melatonin on The Immune System, *Biol Signals*, 3, 107-117.
- [33] Reiter , R.J., Calvo, J.R., Karbownik, M., Qi, W., Tan, D.X. (2000). Melatonin and Its Relation to the Immune System and Inflammation, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 917, 376-386.
- [34] Vardar, S.A. (2002). *Sıçan Beyni Kan Akımına Eksojen Melatoninin Akut Etkisi*, (doktora tezi), Trakya Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Edirne.
- [35] Gürsoy, T. (2007). *Van Yöresinde Yetişen Van Gölü Balığı (İnci Kefali) Ve Alabalıkta Melatonin Hormonunun Ölçülmesi*, (yüksek lisans tezi), Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.
- [36] Reiter, R. J., Guerrero, J. M. , Garcia, J.J., Acuna Castroviejo, D. (1998) Reactive Oxygen Intermediates, Molecular Damage and Aging : Relation to Melatonin, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 854, 410-424.
- [37] Pieri, C., Marra, M., Moroni, F., Recchioni, R., Marcheselli, F. (1994). Melatonin: A Peroxyl Radical Scavenger More Effective Than Vitamin E, *Life Sciencies*, 55, 271-276.
- [38] Rieter, R.J., Tan, D.X., Qi, W., Manchester, L.C., Karbownik, M., Calvo, J.R. (2000). Pharmacology And Physiology Of Melatonin In The Reduction Of Oxidative Stres In Vivo, *Biological Signals and Receptors*, 9, 160-171.
- [39] Pablos, M.I., Reiter, R.J., Chuang, J.I., Ortiz, G.G., Guerrero, J.M., Sewerynek, E. (1997). Acutely Administered Melatonin Reduces Oxidative Damage In Lung And Brain Induced By Hyperbaric Oxygen, *Journal of Applied Physiology*, 83, 354-358.
- [40] Hevia, D., Botas, C., Sainz, R.M. , Quiros, I., Blanco, D., Tan, D.X., Gomez Cordoves, C., Mayo, J.C. (2010). Development and Validation of New Methods for the Determination of Melatonin and Its Oxidative Metabolites by HPLC and CE, Using Multivariate Optimization, *Journal of Chromatography*, 1217, 1368-1374.
- [41] Di, W.L., Kadva, A., Djahanbakhch, O., Silman, R. (1998). Radio immunoassay of bound and free melatonin in plasma, *Clinical Chemistry*, 44 (2), 304 – 310.
- [42] Chegini, S., Ehrhart-Hofmann, B., Kaider, A., Waldhauser, F. (1995). Direct Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Radioimmunoassay for Melatonin Compared, *Clinical Chemitry*, 41(3), 381-386.
- [43] Rebollar, P.G., Ubilla, E., Peleteiro J.B., Agapito M.T., Alvariano J.M. (1999). Determination of plasma melatonin levels by enzyme-linked immunosorbent assay (EIA) in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) and tench (*Tinca tinca* L.), *Journal of Physiology and Biochemistr*, 55(4), 341-347.
- [44] Simonin, G., Bru, L., Lelievre, E., Jeanniot, J.P., Bromet, N., Walther, B., Boursier, C. (1999). Determination of Melatonin in Biological

Fluids in the Presence of the Melatonin Agonist S20098: Comparison of Immunological Techniques and GC-MS Methods, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 21, 591-601.

- [45] Rolcík, J., Lenobel, R., Siglerová, V., Strnad, M. (2002). Isolation of Melatonin by Immunoaffinity Chromatography, *Journal of Chromatography B*, 775(1), 9-15.
- [46] Chan, K.C., Muschik, G.M., Issaq, H.J. (1995). Separation of Tryptophan and Related Indoles by Micellar Electrokinetic Chromatography with KrF Laser-Induced Fluorescence Detection, *Journal of Chromatography*, 718(1), 203-210.
- [47] Chen, G., Cheng, J., Ye, J. (2001). Application of a Novel Micro-Injector in The Determination of Indole Derivatives in The Rat Pineal Gland by Capillary Electrophoresis with Electrochemical Detection , *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 370(7) , 930-934.
- [48] You, T., Liu, Z., Yang, Z., Wang, E. (1999). End-Column Amperometric Detection of Melatonin by High Performance Capillary Electrophoresis, *Talanta*, 49, 517-521.
- [49] Ding, X., Cao, Z., Ye, J. (2000). Determination of Melatonin and Pyridoxine in Pharmaceutical Preparations for Health-Caring Purposes by Capillary Electrophoresis with Electrochemical Detection, *Analytica Chimica Acta*, 408, 249-256.
- [50] Cartoni, G. P. , Coccioli, F. , Jasionowska, R. , Masci, M. (2000) Rapid Analysis of Melatonin in Pharmaceutical Tablets by Capillary Electrophoresis with UV Detection, *Chromatographia*, 52, 603-606.
- [51] Pesek, J.J., Matyska, M.T. (1998). The Analysis of Melatonin, Tryptamine and Serotonin by HPCE and CEC, *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.*, 21, 2923-2935.
- [52] Pucci, V., Ferranti, A., Mandrioli, R., Raggi, M.A.(2003). Determination of Melatonin in Commercial Preparations by Micellar Electrokinetic Chromatography and Spectrofluorimetry, *Analytica Chimica Acta*, 488, 97-105.
- [53] Hejger, D. N., Herold, M., Grimm, R. (1992). Application of Hewlett Packard 3D Capillary Electrophoresis System, Vol.1, Hewlett-Packard, Waldbronn.
- [54] Mikkers, F.E.P., Everaerts, F.M., Verheggen, Th.P.E.M. (1979). High Performance Zone Electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, 169, 11-20.
- [55] Quirino, J.P., Terabe, S. (2000). Sample Stacking of Cationic and Anionic Analytes in Capillary Electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, 902, 119-135.
- [56] Garcia-Parrilla, M. C., Cantos, E., Troncoso, A.M. (2009). Analysis of Melatonin in Foods, *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, 177-183.
- [57] Tan, D.X., Manchester, L.C., Terron, M.P., Flores L.J., Reiter, R.J. (2007). One Molecule, Many Derivatives: A Never-Ending Interaction of

Melatonin With Reactive Oxygen and Reactive Nitrogen Species, *Journal of Pineal Research* , 42, 28-42.

- [58] **Tan, D.X., Chen, L.D., Poeggeler, B., Manchester, L.C., Reiter, R.J.** (1993) Melatonin : a Potent, Endogenous Hydroxyl Radical Scavenger, *Endocrine Journal*, 1, 57-60.
- [59] **Van Tassel , D.L., Roberts, N., Lewy, A., O'Neill, S.D.** (2001). Melatonin in Plant Organs, *Journal of Pineal Research*, 31, 8-15.
- [60] **Pape, C., Luening, K.** (2006). Quantification of Melatonin in Phototrophic Organism, *Journal Of Pineal Research*, 41, 157-165.
- [61] **De la Puerta, C., Carrascosa-Salmoral, M.P., Garcia-Luna, P.P., Lardone, P.J., Herrera, J.L., Fernandez- Montesinos, R., Guerrero, J.M., Pozo, D.** (2007) Melatonin is a Phytochemical in Olive Oil, *Food Chemistry*, 104, 609-612.
- [62] **Reiter, R.J., Manchester, L.C., Tan, D.X.** (2005). Melatonin in Walnuts: Influence on Levels of Melatonin and Total Antioxidant Capacity of Blood, *Nutrition*, 21, 920-924.
- [63] **Manchester, L.C., Tan, D.X., Reiter, R.J., Park, W., Monis, K., Qi, W.** (2000). High Levels of Melatonin in The Seeds of Edible Plants: Possible Function in Germ Tissue Protection, *Life Science*, 67, 3023-3029.
- [64] **Guerrero, J.M., Martinez-Cruz, F., Elorza F.L.** (baskıda). Significant Amounts of Melatonin in Red Wine: Its Consumption Increases Blood Melatonin Levels in Humans, *Food Chemistry*.
- [65] **Ramakrishna A., Giridhar, P., Sankar, K.U., Ravinshankar, G.A.** (2012). Melatonin And Serotonin Profiles in Beans of Coffee Species, *Journal of Pineal Research* , 52(4), 470-476.

ÖZGEÇMİŞ



Ad Soyad: Ezgi Kızılkonca

Doğum Yeri ve Tarihi: İstanbul, 06.03.1988

Adres: Göztepe, Kadıköy/ İstanbul

E-Posta: ezgikonca@hotmail.com

Lisans: İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya, Haziran 2011

Yüksek Lisans: İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya, Ocak 2013

Mesleki Deneyim ve Sunumlar:

Ali Raif İlaç San. A.Ş., Kalite Kontrol Departmanı- Laboratuvar Stajı (Haziran 2010-Ağustos 2010)

Organik Kimya San. Tic. A.Ş., Üretim Departmanı- İşletme Stajı (Ocak 2011-Şubat 2011)

VI. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, Hatay, Türkiye- Poster Sunumu (3-7 Eylül 2012)

