



DÜZCE
ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**BİTKİSEL KAYNAKLARDAN MELATONİN
SAFLAŞTIRILMASI VE FARMASÖTİK FORMDA
DEĞERLENDİRİLMESİ**

SÜMEYYE ZARF TOKAN

DOKTORA TEZİ

DOĞAL, BİTKİSEL VE KOZMETİK ÜRÜNLER ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

PROF. DR. UFUK KOCA ÇALIŞKAN

DÜZCE, 2025

T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİTKİSEL KAYNAKLARDAN MELATONİN
SAFLAŞTIRILMASI VE FARMASÖTİK FORMDA
DEĞERLENDİRİLMESİ

Sümeyye ZARF TOKAN tarafından hazırlanan tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından Düzce Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Doğal, Bitkisel ve Kozmetik Ürünler Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Ufuk KOCA ÇALIŞKAN

Düzce Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Ufuk KOCA ÇALIŞKAN

Düzce Üniversitesi

Prof. Dr. Haydar GÖKSU

Düzce Üniversitesi

Doç. Dr. Mert İLHAN

Düzce Üniversitesi

Prof. Dr. Seyhun YURDUGÜL

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Yasin HAZER

Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 18/07/2025

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

18 TEMMUZ 2025

Sümeyye ZARF TOKAN

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışma, Nobel İlaç san. ve tic. a.ş. Düzce Ar-Ge Merkez Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen başta Sayın Dr. Abdullah USLU ve İlksen GÜÇARSLAN olmak üzere tüm Nobel İlaç Ailesine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora Tez çalışmam boyunca, kıymetli bilgilerini ve engin tecrübelerini esirgmeden aktaran, bilimsel gelişimimde mevcut tüm olanaklardan faydalanmam için en büyük gayreti gösteren ve tabiki çalışma azmiyle her zaman örnek aldığım çok değerli Danışman Hocam Prof. Dr. Ufuk KOCA ÇALIŞKAN' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim boyunca gösterdikleri sabır ve anlayışlarından dolayı başta eşim Ziya TOKAN olmak üzere tüm aile fertlerime sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması, Düzce Üniversitesi BAP-2023.14.02.1384 numaralı Bilimsel Araştırma Projesi ve TÜBİTAK C118153 numaralı (BİDEB-2244 Üniversite-Sanayi İşbirliği Modeli) proje kapsamında desteklenmiştir. DÜBAP ve TÜBİTAK'a tüm desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

18 Temmuz 2025

Sümeyye ZARF TOKAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ŞEKİL LİSTESİ	viii
ÇİZELGE LİSTESİ	xi
KISALTMALAR	xii
SİMGELER	xiv
ÖZET	xv
ABSTRACT	xvi
EXTENDED ABSTRACT	XIVii
1. GİRİŞ	1
1.1. MELATONİN VE TARİHÇESİ	1
1.1.1. Kimyasal Yapı ve Özellikleri	2
1.1.2. Melatonin Biyosentezi	3
1.1.3. Melatoninin Salgılanması	6
1.1.4. Melatoninin Temel Biyolojik Aktiviteleri	7
1.1.5. İnsan, Hayvan ve Bitkide Melatoninin Rolü	8
1.2. BİTKİ MELATONİNİ (FİTOMELATONİN)	9
1.2.1. Fitomelatonin Biyosentezi	10
1.2.2. Bitkilerde Fitomelatoninin Rolü	11
1.2.3. Çeşitli Bitki Ailelerindeki Fitomelatonin İçeriği	13
1.3. MELATONİNİN BİTKİLERDEN EKSTRAKSİYONU VE ANALİTİK METOT ÇALIŞMALARI	20
1.4. MELATONİNİN FARMASÖTİK FORMUNA YÖNELİK YAPILAN ÇALIŞMALAR	21
1.4.1. Yumuşak Tablet Formülasyonu	22
1.5. TEZİN GENEL AMACI	23
2. MATERYAL VE YÖNTEM	255
2.1. BİTKİ MATERYALİNİN TEMİNİ	2HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
2.2. CİHAZLAR	25
2.3. KİMYASAL MADDELER VE REAKTİFLER	26
2.4. KİMYASAL ÇÖZELTİLER VE HAZIRLANIŞLARI	26
2.5. MELATONİN EKSTRAKSİYONU ÇÖZÜCÜ SEÇİMİ	27
2.6. MELATONİN EKSTRAKSİYON PROSEDÜRÜ	28
2.6.1. Melatonin Ekstraksiyonuna Işık ve Karanlık Etkisi	30

2.7. MELATONİN İÇERİĞİNİN HPLC-UV İLE KANTİTATİF TAYİNİ.....	30
2.8. MELATONİN SAFLAŞTIRILMA AŞAMALARI	31
2.9. SAFLAŞTIRILAN MELATONİN KARAKTERİZASYONU.....	32
2.9.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) ile Analizi	33
2.9.2. Raman Spektroskopisi ile Analizi.....	33
2.9.3. LC-MS ile Analizi.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
2.10. MELATONİNİN FARMASÖTİK FORMDA DEĞERLENDİRİLMESİ	3HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
2.10.1. Yumuşak Tablet Formunun Hazırlanması	35
2.11. YUMUŞAK TABLET FORMUNUN KARAKTERİZASYON ANALİZLERİ	38
2.11.1. Yumuşak Tablet Değerlendirme Parametreleri.....	38
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	41
3.1. BİTKİ ÖRNEKLERİNDEN EKSTRE EDİLEN MELATONİNİN HPLC-UV ANALİZİ SONUÇLARI VE DEĞERLENDİRİLMESİ	41
3.1.1. Melatonin Ekstraksiyonunda En Uygun Çözücünün Belirlenmesi	41
3.1.2. Melatonin Ekstraksiyonuna Işık ve Karanlık Etkisi.	42
3.1.3. Melatonin Ekstraksiyon Sonuçları ve Değerlendirilmesi.....	42
3.2. MELATONİN SAFLAŞTIRILMASI VE SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ	50
3.3. SAFLAŞTIRILAN MELATONİN KARAKTERİZASYON ANALİZ SONUÇLARI VE DEĞERLENDİRİLMESİ	51
3.3.1. Saflaştırılan Melatoninin FTIR Analizi ve Sonuçlarının Değerlendirilmesi. 51	
3.3.2. Saflaştırılan Melatoninin Raman Analizi ve Sonuçlarının Değerlendirilmesi	52
3.3.3. Saflaştırılan Melatoninin LC-MS Analizi ve Sonuçlarının Değerlendirilmesi	53
3.4. MELATONİNİN FARMASÖTİK FORMA DÖNÜŞTÜRÜLMESİ VE SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ	54
3.4.1. Yumuşak Tablet Formu Değerlendirme Parametrelerinin Sonuçları.....	55
4. SONUÇ	58
5. KAYNAKÇA	60
ÖZGEÇMİŞ	

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. 1. MEL 'in kimyasal yapısı	2
Şekil 1. 2. Melatoninin biyosentez yolağı.....	4
Şekil 1. 3. Triptofan aminoasidinden hareketle melatonin sentez aşamaları	5
Şekil 1. 4. Bitkilerde (Fito) Melatonin biyosentezi	11
Şekil 2. 1. Kurutulmuş bitki örneklerinde yapılan melatonin ekstraksiyonunun aşamaları	29
Şekil 2.2. HPLC-UV cihazından saflaştırılan melatoninin karakterizasyon analizi için kullanılan FTIR, RAMAN ve LC-MS cihaz sistematiğı	32
Şekil 2.3. Liyofilizatör cihazında kurutulan melatonin numunesine, FTIR cihazında yapılan karakterizasyon analizi.....	33
Şekil 2.4. Liyofilizatör cihazında kurutulan melatonin numunesine, RAMAN cihazında gerçekleştirilen karakterizasyon analizi.....	34
Şekil 2.5. HPLC-UV cihazından saflaştırılan melatoninin, LC-MS cihazında gerçekleştirilen karakterizasyon analizi.....	35
Şekil 2.6. Yumuşak tablet formunu hazırlama adımları.....	37
Şekil 2.7. Yumuşak tablet formunun dağılma cihazında gerçekleştirilen karakterizasyon analizi.....	38
Şekil 2.8. Yumuşak tablet formunun nem cihazında gerçekleştirilen karakterizasyon analizi.....	39
Şekil 2.9. Yumuşak tablet formunun sertlik cihazında gerçekleştirilen karakterizasyon analizi.....	39
Şekil 2.10. Yumuşak tablet formunun pH metre kullanılarak gerçekleştirilen karakterizasyon analizi	40
Şekil 3. 1. MeOH: Saf Su: 0,1M HCl (700:299:1) çözücüsü ile hazırlanan 1000 ppm konsantrasyonda melatonin standardı HPLC-UV kromotogramı (0.5 mL/dk, 20 µL ve 280 nm)	43
Şekil 3. 2. Melatonin standart eğri grafiğı	43
Şekil 3. 3. Sakarya adaçayı (MeOH: Saf Su: 0,1M HCl (700:299:1) bitki örneğine ait HPLC-UV analizi kromotogramı.....	45
Şekil 3. 4. Sakarya adaçayı (bütanol) bitki örneğine ait HPLC-UV analizi kromotogramı	45
Şekil 3. 5. Konya adaçayı (MeOH: Saf Su: 0,1M HCl (700:299:1) bitki örneğine ait HPLC-UV analizi kromotogramı.....	46
Şekil 3. 6. Konya adaçayı (bütanol) bitki örneğine ait HPLC-UV analizi kromotogramı	46
Şekil 3. 7. Düzce Sarı kantaron (MeOH: Saf Su: 0,1M HCl (700:299:1) bitki örneğine ait HPLC-UV analizi kromotogramı.....	46
Şekil 3. 8. Düzce Sarı kantaron (bütanol) bitki örneğine ait HPLC-UV analizi kromotogramı.....	47
Şekil 3. 9. Konya Sarı kantaron (MeOH: Saf Su: 0,1M HCl (700:299:1) bitki örneğine ait HPLC-UV analizi kromotogramı.....	47
Şekil 3. 10. Konya Sarı kantaron (bütanol) bitki örneğine ait HPLC-UV analizi kromotogramı.....	47
Şekil 3. 11. Sakarya Ihlamur (MeOH: Saf Su: 0,1M HCl (700:299:1) bitki örneğine ait HPLC-UV analizi kromotogramı.....	48

Şekil 3. 12. Sakarya Ihlamur (bütanol) bitki örneğine ait HPLC-UV analizi kromotogramı	48
Şekil 3. 13. Papatya (MeOH: Saf Su: 0,1M HCl (700:299:1) bitki örneğine ait HPLC-UV analizi kromotogramı	48
Şekil 3. 14. Papatya (bütanol) bitki örneğine ait HPLC-UV analizi kromotogramı.....	49
Şekil 3. 15. Melisa (MeOH: Saf Su: 0,1M HCl (700:299:1) bitki örneğine ait HPLC-UV analizi kromotogramı	49
Şekil 3. 16. Melisa (bütanol) bitki örneğine ait HPLC-UV analizi kromotogramı.....	49
Şekil 3. 17. Şekerotu (MeOH: Saf Su: 0,1M HCl (700:299:1) bitki örneğine ait HPLC-UV analizi kromotogramı	50
Şekil 3. 18. Şekerotu bitki örneğinden saflaştırılan melatonine ait HPLC-UV analiz kromotogramı.....	50
Şekil 3. 19. 1000 ppm konsantrasyonda melatonin standardı HPLC-UV analiz kromotogramı.....	51
Şekil 3. 20. Saflaştırılan liyofilize melatoninin FTIR spektrumu.....	51
Şekil 3. 21. Saflaştırılan liyofilize melatoninin Raman spektrumu	52
Şekil 3. 22. Melatonin standardı LC-MS analiz kromotogramı	53
Şekil 3. 23. Saflaştırılan melatoninin LC-MS analiz kromotogramı	53
Şekil 3. 24. Saflaştırılan melatoninin yavru iyonlarının LC-MS analiz kromotogramı .	54
Şekil 3. 25. Bitkisel melatonin içeren yumuşak tablet formülasyonu	55

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa No

Çizelge 1. 1. Çeşitli bitkilerdeki melatonin seviyeleri ve tespit yöntemleri.	14
Çizelge 2. 1. Çeşitli çözücülerle 100 ppm konsantrasyonunda standart hazırlanması ..	27
Çizelge 2. 2. 1000 ppm standart stok çözeltisinden çeşitli konsantrasyonlarda standart hazırlanması	30
Çizelge 2. 3. Yumuşak tablet formunun formülasyon bileşenleri	36
Çizelge 3. 1. Melatonin ekstraksiyonunda kullanılan 100 ve 1000 ppm konsantrasyonlarındaki çözücülerin HPLC-UV analizi ile belirlenen alanları.....	41
Çizelge 3. 2.Bitki örneklerinin MEL içeriğinin HPLC-UV analizi ile belirlenen miktarları	44
Çizelge 3. 3. Yumuşak tablet formu organoleptik analiz değerlendirmesi	56
Çizelge 3. 4. Yumuşak tablet formuna ait çeşitli parametrelerin sonuçları.....	56

KISALTMALAR

ACN	Asetonitril
AFMK	N ¹ -Asetil- N ² -Formil 5-Metoksikinuramin
AMK	N ¹ -Asetil-5-Metoksikinuramin
ASMT	Asetil Serotonin Metiltransferaz
CD-	Siklodekstrin- Modifiyeli Miseller
MEKC	Elektrokinetik Kromatografi
CEC	Kapiler elektrokromatografi
COMT	Kafeik asit-O-Metiltransferaz
DW	Kuru Ağırlık (Dry Weight)
ECD	Elektrokimyasal dedektör
ELISA	Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Deneyi
ESI+	Pozitif İyon Elektrosprey Modu
EtOAc	Etil Asetat
EtOH	Etanol
FD	Floresan Dedektör
FTIR-	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi
ATR	Spektroskopisi
FW	Taze Ağırlık (Fresh Weight)
GC-MS	Gaz kromatografisi- Kütle spektrometresi
GSH	Glutasyon
HCL	Hidroklorik Asit
HIOMT	Hidroksiindol-O-Metiltransferaz
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi
LC-MS	Sıvı Kromatografisi- Kütle Spektrometresi
LC-FD	Sıvı Kromatografisi- Kütle Spektrometresi- Floresan Dedektör
MeCN	Asetonitril
MEL	Melatonin
MeOH	Metanol
m/z	Kütle/yük
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RNS	Reaktif Azot Türleri
RP-HPLC	Ters Faz- Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
SNAT	Serotonin N-Asetiltransferaz
SPE	Katı Faz Ekstraksiyon
TDC	Triptofan Dekarboksilaz
T5H	Triptamin 5- Hidroksilaz
TRP	Triptofan
UHPLC	Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
UV	Ultraviyole Dedektör

SİMGELER

°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
CH ₃ CN	Asetonitril
cm	Santimetre
dk	Dakika
g	Gram
H ₂ O	Su
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HO·	Hidroksil Radikali
HCl	Hidroklorik Asit
LOO·	Peroksil Radikali
M	Molar
mg	Miligram
mm	Milimetre
mL	Mililitre
N	Azot
N	Normal
ng	Nanogram
NH ₂	Amin
nm	Nanometre
NO·	Nitrik Oksit
ONOO·	Peroksinitrit Anyonu
¹ O ₂	Singlet Oksijen
ppm	Pikomol
rpm	Devir sayısı
sa	Saat

ÖZET

BİTKİSEL KAYNAKLARDAN MELATONİN SAFLAŞTIRILMASI VE FARMASÖTİK FORMDA DEĞERLENDİRİLMESİ

Sümeyye ZARF TOKAN

Düzce Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Doğal, Bitkisel ve Kozmetik Ürünler Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Ufuk KOCA ÇALIŞKAN

Temmuz 2025, 69 sayfa

Melatonin (MEL), son yıllarda dünya çapında giderek artan bilimsel ilgi görmektedir. N-asetil-5-metoksi triptamin ($C_{13}H_{16}N_2O_2$) olarak da bilinen MEL, esas olarak omurgalıların epifiz bezi tarafından ve ikincil olarak diğer doku ve organlar tarafından sentezlenebilen doğal bir hormondur. Önceleri sadece hayvansal bir hormon olarak bilinen MEL'in bitkilerde de var olduğu keşfinden sonra bu molekül üzerinde sayısız araştırma yapılmış ve bitkilerde de hayvanlardakine benzer görevler üstlendiği ortaya konulmuştur. Özellikle yenilebilir bitkilerde doğal olarak bulunan biyoaktif bileşiklere yönelik araştırmalar, beslenme ve sağlık açısından oldukça önemli olup daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Bu kapsamda Gümüşi Ihlamur (*Tilia tomentosa* Moench), Papatya (*Matricaria recutita* L.), Melisa (*Melissa officinalis* L.), Şekerotu (*Stevia rebaudiana* Bertoni), Adaçayı (*Salvia officinalis* L.) ve Sarı Kantaron (*Hypericum perforatum* L.) bitkilerinin kurutulmuş formlarından literatüre göre seçilen çözücülerle MEL ekstraksiyonu yapılmış, ekstrelerdeki MEL miktarları HPLC-UV ile hesaplanmıştır. En yüksek verim gözlemlenen *Stevia rebaudiana* Bertoni bitkisinde, melatonin saflaştırılıp LC-MS' de karakterizasyonu yapılmıştır. Saflaştırılan MEL'i farmasötik formda değerlendirmek için yumuşak tablet formu seçilmiş, karakterizasyon analizleri yapılmıştır. Özetle, bitki kaynaklı melatonin (fito-melatonin) yumuşak tablet formunda tasarlanarak başarıyla tamamlanmıştır.

Anahtar Sözcükler: Ekstraksiyon, HPLC, Melatonin (MEL), Miktar Tayini

ABSTRACT

PURIFICATION OF MELATONIN FROM HERBAL SOURCES AND EVALUATION IN PHARMACEUTICAL FORM

Sümeyye ZARF TOKAN

Düzce University

Graduate School, Department of Natural, Herbal and Cosmetic Products

Doctoral Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Ufuk KOCA ÇALIŞKAN

July 2025, 69 pages

Melatonin (MEL) has attracted increasing scientific interest worldwide in recent years. MEL, also known as N-acetyl-5-methoxy tryptamine ($C_{13}H_{16}N_2O_2$), is a natural hormone that can be synthesized primarily by the pineal gland of vertebrates and secondarily by other tissues and organs. After the discovery that MEL, previously known only as an animal hormone, also exists in plants, numerous studies have been conducted on this molecule and it has been revealed that it has similar functions in plants as in animals. Research on bioactive compounds found naturally in edible plants in particular is very important in terms of nutrition and health and more studies are needed. In this context, MEL extraction was performed with solvents selected according to the literature from dried forms of Linden (*Tilia tomentosa* Moench), Chamomile (*Matricaria recutita* L.), Melissa (*Melissa officinalis* L.), Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni), Sage (*Salvia officinalis* L.) and St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) plants, MEL amounts in the extracts were calculated by HPLC-UV. In the *Stevia rebaudiana* Bertoni) plant with the highest yield, melatonin was purified and characterized by LC-MS. To evaluate the purified MEL in pharmaceutical form, a soft tablet form was selected, and characterization analyses were conducted. In summary vegetable-based from melatonin (phito-melatonin) was designed and successfully completed in gummy formulation.

Keywords: Extraction, HPLC, Melatonin (MEL), Quantification

EXTENDED ABSTRACT

PURIFICATION OF MELATONIN FROM HERBAL SOURCES AND EVALUATION IN PHARMACEUTICAL FORM

Sümeyye ZARF TOKAN

Düzce University

Graduate School, Department of Natural, Herbal and Cosmetic Products

Doctoral Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Ufuk KOCA ÇALIŞKAN

July 2025, 69 pages

1. INTRODUCTION

The chemical structure of MEL, with its molecular formula $C_{13}H_{16}N_2O_2$ and molecular weight $232,28 \text{ g mol}^{-1}$, is an indolamine with a 3-amide side chain ($-\text{CH}_2\text{CONH}_2$) and a 5-methoxy side chain ($-\text{OCH}_3$) on the benzene ring. Various amounts of MEL have been detected in nearly all life forms, including eukaryotic single-celled organisms, prokaryotes, fungi, algae, animals, and plants. Melatonin performs different roles and functions at each organism level, depending on the tissue or organ where it is synthesized and secreted, either via the pineal or extrapineal pathway. In the animal and human body, melatonin primarily improves sleep quality by regulating the circadian rhythm (leep-wake cycle), in plants, it has a wide range of functions, from hormonal effects to antioxidant effects.

It has been reported that both plants and animals use tryptophan as a initial material to synthesize melatonin. However, it has been determined that the biosynthetic pathway in plants can follow more alternative pathways than in animals and has a higher capacity to adapt to metabolic changes. Tryptophan is first decarboxylated to tryptamine by tryptophan decarboxylase (TDC). Tryptamine is then converted to N-acetyltryptamine by serotonin N-acetyltransferase (SNAT). N-acetyltryptamine is converted to N-acetylserotonin by tryptamine 5-hydroxylase (T5H). N-acetylserotonin is methylated by an ASMT, producing (phyto)melatonin. It has been reported that N-acetylserotonin methylation can also be carried out by caffeic acid O-methyltransferase (COMT).

Since the first detection of melatonin in plants in 1995, numerous studies have shown that it occurs in varying concentrations in different plant species and tissues. Most of the genera investigated for melatonin content to date belong to important families due to their abundance or high economic value in the plant kingdom. These include the

dicotyledonous (two-cotyledonous) families Apiaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Fabaceae, Lamiaceae, Rosaceae, and Solanaceae; and the monocotyledonous (monocotyledonous) families Alliaceae, Poaceae, and Zingiberaceae.

Melatonin analysis is performed using various methods, including HPLC (High-Performance Liquid Chromatography), LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry), GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry), RIA (Radioimmunoassay), ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), ICA (Immunochromatographic Methods), and immunoprecipitation. HPLC is the most widely used technique for melatonin analysis and has been used in conjunction with various detectors such as FD, ECD, and UV. However, HPLC-UV is one of the most widely used detectors for determining melatonin in plants due to its lower cost and higher accuracy than MS detectors. Spectra with maximum absorbance at 280 nm can be obtained. LC-MS has proven to be a powerful method for melatonin analysis due to its high sensitivity, reproducibility, and accuracy. However, due to its low concentration and the complex structure of the plant extract, direct analysis of melatonin in plant tissues by LC-MS is impractical. Therefore, melatonin content in plant tissues can be increased by different sample purification techniques such as liquid-liquid extraction, solid phase extraction (SPE) or HPLC purification.

Melatonin is available in various pharmaceutical formulations for the treatment of sleep disorders, including tablets, capsules, gummies (soft tablet), drops, and sprays. However, plant-based melatonin supplements have gained popularity as potential sleep aids due to their fewer side effects compared to traditional medications. Gummies are a popular formulation type known for their texture and variety of flavors and the principal components are gelling agents, sugar, water, sweeteners, and flavorings. This thesis aims to combine herbal melatonin with the developed gummy form to evaluate it in pharmaceutical form.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. MELATONIN EXTRACTION, PURIFICATION AND QUANTITATIVE DETERMINATION BY HPLC-UV

Extraction was performed using a separatory funnel from dried plant samples of Linden, Chamomile, Melissa, St. John's Wort, Sage and St. John's Wort. 10 ml of extraction solvent was added to 1 g of dried plant sample. 20 min of sonication was followed by

centrifugation at 8500 rpm for 5 min. The supernatant was evaporated in the evaporator, 5 ml of water was added on top and transferred to the separating funnel. 3 ml of hexane, ethyl acetate and butanol were added separately to the water and shaken. The water and organic phases were taken into vials. The aqueous phase remaining in the separating funnel was evaporated again in the evaporator. The remaining solid was mixed with 2 ml of extraction solvent and sonicated for 5 min. Then, it was filtered through a PTFE 0.45 μm filter and given to HPLC.

Melatonin analysis in the extracted plant samples was performed with HPLC-UV. The mobile phase prepared as MeOH: Pure Water: Acetic Acid (550:449:1) and ACE 5 C18 250 $\times$ 4.6 mm 5 μ column were attached to the device. Device parameters; 280 nm wavelength, 0.5 mL/min flow rate, column temperature 40°C and sample temperature 15°C were analyzed. 10 μl injection volume and analysis time were determined as 10 min. The calibration curve was created by reading the concentrations of 1, 5, 10, 25, 50 and 100 ppm, which were prepared by diluting the stock standard, into the device in order. Then, the samples were given to the device in order. Then, the retention time when the melatonin peak was attached to the column were determined with the HPLC-UV analytical method used and the melatonin peak in these retention time was collected from the device and pure.

2.2. CHARACTERIZATION ANALYSIS OF PURIFIED MELATONIN

Characterization analysis of melatonin purified from HPLC-UV device was determined using FTIR, RAMAN and LC-MS devices. Purified and lyophilized melatonin was analyzed in FTIR device in transmission mode and spectral range between 1000–3500 cm^{-1} . Again purified and lyophilized melatonin was analyzed in spectral range of 100–2000 cm^{-1} with laser power of Raman device. Finally, liquid melatonin purified from HPLC-UV device was analyzed in LC-MS/MS device for mass and daughter ion scanning. Mobile phase A: Water containing 1% formic acid and mobile phase B: MeOH containing 1% formic acid, analysis was performed in positive ion electrospray mode (ESI+) with 0.3 mL/min flow rate.

2.3. EVALUATION AND CHARACTERIZATION OF MELATONIN IN PHARMACEUTICAL FORM

The steps for the gummy formulation are as follows: agar is mixed with purified water at 150°C for 15 minutes on a magnetic stirrer (Phase A). Sorbitol and sucrose are mixed

with purified water at 120°C for 20 minutes and then boiled until thickened (Phase B). The temperature is reduced, and phases A and B are combined. Citric acid (%50), sodium benzoate, flavoring, and colorant are added to the total mixture and mixed. The pH is checked, and it is poured into molds. 50 µl of herbal melatonin (1.45 mg MEL) is added to each gummy formulation and waiting +4°C. Various characterization analyses were performed on the gummies; including physical appearance, weight change, disintegration analysis, moisture content, hardness, and pH measurements.

3. RESULTS AND DISCUSSIONS

3.1. EVALUATION OF MELATONIN EXTRACTION AND PURIFICATION RESULTS

An extraction method was used to extract melatonin from Linden, Chamomile, Melissa, Stevia, Sage and St. John's wort plant samples. Qualitative and quantitative analysis of the extracted plant samples was performed with HPLC-UV. Standard calibration graphs were drawn from absorbance values corresponding to melatonin standards at concentrations of 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm, 50 ppm and 100 ppm. Using the formula $y = 32052x - 13418$ ($r^2 = 0.9997$) obtained from this calibration graph curve, the melatonin content of the Linden, Chamomile, Melissa, Stevia, Sage and St. John's Wort plant samples was calculated as µg/g. According to the HPLC-UV analysis results of the samples extracted from 1 g of the plant, the highest yield of melatonin was obtained as 4513.35 µg in the Stevia plant dissolved with MeOH:water:0,1M HCl.

3.2. CHARACTERIZATION ANALYSIS RESULTS OF PURIFIED MELATONIN

As a result of FTIR analysis, the NH bond (N–H) in the aromatic amine group was observed as a medium intensity light spectrum at 3380-3510 cm^{-1} . A weak intensity light spectrum was observed at ~2800-3150 cm^{-1} originating from the bonds between C-H. A weak intensity light spectrum was observed at 1490-1580 cm^{-1} originating from the N-H deformation vibrations defined as Amide II. In the 900-1700 cm^{-1} spectrum range, C=O, C-C and C-N stretching are associated with C-H and N-H bending.

As a result of Raman analysis, the raman peak at 150-400 cm^{-1} is due to chain extension in n-alkanes, the raman peak at 630-1250 cm^{-1} is due to C-C aliphatic hydrocarbons and the raman peak at 830-930 cm^{-1} is due to C-O-C stretching in aliphatic ethers. The raman peak at 1449 cm^{-1} can be seen in protein structures as CH₂ bending vibration. The raman peak at 1480-1580 cm^{-1} is due to amide II, namely C-N stretching and N-H bending

vibrations. The raman peak at 1600-1690 cm^{-1} is due to C = O stretching vibration defined as amide I. The raman active normal vibration modes of organic molecules occur in the range of 400-4000 cm^{-1} . In this study, since the scanning was performed in the 100-2000 cm^{-1} spectrum range, vibration modes belonging to some functional groups such as amine could not be detected.

According to the LC/MS analysis result, when the standard and HPLC-UV purified melatonin samples were compared, it was seen that both had precursor ions of m/z 233.1. The m/z 233.1 used as the precursor ion produced the daughter ions of m/z 158.75, m/z 174.08, m/z 216.0, m/z 232.85 and m/z 233.10 in the ESI-MS/MS spectrum result. When both the main mass and daughter ions in the HPLC-UV purified sample were examined, it was confirmed that it belonged to melatonin.

3.3. CONVERSION OF MELATONIN INTO PHARMACEUTICAL FORM AND EVALUATION OF CHARACTERIZATION RESULTS

After purifying melatonin from the plant *Stevia rebaudiana* Bertoni, which was found to have the highest melatonin content as a result of quantitative analysis with HPLC-UV, and characterizing it in LC-MS, the developed gummy formulation was combined with herbal melatonin. Organoleptic analyses of gummies showed that it has a vibrant red color, various fruit shapes, cherry odor, sweet taste and soft texture. For characterization of gummy formulation; pH was found to be 3.66 and average weight change was found to be 851.07 mg. The average disintegration time for 6 gummy formulation was found to be 18 minutes. The average hardness result for 10 gummies was found to be 407.87 g, with a moisture content of 16.45%. All these characterization analysis results are consistent when compared with different gummy formulation studies.

4. CONCLUSION AND OUTLOOK

In short, within the scope of this study; extraction of melatonin from plants, purification, characterization analyses and conversion to a pharmaceutical form were realised.

Gummies are gaining strength in the supplement industry, particularly because they offer a pleasant and convenient alternative to traditional supplements. Therefore, an alternative supplement that combines herbal melatonin with gummies to provide natural sleep support has been developed.

1. GİRİŞ

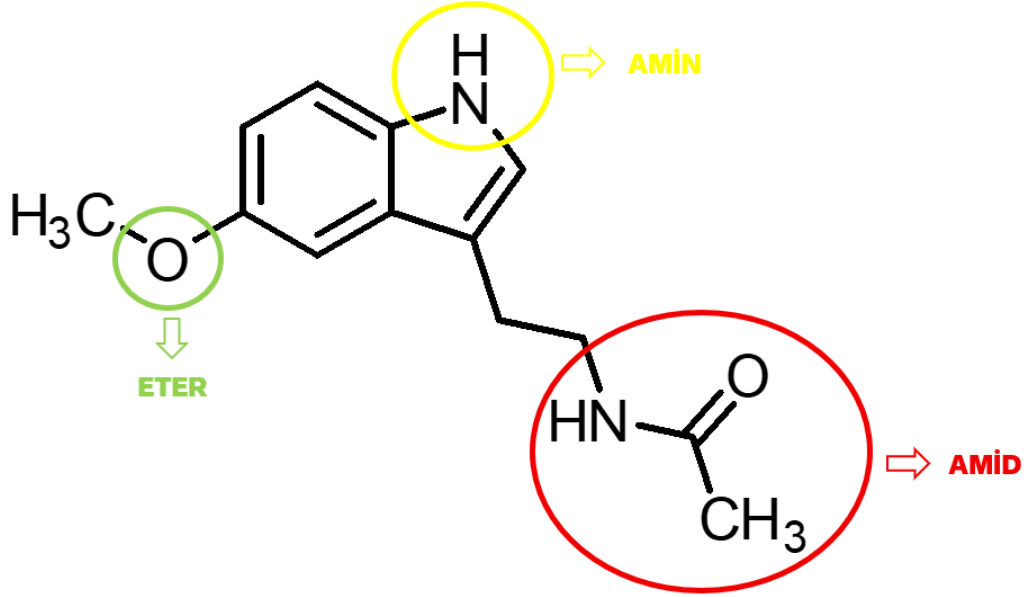
1.1. MELATONİN VE TARİHÇESİ

Yu ve Reiter, 1993 yılında yaptıkları çalışmada, üç asırdan daha uzun bir süre önce Fransız filozof Rene Descartes'ın epifiz bezini "ruhun merkezi" olarak tanımladığını bildirmişlerdir. Ancak, epifiz bezinin salgıladığı başlıca madde olan melatonin (MEL)'in kimyasal kimliği ve biyosentezi ancak 1950'lerin sonlarında ortaya çıkarılmıştır [1]. Triptofan türevi bir indolamin olan MEL'in, 1950'lerin sonlarında tanımlanması bilim dünyası için büyük bir keşif olmuştur [2]. Amerikalı dermatolog Aaron B. Lerner 1958'de binlerce sığırın pineal bezinden amfibian denilen, aydınlatıcı faktör olarak da bilinen maddeyi tanımlamıştır [3]. N-asetil-5-metoksi triptamin yapısındaki bu madde kurbağa derisindeki Melanoforların beyaz görünümüne neden olduğu için ve aynı zamanda serotonininden türediği için "*Melanophorecontracting hormon*" adı verilmiştir [4]. Lerner vd., izole edilen bu hormonun vitiligo olarak bilinen insan deri rahatsızlığının tedavisinde yararlı olabileceğini tahmin etmiş fakat ne yazık ki, MEL'in insan melanositlerindeki anormal deri pigmentasyonunu önemli ölçüde değiştirmede farkedilmiştir [5]. Günümüzde MEL; ruh halinin biyolojik düzenleyicisi, uyku, retina fizyolojisi, cinsel davranış, mevsimsel üreme fizyolojisi ve sirkadiyen ritim olarak bilinmektedir [1].

Bu kısımda, MEL'in kimyasal yapısı ve özellikleri, biyosentez aşamaları ve salgılanma sürecinden bahsedilmiştir. Daha sonra MEL'in insan, hayvan ve bitkideki temel biyolojik aktiviteleri hakkında kısaca bilgi verildikten sonra esas odak konusu olan, bitki MEL'i yani fitomelatoninin işlevleri, etki mekanizmaları ve biyosentez basamakları detaylı olarak anlatılacaktır. Çeşitli bitki ailelerindeki fitomelatonin içeriği tablo şeklinde listelendirilmiştir. Daha sonra MEL'in bitkilerden ekstraksiyonu ve analitik metotların avantajları ve dezavantajlarından kısaca bahsedilmiştir. MEL'in farmasötik formuna yönelik yapılan çalışmalar ile ilgili literatür örnekleri incelenerek özetlenmiştir. Sonrasında popüler bir formülasyon türü olan yumuşak tablet formu anlatılıp, örneklerinden bahsedilmiştir. Son olarak da tezin genel amacı açıkça anlatılarak özetlenmiştir.

1.1.1. Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

Molekül formülü $C_{13}H_{16}N_2O_2$ ve molekül ağırlığı $232,28 \text{ g mol}^{-1}$ olan MEL'in kimyasal yapısı (Şekil 1. 1), benzen halkası üzerinde 3-amid yan zinciri ($-\text{CH}_2\text{CONH}_2$) ve 5-metoksi yan zinciri ($-\text{OCH}_3$) bulunan bir indolamindir [2],[6],[7]. Saf haldeki melatonin beyazımsı bir renge sahip toz formundaki MEL'in yoğunluğu $1,175 \text{ g/cm}^3$, kaynama noktası $+512,8 \text{ }^\circ\text{C}$ olan amfifilik bir moleküldür [8].



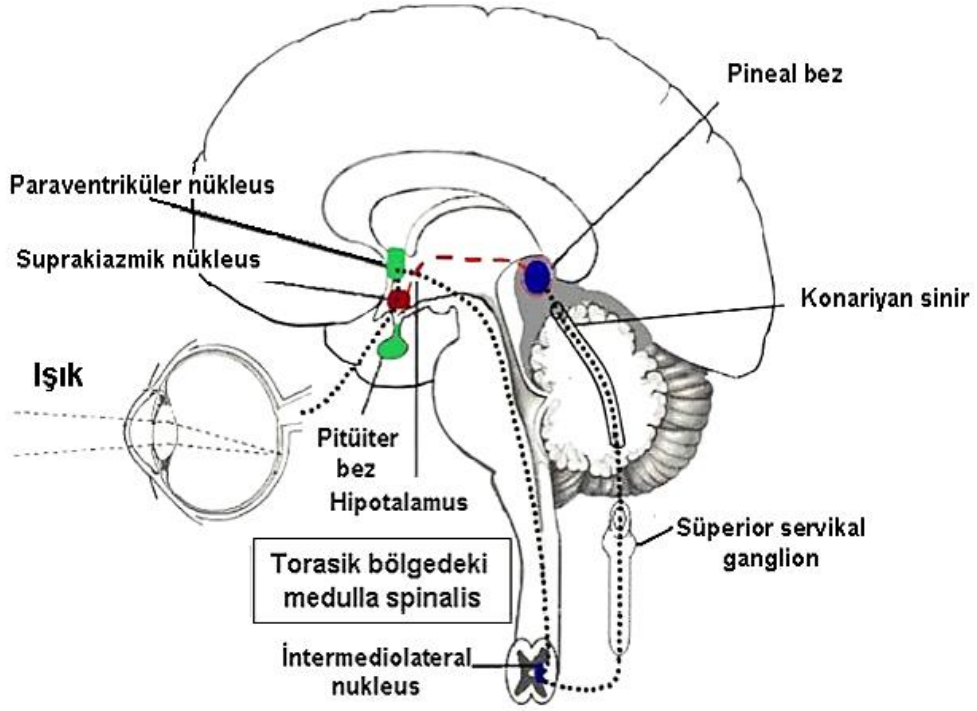
Şekil 1. 1. MEL 'in kimyasal yapısı (S. ZARF TOKAN tarafından çizilmiştir)

Melatonin, anti-enflamatuvar, antioksidan ve otofajik özelliklere sahiptir [9]. İnsan vücudunda endojen bir biyolojik saat düzenleyicisidir ve esas olarak klinik olarak uykusuzluğun tedavisi için kullanılır [10]. Ayrıca MEL, anti-enflamatuvar, enerji metabolizmasının düzenlenmesi, cilt koruması ve hipoglisemi gibi diğer biyolojik aktivitelerine ek olarak, oldukça etkili bir serbest radikal temizleyici olarak da güçlü antioksidan özelliklere sahiptir [10]. Hatta çok yakın bir zamanda, MEL COVID-19'un etkilerini yavaşlatmak için olası bir adjuvan tedavi olarak da araştırıldı [9]. Günümüz hayvanlarında, reseptör aracılı yollarla, MEL, uykunun düzenlenmesinde, sirkadiyen ritimlerin düzenlenmesinde, bağışıklığın güçlendirilmesinde, çok işlevli bir onkostatik ajan olarak vb. işlev görürken, kısmen reseptörden bağımsız olan süreçlerle oksidatif stresi azaltma yeteneğini korur. Bitkilerde, melatonin oksidatif stresi azaltmada ve tohum çimlenmesini ve büyümesini teşvik etmede, stres direncini iyileştirmede, bağışıklık sistemini uyarmada ve sirkadiyen ritimleri düzenlemede işlev görmeye devam eder [11].

1.1.2. Melatonin Biyosentezi

MEL, omurgalılarda esas olarak pineal bezin özellikle karanlık fotoperiyodunda üretilen en önemli hormonu olup [12], L-triptofan metabolizmasından serotonin yoluyla sentezlenen bir indolamindir [13]. MEL seviyeleri geceleri maksimuma ulaştığı ve gün içinde en aza indiği için “karanlık hormonu” olarak da adlandırılır [14]. Wurtman vd. (1963) sıçanları 6 gün boyunca sürekli karanlığa maruz bırakıp, melatonin sentezleyen enzim N-asetil serotonin O- metiltransferaz (ASMT) aktivitesinde çarpıcı bir artış gözlemlemişlerdir. Dolayısıyla pineal MEL üretiminin karanlıkta arttığını tahmin etmişlerdir. Pineal MEL sentezinin karanlıkta arttığı varsayımında haklı olsalar da, sonraki çalışmalar ASMT enzimi konusunda yanlışlıklarını göstermiştir. Bunun yerine, serotoninin N-asetilserotonine dönüşümünü kontrol eden serotonin N-asetiltransferaz (SNAT), gece boyunca aktivitede çok büyük bir artış sergilediği ve pineal MEL üretiminde hız sınırlayıcı enzim olduğu anlaşılmıştır [5].

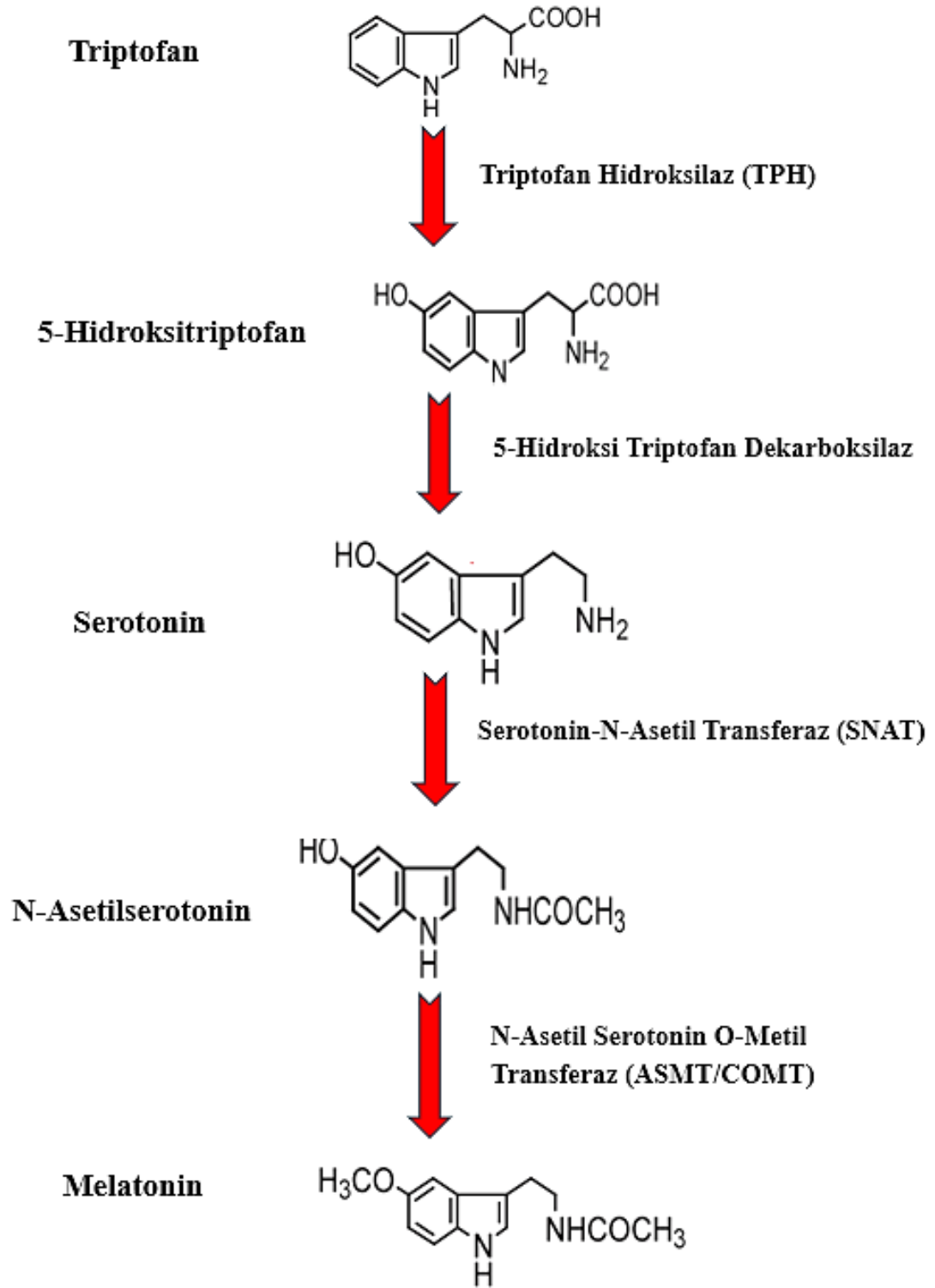
Epifizde MEL sentezi fotoperiyodik etkileşim ile sinirsel, hormonal ve enzimatik sistemlerin kontrolü altında gerçekleşmektedir [15]. MEL sentezi, ışık/karanlık döngüsüne bağlıdır [16]. Aydınlıkta hiperpolarize olan retinal hücreler, karanlıkta depolarize olarak MEL sentezini başlatırlar. Karanlığın başlamasıyla fotoreseptör hücrelerden salgılanan nörepinefrin, hem triptofanın dolaşımdan pineal beze girişini artırmakta ve hem de ağırlıklı olarak β -1 adrenerjik reseptörlere (ve daha az ölçüde α 1-adrenerjik reseptörlere) bağlanmasıyla membrandaki adenilat siklazı aktive ederek, siklik AMP (cAMP) seviyelerini yükseltmektedir [15],[17]. Bu da depolanmış serotonin ve SNAT'ın hücre içi salınımını başlatır [1]. Retinadaki fotoreseptörler aracılığıyla retinohipotalamik yol sayesinde önce suprakiazmatik nükleus (SCN) uyarılır [18]. SCN'den sonra paraventriküler nükleusa iletilir. Paraventriküler nükleustaki sinirler aracılığıyla çıkan impuls, medulla spinalisin intermediolateral kolonundan geçerek bir sempatik ganglion olan süperior servikal gangliona ulaşır. Daha sonra süperior servikal gangliondan çıkan postganglionik sinirler aracılığıyla koronarian sinirler ile pineal beze ulaşır (Şekil 1. 2). Bu gangliondan çıkan sinyallerin pinealositleri uyarıcı etkisi karanlıkta artarken, aydınlıkta azalmaktadır [18]. Paraventriküler nükleus lifleri tarafından salgılanan noradrenalinin pineal β -adrenerjik reseptörlerini aktive etmesiyle ve karanlıkta MEL biyosentezinin anahtar enzimi olan SNAT ekspresyonunu siklik AMP (adenozin 3-fosfat) yoluyla uyarır [19].



Şekil 1. 2. Melatoninin biyosentez yolağı [12]

Sinirsel olarak uyarılan pinealositlerde MEL sentezi, enzimatik reaksiyonlarla triptofanın serotonine daha sonra melatonine dönüşümü ile gerçekleşir [15]. Triptofan aminoasidi, tüm taksonlarda MEL gerekli öncüsüdür [11]. Hayvanlarda sentez aşamaları sırasıyla şu şekildedir: Triptofan, triptofan hidroksilaz enzimi tarafından 5- hidroksitriptofona çevrilir. 5-hidroksitriptofan, aminoasit dekarboksilazla serotonine; serotonin, SNAT ile N-asetil serotonine; N-asetil serotonin de metiltransferaz enzimi aracılığı ile melatonine dönüştürülmektedir.

Triptofan hidroksilaz enzimi, tetrahidrobiopterin (BH4) ve O₂'yi kofaktör olarak kullanır. Yine buradaki reaksiyonda B6 vitamini koenzim olarak görev yapmaktadır. Ara metabolit olan 5-hidroksitriptofan, kan-beyin bariyerini rahatlıkla aşabilirken, 5- hidroksitriptamine (serotonin) dönüştüğü zaman ise kan-beyin bariyerini geçebilme özelliği ortadan kalkmaktadır [20].



Şekil 1. 3. Triptofan aminoasidinden hareketle melatonin sentez aşamaları (S. ZARF TOKAN tarafından modifiye edilmiştir) [11]

1.1.3. Melatoninin Salgılanması

Karanlığın başlamasıyla birlikte epifiz bezindeki artan MEL konsantrasyonları, pasif olarak beyin omurilik sıvısına ve dolaşıma yayılır [1]. MEL, hücre zarlarından geçişi kolaylaştıran yüksek lipid ve suda çözünürlük gösteren bir molekül olduğundan dolaşıma salındıktan sonra çeşitli sıvılara, dokulara ve hücresel bölmelere (tükürük, idrar, beyin omurilik sıvısı, yumurtlama öncesi folikül, amniyon sıvısı ve süt) kolayca erişim kazanır [17].

İnsanlarda, MEL salgılanması gece 2:00 ile 4:00 arasında zirveye ulaşır ve bundan sonraki 24 saatlik süre boyunca kademeli olarak azalır. Serum MEL konsantrasyonu yaşa göre önemli ölçüde değişir. Yenidoğanlarda çok az salgılanırken, konsantrasyonlar doğumdan çok kısa bir süre sonra yükselmeye başlar ve yaşla birlikte artmaya devam eder. MEL seviyeleri insanlarda 1 ila 3 yaşları arasında zirveye ulaşır, 20'li yaşların ortalarına kadar tutarlı kaldıktan sonra yaşla birlikte yavaşça azalmaya başlamaktadır. Ek olarak, Humbert ve Pevet (1994) yılında, 60 yaş üstü insan deneklerde yapılan çalışmada, fizyolojik melatonin konsantrasyonu ile yaşlanma arasında bir ilişki olduğunu göstermişlerdir [1].

Canlı organizmalarda düşük molekül ağırlığına ve basit bir yapıya sahip olan MEL, epifiz bezinin ışığa duyarlı pineolasit adı verilen hücrelerinden salgılandığından başlangıçta bir nörohormon olarak adlandırılmıştır [2]. Fakat sonrasında yapılan araştırmalar ile, diğer organlarda da MEL'in tanımlanmaya başlamasıyla [5] ve nörohormon kavramı değişmiştir [21],[4]. Molekülün iki ana endojen kaynağı tespit edilmiştir; birinci kaynağı epifiz, ikinci kaynağı ise ekstrapineal dokulardır [5]. Hayvan ve insan vücudunda pineal bezi aracılığıyla üretilen melatonin, vücudun diğer organ ve dokularında ise ekstrapineal yolla salgılanabilir. Omurgalı organizmalarda, pineal bezden salgılanan MEL düzeyine kıyasla, ekstrapineal düzeyde salgılanan MEL çok daha yüksek miktarda olup, ekstrapineal düzeyde salgılanan melatonin kana salınmaz, yalnızca onu üreten doku ve organ düzeyinde lokal olarak etki eder ve sirkadiyen bir salgılanma düzenine sahip değildir [22]. Örneğin; retinada sentezlenen MEL, retinal pigment epitel fonksiyonunun ve fotoreseptörlerdeki gece-gündüz varyasyonuna karşı retinanın vereceği yanıtın düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Deride; pigment granüllerin değişiminden ve derin dokuların güneşin zararlı radyasyonuna karşı korunmasından sorumlu olan MEL, gastrointestinal kanalda enterokromofin hücrelerde sentezlenmekte ve post-prandial olarak dolaşıma salıverilmektedir. Safrada sentezlenen melatonin ise, okside kolesterol

türevlerine ve safra asidine karşı safra yollarının mukozasını ve epitelini oksidatif hasara karşı epiteli korumaktadır [4].

1.1.4. Melatoninin Temel Biyolojik Aktiviteleri

Yu ve Reiter (1993) yılında yaptıkları çalışmada, üç asırdan daha uzun bir süre önce Fransız filozof Rene Descartes'ın epifiz bezini "ruhun merkezi" olarak tanımladığını bildirmişlerdir. Ancak, epifiz bezinin salgıladığı başlıca madde olan melatoninin kimyasal kimliği ve biyosentezi ancak 1950'lerin sonlarında ortaya çıkarılmıştır. Günümüzde MEL; ruh halinin biyolojik düzenleyicisi, uyku, retina fizyolojisi, cinsel davranış, mevsimsel üreme fizyolojisi ve davranışı, sirkadiyen ritim olarak bilinmektedir. Dahası, melatoninin yaşlanma veya yaşa bağlı süreçler ve hastalık durumları üzerindeki etkisini yansıtan deneysel kanıtlar bulunmaktadır ki bu roller, güçlü bir serbest radikal temizleyici olduğunu göstermektedir [1].

MEL'in genel olarak birincil rolü, sirkadiyen ritmi (uyku-uyanıklık döngüsü) düzenlemektir. Bu düzenleme, epifiz bezinden melatoninin döngüsel üretimi ve salınımına bağlı olarak gerçekleşir [5]. MEL, sirkadiyen ritmin düzenlenmesinden sorumlu olduğundan uyku bozukluklarının hafifletilmesinde rol oynayan benzersiz bir moleküldür [23]. Birçok uyku bozukluğu MEL tedavisi ile uyku kalitesinde dikkate değer iyileşmelerle sonuçlanmıştır. Bunlar arasında; jetlag, gecikmiş uyku evresi sendromu, gece vardiyasında çalışma kaynaklı, mevsimsel ve duygusal kaynaklı, körlerde, yaşlılarda ve çocuklardaki uyku bozuklukları yer almaktadır [19]. Bunların yanı sıra daha yakın zamanda yapılan araştırmalar, melatoninin etkilerinin sirkadiyen ritim fonksiyonlarını etkilemekten çok daha fazla olduğunu kanıtlamıştır [5].

Serbest radikalleri temizleyen güçlü bir antioksidan olan MEL, hücre zarlarını serbestçe geçebilen ve sitozol, çekirdek ve mitokondri dahil olmak üzere herhangi bir kısımda dağılılabilen amfifilik bir moleküldür [24],[23],[25]. Bu sayede birçok reseptör aracılı etkisinden bağımsız şekilde güçlü bir endojen serbest radikal temizleyicisi olarak işlev görür. MEL'in hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($HO^\bullet$), nitrik oksit ($NO^\bullet$), peroksinitrit anyonu ($ONOO^-$), hipokloröz asit ($HOCl$), singlet oksijen (1O_2), süperoksit anyonu ve peroksil radikali ($LOO^\bullet$) temizlediği bildirilmiştir, ancak süperoksit anyonu ve peroksil radikali temizleme yeteneğinin geçerliliği tartışmalıdır [26]. MEL, çeşitli reaktif oksijen türlerini (ROS) ve reaktif azot türlerini (RNS) etkili bir şekilde temizleyerek

organizmaları oksidatif strese korurken [25], ana metabolitleri olan, N¹-asetil-N²-formil-5-metoksikinuramin (AFMK) ve N¹-asetil-5-metoksikinuramin (AMK), aynı zamanda serbest radikal hasarını hafifletme konusunda güçlü bir yeteneğe sahiptir ve bu da melatoninin antioksidan kapasitesini artırır [27].

MEL, antioksidan mekanizmaları, canlı organizmadaki en önemli küçük moleküler antioksidanlar olan C vitamini, E vitamini ve glutatyon (GSH) gibi klasik antioksidanlardan farklı görünmektedir. Dolayısıyla MEL, yeni bir antioksidan sınıfını da temsil edebilir. Tüm klasik antioksidanlar potansiyel elektron vericileridir. Hem indirgenmiş hem de oksitlenmiş formlar sergilerler ve redoks döngüsüne girerler; bu nedenle, oksidasyonu teşvik etme ve önleme potansiyeline sahiptirler. MEL ise, 5. pozisyonda bulunan metoksi grubu elektron açısından zengin bir indol halkasına sahiptir. Bu metoksi grubu, melatoninin serbest radikal temizleyicisi olarak fizyokimyasal özellikleri için önemlidir. Bu grup ayrıca elektron açısından zengin indol halkasına p elektronları ekler ve bu da, melatoninin molekülünün eşleşmemiş elektron serbest radikallerini yakalama kapasitesini artırır. Fakat elektron açısından zengin bir molekül olan MEL, idrarla atılan birkaç kararlı son ürün oluşturmak için serbest radikallerle etkileşime girebilirken redoks döngüsüne girmez ve bu nedenle çeşitli deneysel koşullar altında gösterildiği gibi oksidasyonu teşvik etmez. Tüm bunların yanı sıra, C vitamini ve E vitamini konsantrasyonları diyet alımına bağlı olup yaşlanma sırasında genellikle çok fazla değişmezken; yaşlanmayla birlikte GSH seviyelerindeki değişiklikler hala tartışmalıdır [26]. MEL ise, yaşlılıkta üretiminin kesinlikle azaldığı bilinen endojen bir bileşiktir [26] ve geceleri melatonin üretiminin azalmasıyla ilişkili tüm durumların uzun ömürlülük, yaşam kalitesi ve sağlık için zararlı olabileceği neredeyse kesindir [28].

1.1.5. İnsan, Hayvan ve Bitkide Melatoninin Rolü

Ökaryotik tek hücreli organizmalar, prokaryotlar, mantarlar, algler, hayvanlar ve bitkiler dahil olmak üzere hemen hemen tüm yaşam formlarında değişen miktarlarda MEL tespit edilmiştir [14]. MEL, yalnızca omurgalılarda epifiz beziyle ilişkilidir çünkü bu organa sahip tek tür onlardır fakat bu indolamin, epifiz bezi ve epifiz homologu olmayan tüm türlerde bulunur [5]. MEL, epifiz veya ekstrapineal yolla, sentezlendiği ve salgılandığı doku veya organa bağlı olarak, her bir organizma düzeyinde farklı roller ve işlevler gerçekleştirir [22].

MEL'in insan vücudunda yerine getirdiği en çok çalışılan roller ve işlevleri, sirkadiyen ritmin düzenlenmesi ve uyku kalitesinin iyileştirilmesi, tüm vücut düzeyinde oksidatif stresin azaltılması, bağışıklık sisteminin düzenlenmesine müdahalesi, kardiyovasküler sistemin ve sinir sisteminin işlevlerinin düzenlenmesi, bağışıklık hücrelerinin uyarılması ve sitokin üretiminin düzenlenmesi ile temsil edilmektedir [22].

Hayvan vücudunda MEL, sirkadiyen ritmi düzenlemede rol oynar, uyku-uyanıklık ritmini düzenleyerek uyku kalitesini iyileştirir, memelilerde süt kalitesini artırır, mevsimsel üreme değişikliklerine aracılık eder, enerji metabolizmasını düzenler, hücresel redoks homeostazını düzenler ve evcil türlerin üremesinde rol oynar [22]. Anti-enflamatuvar ve immünomodülatör olarak hareket edebilir [29].

Bitkilerde MEL, hormonal etkiden antioksidan etkiye kadar çok çeşitli işlevlere sahiptir. Son zamanlarda, bu indolaminin işlevlerinin ve etki mekanizmalarının bir kısmı açıklığa kavuşturulmuştur. Bu indolamin, bitki ana düzenleyicisi ve farklı stres türlerine karşı değerli bir yanıt belirteci olarak kabul edilmektedir [30].

1.2. BİTKİ MELATONİNİ (FİTOMELATONİN)

Bitkilerde MEL, hormonal etkiden antioksidan etkiye kadar çok çeşitli işlevlere sahip olup, bu indolaminin işlevlerinin ve etki mekanizmalarının bir kısmı son zamanlarda açıklığa kavuşturulmuştur. Ayrıca MEL indolamini, bitki ana düzenleyicisi ve farklı stres türlerine karşı değerli bir yanıt belirteci olarak kabul edilmektedir [30].

Yüksek bitkilerde endojen fitomelatoninin ilk tanımı Van Tassel vd. (1993) tarafından bir kongre bildirisinde yapılmıştır [31]. Van Tassel vd. Mayıs 1993'te ve Haziran 1995'te yayınlanan iki özet, melatoninin *Pharbitis nil* (Japon gündüzsefası) bitkisinde radyoimmunoassay (RIA) yöntemi ile tespit edildiğini iddia ediyordu. Ancak bu ön gözlemler 1995'in sonundan önce tam rapor olarak yayınlanmadı. Almanya'daki Dubbels vd. ile Japonya'daki Hattori vd. 1994'te, neredeyse aynı anda, bitkilerde MEL varlığını gösteren raporlar sundular. Dubbels vd. makalelerini 31 Ağustos 1994'te Journal of Pineal Research'e sundular; Ekim ayında kabul edildi ve Ocak 1995'te yayınlanırken; Hattori vd. gözlemlerini 20 Aralık 1994'te Biochemistry and Molecular Biology International'a sundular; Mart 1995'te yayınlandı [25]. Kısaca MEL'in bitkilerde gerçekten var olduğuna dair ilk kanıt, 1995 yılında iki ayrı çalışma grubunun birbirinden bağımsız yaptığı çalışmalar sonucunda tespit edilmiştir [14]. Bu gruplar farklı ekstraksiyon ve tespit

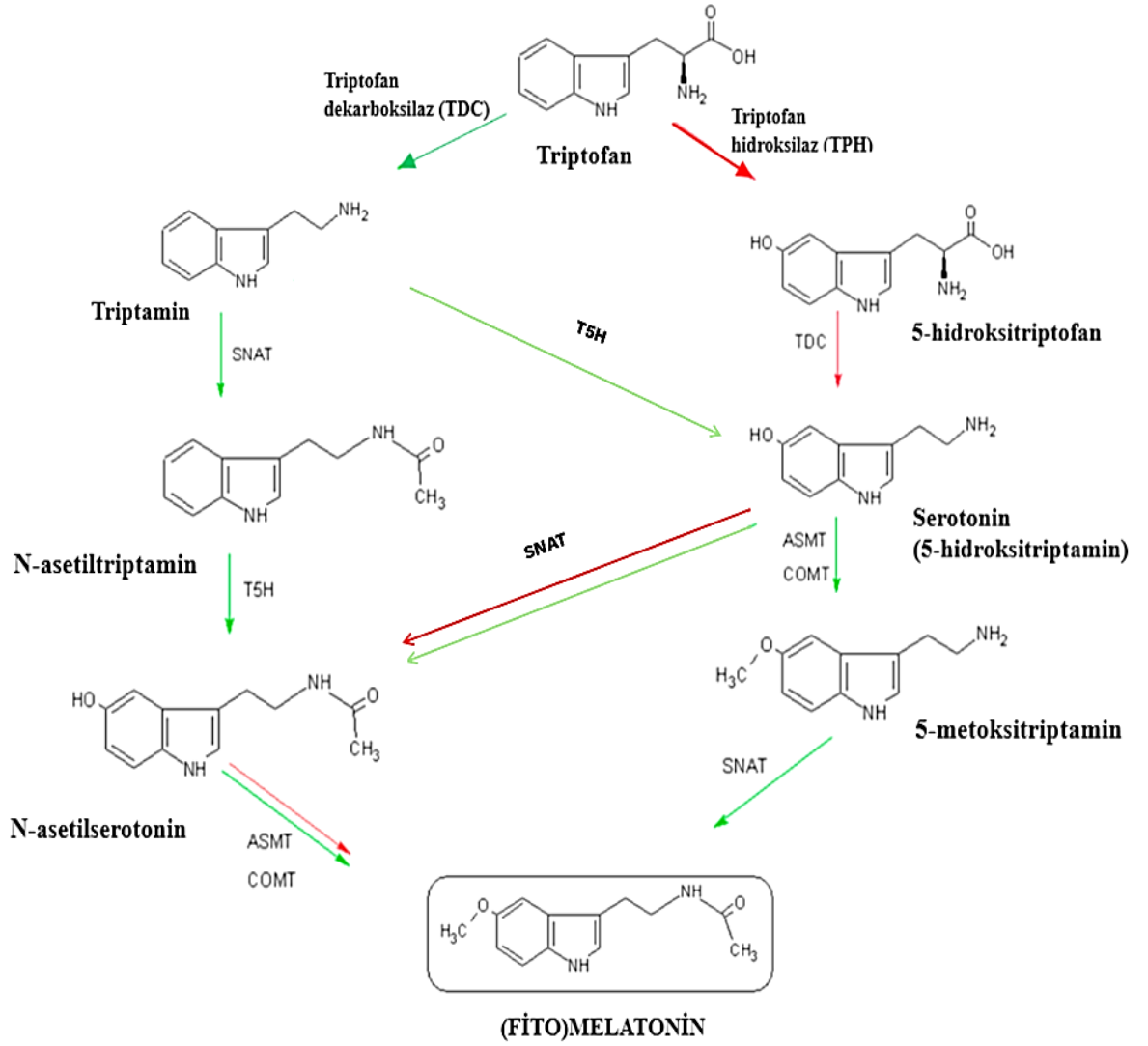
metodolojileri kullanmış ve tütün, pirinç, mısır, buğday, muz gibi birçok bitki türünde bulunduğunu bildirmişlerdir [25]. Koca Çalışkan vd. (2017) yılında yaptıkları çalışmada, yenilebilen ve yenilemeyen birçok bitki türünde MEL seviyelerini gösteren kapsamlı bir derleme çalışma sunmuşlardır [32]. Çeşitli sebzelerde, tahıllarda, meyvelerde, tohumlarda ve hatta tıbbi ve aromatik bitkiler ile süs ve yabani bitki türlerinde indolün tespit edildiğini bildiren çalışmaların sayısı giderek artmaktadır [24].

1.2.1. Fitomelatonin Biyosentezi

MEL sentez yolağı hayvanlarda iyi belgelenmişken, bitkilerde henüz tamamen açıklığa kavuşturulmamıştır. Hayvanlara benzer şekilde bitkilerin de MEL sentezlemek için başlangıç materyali olarak triptofan kullandığı bildirilmiştir [27]. Bu amaçla Tan vd. (2007)' de yaptıkları çalışmada, bazı bitkilerin yetiştirildiği ortama melatoninin öncüsü triptofan verilmiş, bu bitkilerdeki MEL seviyeleri, kontrol bitkilerindekinden önemli ölçüde yüksek bulunmuştur ki bu da bitkilerde triptofanın indolamine dönüşümüne dair ek kanıt sağlamıştır [24].

Bitkilerde, triptofan önce triptofan dekarboksilaz (TDC) tarafından triptamin olarak dekarboksile edilir ve daha sonra triptamin, serotonin oluşturmak üzere triptamin 5-hidroksilaz (T5H) yoluyla hidroksile edilir [27]. Serotoninin N-asetilasyonu, SNAT enzimi tarafından katalize edilir. N-asetilserotonin, fitomelatonin üreten bir ASMT tarafından metillenir. Bitkilerde, N-asetilserotonin metilasyonu, kafeik asit O-metiltransferaz (COMT) tarafından da gerçekleştirilebilir. COMT, kafeik asit ve kersetin gibi çeşitli substratlar üzerinde etki edebilen bir bitki enzimi sınıfıdır [31].

Serotonin ayrıca ASMT ve COMT tarafından SNAT'ın etkisiyle fitomelatonin üretmek için 5-metoksitriptamine dönüştürülebilir [31]. Ek olarak, serotonin, triptofan hidroksilaz (TPH) ve TDC'nin etkisinden sonra 5-hidroksitriptofandan da oluşabilir. Bu son adım esas olarak hayvanlarda görülürken, daha az ölçüde bitkilerde de meydana gelebilir. Fitomelatonin biyosentez yolunun hayvanlardakine kıyasla daha fazla alternatif yol izleyebileceğini ve metabolik değişikliklere uyum sağlama kapasitesinin daha yüksek olduğunu görülmektedir. Bu nedenle, (fito)melatonin amaca en uygun olanı şu şekilde sentezlenir; triptofan → triptamin → serotonin → N-asetilserotonin → fitomelatonin, hayvanlarda ise; triptofan → 5 hidroksitriptofan → serotonin → N-asetilserotonin → Melatonin [31].



Şekil 1. 4. Bitkilerde (Fito) Melatonin biyosentezi (S. ZARF TOKAN tarafından modifiye edilmiştir) [31]

1.2.2. Bitkilerde Fitomelatoninin Rolü

Bitkiler; soğuk, sıcak, kuraklık ve hava veya toprak kirliliği gibi çeşitli çevresel etkilerden kaçınmak için sınırlı bir hareket kabiliyetine sahiptir. Dolayısıyla çeşitli biyotik ve abiyotik streslere maruz kalırlar [27]. Shi vd. (2015) yaptığı çalışmada, *Arabidopsis thaliana* yapraklarına uygulanan endojen melatonin; yüksek tuzluluk, soğuk ve kuruluğa karşı koruyucu bir etki göstermiş ayrıca bitki biyotik ve abiyotik streslere karşı tolerans geliştirmiştir [33]. MEL, hem lipofilik hem de hidrofilik özelliklere sahip geniş spektrumlu bir antioksidan olduğundan ve bitkilerde stres durumlarında daha da yüksek seviyelerde bulunduğu görülmektedir [26]. Dolayısıyla melatoninin bitkilerdeki diğer bir rolü; serbest radikalleri temizlemek, böylece bitkileri oksidatif strese karşı korumak ve makromoleküllerin hayvanlardakine benzer şekilde hasarını azaltmak olabileceği

sonucuna varılmıştır [24]. Bitkileri tehlikeli çevresel faktörlerden korumak için, antioksidatif savunma sistemi oluşturmak amacıyla diğer antioksidanlar ve antioksidatif enzimlerle birlikte önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir [26]. Bu sistem ile hem melatonin hem de metabolik ürünleri olan N1-asetil-N2-formil-5-metoksikinuramin (AFMK) ve N1-asetil-5-metoksikinuramin (AMK) seviyeleri bitkilerde hayvanlardan çok daha yüksek seviyelerde üretilir [27]. Bitkilerde, en yüksek MEL seviyeleri çiçeklerde ve tohumlarda meydana gelir. Bunun sebebi ise, oksidatif hasara karşı hassas olan üreme organlarıdır [26]. Kuru tohumlarda olduğu gibi serbest radikallerin enzimatik olarak detoksifiye edilemediği ortamlarda, artmış melatonin bitkilerde daha yüksek antioksidan koruma sağlayabileceğini gösteren veriler bildirilmiştir [24]. Örneğin; ceviz tohumunda yüksek miktarda MEL bulunmasının nedeninin yağ asitlerinin oksidasyonunu engellemek ve sonrasında da tohumun çimlenme kapasitesini yitirmeden uzun süre canlı kalmasını sağlamak olduğu bildirilmiştir [34]. Boru çiçeği (*Datura metel*) bitkisinin çiçeklerinde MEL düzeyinin değişimini tespit etmek amacıyla farklı gelişim aşamalarında toplanmış ve çiçek tomurcukların MEL içeriklerinin incelenmesi sonucunda en yüksek melatonin seviyesinin yeni gelişmeye başlayan en küçük tomurcuklarda olduğu bulunmuş, hatta tomurcuğun gelişiminin ilerlemesiyle MEL içeriğinin önemli miktarda azalış gösterdiği tespit edilmiştir [34].

Kolár vd. (1999) yaptığı çalışmada, *Chenopodium rubrum*' un yapraklarında gece boyunca gündüze göre önemli ölçüde daha yüksek melatonin seviyelerini bildirdi [35]. Zhao vd. (2013)'de yaptığı çalışmada ise 'Hongdeng' (*Prunus avium* L. cv. Hongdeng) ve 'Rainier' (*Prunus avium* L. cv. Rainier) olmak üzere iki kiraz kültüründe hem karanlığın hem de oksidatif stresin melatonin sentezini indüklediği görülmüştür [36]. Fakat, Murch vd. (2000)'de yaptığı çalışma sonucunda Sarı kantaronda (St. John's wort) gündüz melatonin konsantrasyonlarının maruz kaldığı ışık yoğunluğuyla pozitif ilişkili olduğunu gösterdi [25]. Yine Tan vd. (2007) yaptığı çalışmada, Su sümbülündeki (*Eichhornia crassipes*) melatonin seviyelerinin günlük bir ritim sergilediğini ancak zirve seviyelerinin karanlık dönemden ziyade ışık döneminin sonuna yakın meydana geldiğini belgelemiştir [37]. Bu gözlemler arasındaki tutarsızlıklar tartışmaya değmeyebilir, çünkü farklı bitkiler kesinlikle farklı davranabilir [25]. Bitkilerde bulunan MEL miktarının sadece türden türe farklılık göstermekle kalmadığı, aynı türün içerisinde bile genotipler veya çeşitler arasında veya aynı genotipteki bireylerinin farklı büyüme evreleri içinde de farklılık gösterdiği bildirilmiştir [34].

1.2.3. Çeşitli Bitki Ailelerindeki Fitomelatonin İçeriği

Çeşitli sebzelerde, tahıllarda, meyvelerde, tohumlarda ve hatta tıbbi ve aromatik bitkiler ile süs ve yabani bitki türlerinde indolün tespit edildiğini bildiren giderek artan sayıda çalışmalar mevcuttur. Bugüne kadar melatonin içeriği açısından araştırılan cinslerin çoğu, bitki aleminde bollukları veya yüksek ekonomik değerleri nedeniyle önemli olan ailelere aittir. Bunlar arasında dikotiledonlar (iki çenekli) açısından Apiaceae (Umbelliferae), Asteraceae (Compositae), Brassicaceae, Fabaceae (Leguminosae), Lamiaceae, Rosaceae ve Solanaceae; monokotiledonlar (tek çenekli) açısından Alliaceae, Poaceae (Gramineae) ve Zingiberaceae de bulunur [24].



Çizelge 1. 1. Çeşitli bitkilerdeki melatonin seviyeleri ve tespit yöntemleri. Veriler ng/g olarak belirtilmiştir. KA, kuru ağırlığı ve TA, taze ağırlığı ifade etmektedir.

FAMİLYA	TÜRKÇE İSİM	BİLİMSEL İSİM	MEL İÇERİĞİ (ng/g)	ANALİZ METODU	BULUNDUĞU KISIMLAR	KAYNAK
Alliaceae	Soğan	<i>Allium cepa</i> L.	-	HPLC-FD	Tüm	[24]
Alliaceae	Sarımsak	<i>Allium sativum</i> L.	0,299	GC/MS	Tüm	[38]
Anacardiaceae	Antep fıstığı	<i>Pistacia vera</i>	656-660	UHPLC	Tüm	[39]
Apiaceae	Rezene	<i>Foeniculum vulgare</i> (Gilib.)	28 (KA)	HPLC-ECD	Tohum	[40]
Apiaceae	Kereviz	<i>Apium graveolens</i> L.	7 (KA)	HPLC-ECD	Tohum	[40]
Apiaceae/ Umbelliferae	Anason	<i>Pimpinella anisum</i> L.	7 (KA)	HPLC-ECD	Tohum	[40]
Asteraceae	Ayçiçeği	<i>Helianthus annuus</i>	29 (KA)	HPLC-ECD	Tohum	[41]
Asteraceae	Papatya	<i>Matricaria chamomilla</i> L.		ELISA	Tüm	[42]
Asparagaceae	Kuşkonmaz	<i>Asparagus officinalis</i> L.	-	HPLC-FD	Tüm	[24]
Basidiomycota	Basidiomycota	<i>Boletus edulis</i>	6800 ± 60 (KA)	HPLC	Tüm	[43]

Çizelge 1.1 Çeşitli bitkilerdeki melatonin seviyeleri ve tespit yöntemleri. Veriler ng/g olarak belirtilmiştir. KA, kuru ağırlığı ve TA, taze ağırlığı ifade etmektedir. (Devam)

Basidiomycota	Basidiomycota	<i>Agaricus bisporus</i>	4300–6400 (KA)	RP-HPLC	Tüm	[44]
Basidiomycota	Basidiomycota	<i>Cantharellus cibarius</i>	1400 ± 110 (KA)	HPLC UV	Gövde	[45]
Basidiomycota	Basidiomycota	<i>Agaricus bisporus</i>	1100	HPLC UV	Gövde	[45]
Brassicaceae	Brassicaceae	<i>Arabidopsis spp.</i>	548±26	SPE, CD-MEKC	Yaprak	[32]
Brassicaceae	Turp	<i>Raphanus sativus</i> L.	485	SPE-HPLC-FD	Tüm	[46]
Brassicaceae	Beyaz hardal	<i>Brassica nigra</i>	189 (KA)	HPLC-ECD	Tohum	[41]
Brassicaceae	Siyah Hardal tohum	<i>Brassica nigra</i>	129 (KA)	HPLC-ECD	Tohum	[41]
Bromeliaceae	Ananas	<i>Ananas comosus</i>	0,278	GC/MS	Tüm	[38]
Chantui	Chantui	<i>Periostracum cicadae</i>	3771 (KA)	SPE-HPLC-FD	Tüm	[46]
Diding	Diding	<i>Viola philipica</i> Cav	2360 (KA)	SPE-HPLC-FD	Tüm	[46]
Fabaceae	Yonca	<i>Medicago sativum</i> L.	16 (KA)	HPLC-ECD	Tohum	[40]
Fabaceae	Acı bakla	<i>Lupinus albus</i> L.	37,50 ± 2,3 (TA)	HPLC-FD	Tohum kabuğu	[47]
Fabaceae	Çemen otu	<i>Trigonella faenagracum</i>	43 (KA)	HPLC-ECD	Tohum	[41]

Çizelge 1.1 Çeşitli bitkilerdeki melatonin seviyeleri ve tespit yöntemleri. Veriler ng/g olarak belirtilmiştir. KA, kuru ağırlığı ve TA, taze ağırlığı ifade etmektedir. (Devam)

Fabaceae	Acı bakla	<i>Lupinus albus</i> L.	3,83 ± 0,21 (TA)	HPLC-FD	Tohum	[47]
Fabaceae	Acı bakla	<i>Lupinus albus</i> L.	0,53 ± 0,04 (KA)	HPLC-FD	Tohum	[47]
Gouteng	Gouteng	<i>Uncaria rhynchophylla</i>	2460 (KA)	SPE-HPLC-FD	Tüm	[46]
Huang-qin	Huang-qin	<i>Scutellaria biacalensis</i>	7110	-	-	[48]
Huanglian	Huanglian	<i>Coptis chinensis</i> Franch	1008 (KA)	SPE-HPLC-FD	Tüm	[46]
Huangbo	Huangbo	<i>Phellodendron amurense</i> Rupr	1235 (KA)	SPE-HPLC-FD	Tüm	[46]
Hyperaceae	Sarı Kantaron	<i>Hypericum perforatum</i>	4390 (KA)	-	Çiçekler	[48]
Hyperaceae	Sarı Kantaron	<i>Hypericum perforatum</i> L.	1800 (KA)	HPLC ECD ve UV	Tohum	[49]
Hyperaceae	Sarı Kantaron	<i>Hypericum perforatum</i>	1750 (KA)	-	Yapraklar	[48]
Krizantem	Feverfew	<i>Tanacetum parthenium</i>	1920 -2450 (TA)	-	Yapraklar	[48]
Krizantem	Feverfew	<i>Tanacetum parthenium</i>	1370-1690	-	Yaprak	[48]
Lamiaceae	Adaçayı	<i>Salvia officinalis</i> L.	2,80-4,0	CEC	Tüm	[50]

Çizelge 1.1 Çeşitli bitkilerdeki melatonin seviyeleri ve tespit yöntemleri. Veriler ng/g olarak belirtilmiştir. KA, kuru ağırlığı ve TA, taze ağırlığı ifade etmektedir. (Devam)

Lamiaceae	Melisa	<i>Melissa officinalis</i> L.		UV Spektrofotometre	Tohum	[51]
Linaceae	Keten	<i>Linum usitatissimum</i> L.	12 (KA)	HPLC-ECD	Tohum	[40]
Moraceae	Sangye	<i>Morus alba</i> L.	1510 (KA)	SPE-HPLC-FD	Yaprak	[46]
Moraceae	İncir	<i>Ficus carica</i> L.	12,915	ELISA	Yapraklar	[32]
Moraceae	Dut	<i>Morus spp.</i> cv Buriram 60	279,6 (KA)	HPLC-FD	Yapraklar	[23]
Moraceae	Dut	<i>Morus spp.</i> cv Sakonnakhon	100,5 (KA)	HPLC-FD	Yapraklar	[23]
Moraceae	Dut	<i>Morus spp.</i> cv Khunphai	40,7 (KA)	HPLC-FD	Yapraklar	[23]
Musaceae	Muz	<i>Musa ensete</i>	0,655	GC/MS	Tüm	[38]
Papaveraceae	Haşhaş	<i>Popaver somniferum</i> L.	6 (KA)	HPLC-ECD	Tohum	[40]
Poaceae	Buğday	<i>Triticum spp.</i>	124,7±14,9	HPLC-ECD	Tohum	[32]
Poaceae	Yulaf	<i>Avena sativa</i> L.	90,6±7,7	HPLC-ECD	Tohum	[32]
Poaceae	Arpa	<i>Hordeum vulgare</i> L.	82,3±6,0	HPLC-ECD	Tohum	[32]

Çizelge 1.1 Çeşitli bitkilerdeki melatonin seviyeleri ve tespit yöntemleri. Veriler ng/g olarak belirtilmiştir. KA, kuru ağırlığı ve TA, taze ağırlığı ifade etmektedir. (Devam)

Poaceae	Uzun Çayır	<i>Festuca arundinacea</i> Schreb.	5,288	HPLC-FD	Tüm	[24]
Poaceae	Mısır	<i>Zea mays</i>	1,878	GC/MS	Tüm	[38]
Poaceae	Arpa	<i>Hordeum vulgare</i>	0,873	GC/MS	Tüm	[38]
Rhamnaceae	Hünnap	<i>Ziziphus jujuba</i> Lam.	146	HPLC-FD-MS	Tüm	[32]
Rosaceae	Ahududu	<i>Rubus idaeus</i> L.	387	HPLC-FD	Tüm	[32]
Rosaceae	Kiraz	<i>Prunus avium</i> L. cv. Hongdeng	10–20 (TA)	SPE-HPLC	Tüm	[36]
Rosaceae	Çilek	<i>Fragaria ananassa</i> (Camarosa, Candonga, Festival ve Primoris)	1,38–11,26 (TA)	LC-FD	Tüm	[52]
Rosaceae	Badem	<i>Prunus amygdalus</i>	39 (KA)	HPLC-ECD	Tohum	[41]
Rosaceae	Elma	<i>Malus domestica</i> Borkh. cv. Red Fuji	5 (TA)	HPLC	Tüm	[53]
Sangbaipi	Sangbaipi	<i>Mori Albae</i> (Cortex)	1110 (KA)	SPE-HPLC-FD	Korteks	[46]
Shiya cay yaprakları	Shiya çay yaprakları	<i>Babreum coscluea</i>	2120 (KA)	SPE-HPLC-FD	Tüm	[46]
Solanaceae	Goji Berry	<i>Lycium barbarum</i> L.	530,0	SPE-HPLC-FD	Tüm	[46]
Solanaceae	Goji Berry	<i>Lycium barbarum</i> L.	103	HPLC-ECD	Tohum	[41]

Çizelge 1.1 Çeşitli bitkilerdeki melatonin seviyeleri ve tespit yöntemleri. Veriler ng/g olarak belirtilmiştir. KA, kuru ağırlığı ve TA, taze ağırlığı ifade etmektedir. (Devam)

Solanaceae	Domates (transgenik)	<i>Solanum lycopersicum</i> L. cv. Micro-Tom	15,63–31,38 (TA)		Yapraklar	[54]
Solanaceae	Domates (doğal fenotip)	<i>Solanum lycopersicum</i> L. cv.	13,80 (TA)	HPLC	Yapraklar	[54]
Solanaceae	Domates (transgenik)	<i>Solanum lycopersicum</i> L. cv. Micro-Tom	7,39–10,34 (TA)	HPLC	Tüm	[54]
Solanaceae	Domates (doğal fenotip)	<i>Solanum lycopersicum</i> L. cv.	6,58 (TA)	HPLC	Tüm	[54]
Tiliaceae	İhlamur	<i>Tilia cordata</i> L.	410±16	CD-MEKC	Yapraklar	[32]
Vitaceae	Üzüm	<i>Vitis vinifera</i> L.	17,5 ± 0,28	UPLC- MS/MS	Tüm	[55]
Xanthorrhoeaceae	Aloe Vera	<i>Aloe vera</i> L.	516	SPE-HPLC-FD	Tüm	[46]
Yin yang huo	Yin yang huo	<i>Epimedium brevicornum</i> Maxim	1105 (KA)	SPE-HPLC-FD	Tüm	[46]
Zingiberaceae	Yeşil Kakule	<i>Elettaria cardamomum</i> (White et Maton)	15 (KA)	HPLC-ECD	Tohum	[40]
Zingiberaceae	Zencefil	<i>Zingiber officinale</i>	1,423	GC/MS	Tüm	[38]

1.3. MELATONİNİN BİTKİLERDEN EKSTRAKSİYONU VE ANALİTİK METOT ÇALIŞMALARI

MEL seviyesi hem bitkiden bitkiye hem de aynı bitkinin dokuları/organları arasında değişiklik gösterebilir. Ayrıca sıcaklık, pH, mevcut metal iyonlarının etkileri, analizlerin hassasiyeti ve ekstraksiyon yöntemleri de bu çeşitliliğe neden olabilir [32].

Melatoninin amfifilik karakteri nedeniyle en iyi sonuçları elde etmek için doğru ekstraksiyon çözücüsünü seçmek zordur [56]. MEL çözünürlüğünün; EtOH'de 182 g/L (20°C), EtOAc'da 16 g/L (20°C), EtOH:su (40/60)'da 64 g/L (20°C), Aseton'da 150 g/L (20°C) ve suda 20°C'de 2 g/L çözünürken 50°C'de 5 g/L olduğu bildirilmiştir [57]. Melatoninin kimyasal yapısı gereği sulu ortamda doğrudan çözmenin zorluğu nedeniyle, önce etanol veya dimetilsülfoksit gibi organik bir çözücüde çözülmesinin ve ardından sulu bir ortamda seyreltilmesiyle hazırlandığı bildirilmiştir [58]. Bu nedenle tespiti ve miktar tayini için organik çözücülerin (MeOH, CHCl₃ veya EtOAc) ve kısa süreli sonikasyonların kullanılması önerilmektedir [56]. Bazı araştırmacılar ise ekstraksiyonda çözücü olarak etanol, %10 Na₂CO₃, fosfat tamponlu salin veya potasyum fosfat tamponu gibi çeşitli çözücüler de kullanmışlardır [59]. MeOH, diğer organik çözücülerin aksine ekstra temizleme adımları gerektirmediği ve ters fazlı bir kolona doğrudan enjekte edilebildiği için önerilir. Ek olarak, numunelerin kısa bir süre ultrasonikatörde bekletilmesi, verimi yaklaşık %20 oranında artırabilir [56].

1995'te bitkide ilk melatonin tespitinden itibaren farklı bitki türlerinde ve dokularında, MEL'in pg/g⁻¹'den µg/g⁻¹'e kadar değişen konsantrasyonlarda bulunduğunu gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır [60]. MEL analizi için birçok yöntem uygulanmıştır. Bu yöntemler arasında HPLC (FD, UV ve ECD dedektör), LC-MS (Sıvı Kromatografi- Kütle Spektrometresi), GC-MS (Gaz kromatografisi- Kütle spektrometresi), RIA (Radyoimmunoassay), ELISA (Enzime bağlı immünosorbent deneyi), ICA (Immunkromatografik yöntemler) ve immünopresipitasyon sayılabilmektedir [61]. ELISA kitleri ticari olarak temin edilebilir ve kullanım kolaylığıyla birlikte MEL analizi için kullanışlı ve yaygın bir araçtır [62]. Fakat ELISA ve RIA antikorların çapraz reaktivitesi kaçınılmazdır ve bu da azalmış spesifite ve doğruluğa yol açar [56]. GC-MS' de ise hassasiyeti ve spesifiteyi artırsa da, numunenin uçucu türevlendirme gereksinimi MEL tayinine uygulanması için bir dezavantaj oluşturmaktadır. HPLC, MEL analizi için

en yaygın kullanılan teknik olup FD, ECD ve UV gibi farklı dedektörler ile birlikte kullanılmıştır. MS dedektörüne kıyasla, bu dedektörlerin duyarlılıkları daha düşüktür [62]. Fakat HPLC-UV, MS dedektöründen daha ucuz olması ve doğruluğu nedeniyle bitkilerde melatonini belirlemek için en yaygın kullanılan dedektörlerden biridir. 280 nm'de maksimum absorbansla spektrumlar elde edilebilir. Mobil fazları da zayıf asitlerle (Trifloroasetik asit veya Asetik asit) ayarlanmış asidik H₂O ve MeOH veya CH₃CN(Asetonitril)'den oluşur [56].

LC- MS ise yüksek hassasiyeti, tekrarlanabilirliği ve doğruluğu nedeniyle MEL analizi için güçlü bir yöntem olarak kanıtlanmıştır. Fakat, düşük konsantrasyonu ve bitki ekstraktının karmaşık yapısı nedeniyle, bitki dokularındaki melatonini doğrudan LC-MS ile analiz etmek pratik değildir [60]. Zorluğun üstesinden gelmek için; sıvı-sıvı ekstraksiyonu, katı faz ekstraksiyonu (SPE) ya da HPLC saflaştırması gibi farklı numune saflaştırma teknikleri bitki dokularından MEL içeriğini artırmak için yaygın olarak kullanılmıştır [62]. Biz de bu çalışmanın amacı doğrultusunda çeşitli bitki örneklerinde melatoninin ekstraksiyonu, saflaştırılması ve miktar tayini için basit, güvenilir ve geçerli bir analitik yöntem geliştirmeyi amaçlıyoruz [60].

1.4. MELATONİNİN FARMASÖTİK FORMUNA YÖNELİK YAPILAN ÇALIŞMALAR

Uyku, fiziksel sağlık ve yaşam kalitesinde hayati bir rol oynayan insan sağlığının önemli bir yönüdür. Ancak uyku bozuklukları, özellikle uykusuzluk, modern toplumda giderek yaygın hale gelmiştir [63]. Melatoninin farmakolojik etkileri, uyku bozukluklarının tedavisinde yaygın olarak belgelenmiştir. Tabletler, kapsüller, yumuşak tabletler (gummies), tozlar veya spreylere dahil olmak üzere çeşitli farmasötik formülasyonları mevcuttur. Bitkisel ve doğal takviyeler, daha düşük bağımlılık riski ve geleneksel ilaçlara göre daha az yan etki nedeniyle potansiyel uyku yardımcıları olarak popülerlik kazanmıştır [63].

MEL takviyelerinin düzenlenmesi ise ülkeler ve bölgeler arasında farklılık gösterir. Bu nedenle, diyet takviyeleri Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından kullanılan terimdir. Avrupa Topluluğu'nda (EC) ise Avrupa Nutrasötik Derneği (ENA) tarafından gıda takviyeleri olarak tanımlanır. Önemli bir fark, FDA tarafından tanımlanan diyet takviyelerinin ilaç olarak kabul edilmemesi ve kontrol veya değerlendirmeye tabi

olmamasına rağmen, ENA'nın gıda takviyelerini sınıflandırması ve kontrol etmesidir. MEL takviyeleri açısından, ABD'de melatonin dozu sınırlı değildir ancak EC düzenlemelerinde melatonin takviye dozunun 2 mg'dan az içermesini gerektirir [64].

Ticari ürünlerden biri, dondurularak kurutulmuş Montmorency ekşi kiraz kabuğu ekstraktından elde edilen fitomelatonin içeren (15 µg) tabletlerde satılan Sleep Support®'tur (Christchurch, Yeni Zelanda) ve uyku kalitesini iyileştirmek için çok düşük bir miktardır. Daha iyi bilinen bir diğer ürün ise 0,3 veya 3 mg fitomelatonin içeren tablet halinde formüle edilen Herbatonin®'dir (Symphony Natural Health, West Valley City, UT, ABD), İspanya'da ise Zentrum® (Ynsadiet Labs., Leganés, Madrid, İspanya) 1 mg dozlarda satılmaktadır. Bu formülasyon, pirinç (*Oryza sativa* L.) ve yonca (*Medicago sativa* L.) gibi çeşitli bitki türlerini ve yeşil alg *Chlorella pyrenoidosa* Chick'i içerir [64].

1.4.1. Yumuşak Tablet Formülasyonu

Yumuşak tablet, dokusu ve çeşitli tatlarıyla bilinen popüler bir formülasyon türüdür [65]. Aktif bileşenlerinin yumuşak, esnek ve elastik bir matriste çözünmesi veya dağılması ile yumuşak tablet formu elde edilir [66].

Yumuşak tablet formülasyonunun ana bileşenleri jelleştirici maddeler, şeker, su, tatlandırıcı ve aromadan oluşur [66]. Yumuşak tablet preparatlarının formülasyonunda önemli temel bileşen, kalıp formu oluşturma işlevi gören jelleştirici maddelerdir [66]. Bunlar; agar agar [65], jelatin, nişasta, gam ve pektin gibi çeşitli jelleştirici maddeler kullanılır [66]. Nihai ürüne güçlü ve şeffaf bir doku sağlayabilen jelatinin küresel pazarda birincil üretim kaynağı domuz derisi olduğundan, insanlar için tartışmalıdır. Bu nedenle modifiye nişasta ve agar agar gibi jelleştirici maddeler yaygın olarak kullanılır [67]. Miktar açısından en önemli diğer temel bileşen ise tatlandırıcı maddelerdir; sakkaroz, glikoz ve mısır şurupları [68] yaklaşık olarak 55 g/100 [69] içerir. Yumuşak tabletlerin diğer temel bileşenleri arasında, tat dengesi için sitrik asit ve malik asit gibi asitlendiriciler [65], canlı görünüm için gıda sınıfı renklendiriciler ve tadı geliştirmek için tatlandırıcılar özellikle eklenir [68].

İlk ticari yumuşak tablet olan State of Maine Pure Spruce Gum, 1848'de ortaya çıktı. İlk tıbbi yumuşak tablet ise, 1924'te ABD'de Aspergum® marka adıyla tanıtıldı [70]. Yumuşak tabletlerin, kapsüllere veya sıvı formlara göre birçok avantajı vardır: Genellikle daha lezzetlidir. Çiğnemesi ve yutulması kolaydır. Çeşitli şekil ve boyutları sayesinde hem çocuklar hem de yetişkinler tarafından beğenilen bir forma sahiptirler. Tabletlerin

aksine, tüketim için suya ihtiyaç duyulmaz [65]. Çocuklar, bazı dönemlerde tedavi amaçlı yaygın kullanılan çeşitli şurup ve tabletleri tadı ve formlarından ötürü reddedebilirler. Bu sorunu çözmek ve hasta uyumunu artırmak için doğal jelleştirici maddeler ile yumuşak tablet formülasyonu geliştirilebilir. Bu yumuşak tablet formu sayesinde özellikle tablet/kapsül yutmayı veya oral süspansiyon almayı sevmeyen çocuklar için ilaç alma daha keyifli hale getirilebilir [71].

1.5. TEZİN GENEL AMACI

Bitkilerin MEL içeriği hakkındaki detaylı literatür taramaları baz alınarak bu tez kapsamında; Gümüşi Ihlamur (*Tilia tomentosa* Moench), Papatya (*Matricaria recutita* L.), Melisa (*Melissa officinalis* L.), Adaçayı (*Salvia officinalis* L.) ve Sarı Kantaron (*Hypericum perforatum* L.) bitkilerinden melatonin tayini yapılması hedeflenmektedir. Aynı zamanda daha önce çalışılmamış fakat literatür taramaları doğrultusunda melatonin içerebileceğini düşündüğümüz Şekerotu (*Stevia rebaudiana* Bertoni) bitkisinde de melatonin tayini yapılması hedeflenmiştir.

Ihlamurun tedavi edici, sakinleştirici, uyuşturucu etkisi [72]; Adaçayının zihinsel karışıklık, sinirlilik, anksiyete, depresyon, hafıza bozukluğu olmak üzere çeşitli hastalıklar üzerine tedavi edici etkisi [73]; Melisanın hafıza güçlendirici, sakinleştirici, depresyon ve anksiyete, kabus, uyku kalitesi, süresi ve verimliliğine olan olumlu etkisi [74],[75],[76]; Sarı Kantaronun hafif ve orta şiddetli depresyon tedavi edici etkisi [77]; Papatyanın özellikle sakinleştirici, rahatlatıcı, stres giderici, uyku gecikmesini azaltma ve uyku kalitesini iyileştiren doğal bir uyku yardımcı etkisi [78],[79]; Stevia'nın merkezi sinir sistemi ve depresyon üzerine olumlu etkisi [80] seçilen bitkilerin MEL içerdiğine dair tahminleri desteklemektedir.

Özellikle, MEL içeriği ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmayan Stevia'nın, betakaryofilen ve karyofilen oksit içermesi sebebiyle merkezi sinir sisteminin aktivitesini baskılayabildiği ve sinir iletim hızını yavaşlatabildiği bilinmektedir [81]. Aynı zamanda, Mousavi-Niri vd. (2023)'de yaptıkları çalışmada Stevia'nın antidepresan benzeri yanıt gösterdiği ve terapötik yaklaşımlarda kullanılabileceğini bildirmişlerdir [80]. Dolayısıyla, melatonin içeriği hakkında literatüre yeni bir bilgi kazandırmak amaçlı Stevia'nın da çalışılmasına karar verildi.

Kısaca bu çalışmanın amacı, detaylı literatür taramaları sonucunda belirlenen; Gümüşi Ihlamur (*Tilia tomentosa* Moench), Papatya (*Matricaria recutita* L.), Melisa (*Melissa officinalis* L.), Şekerotu (*Stevia rebaudiana* Bertoni), Adaçayı (*Salvia officinalis* L.) ve Sarı Kantaron (*Hypericum perforatum* L.)’un kurutulmuş formlarından melatonin ekstraksiyonu ve içerik tayini için basit, güvenilir ve geçerli analitik yöntemin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Daha sonra en yüksek melatonin içeriğine sahip olan bitkiden saflaştırma yapılması ve karakterizasyonu için gerekli analizlerin yapılması hedeflenmiştir. Son aşama da ise, bitki kaynaklı melatonini farmasötik formda değerlendirmek için, seçilen yumuşak tablet formu ile birleştirilmesi amaçlanmaktadır. Özetle, bitki kaynaklı melatoninin (fito-melatoninin) yumuşak tablet farmasötik formunda tasarlanması amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. BİTKİ MATERYALİNİN TEMİNİ

Bu çalışma kapsamında Gümüş İhlamur (*Tilia tomentosa* Moench), Papatya (*Matricaria recutita* L.), Melisa (*Melissa officinalis* L.), Şekerotu (*Stevia rebaudiana* Bertoni), Adaçayı (*Salvia officinalis* L.) ve Sarı Kantaron (*Hypericum perforatum* L.) bitkileri kullanılmıştır.

Araştırmada kullanılan; Gümüş İhlamur (*T. tomentosa* Moench) ve Adaçayı (*S. officinalis* L.) kurutulmuş bitki örneği Tıbbi ve Aromatik Bitki Laboratuvarı (Sakarya)'ndan Ekim 2023 tarihinde temin edildi.

Sarı Kantaron (*H. perforatum* L.) ve Şekerotu (*S. rebaudiana* Bertoni)'ın kurutulmuş bitki örnekleri Düzce yerel pazarlarından Temmuz 2023 tarihinde temin edildi.

Adaçayı (*S. officinalis* L.), Papatya (*M. recutita* L.), Melisa (*M. officinalis* L.) ve Sarı Kantaron (*H. perforatum* L.)'un kurutulmuş bitki örnekleri Temmuz Organik Üretim Çiftliği (Konya)'dan Temmuz 2023 tarihinde temin edildi.

2.2. CİHAZLAR

Araştırmada kullanılan başlıca cihazlar; -20°C ve 4°C Buzdolabı (Arçelik), Buz makinesi (Uğur Ubm 60), Hassas Terazı (Mettler Toledo XS205DU), Soğutmalı Santrifüj Cihazı (Thermo Heraeus Biofuge Stratos Roto 3335), Su Banyosu (HydraUltrasonic), Isıtıcıli Manyetik Karıştırıcı (Heidolph MR Hei Standard),Vorteks (IKA VORTEX 3), HPLC UV(Shimadzu LC-2050C Ant Teknik) ve Empower yazılımı, LC-MS/MS (Shimadzu LC-MS/MS 8040), Evaporatör (Heidolph Laborota 4000-efficient), Saf su cihazı (Sartorius arium 611 UV), PH metre (WTW İnolab Ph7310P), Liyofilizatör (Christ Epsilon 2-4 LSCplus), FTIR (Agilent Cary 630), RAMAN(Renishaw RA802) ve WiRE yazılımı, Nem cihazı(Metrohm 915 KF Ti-Touch), Sertlik Cihazı (Sotax MT-50) ve Dağılma Cihazı(Sotax DT2)'dır.

Araştırmada kullanılan başlıca malzemeler; Mikropipet seti (Thermo Scientific-Finnpipette), mermer havan, beher (Isolab) , santifürüj tüpleri (Isolab), mobil faz şişeleri, cam petri kapları, balon jojeler (Isolab) , 0,20 µm PTFE filtre (Isolab) , 0,45 µm membran

filtre (Isolab), cam vialler, ACE 5 C18 250×4,6 mm 5µ HPLC kolonu, ayırma hunisi (Isolab) ve düzeneği

2.3. KİMYASAL MADDELER VE REAKTİFLER

Referans olarak kullanılan Melatonin (CAS: 73-31-4 ve %99.0 saflık), Bio Basic firmasından satın alındı. Asetonitril (Merck Supelco), MeOH (J.t.Baker), etanol absolute (Isolab), *n*-hekzan (Honeywell), *n*-bütil alkol (Sisco Research Laboratories/SRL), etil asetat (Isolab), %37'lik hidroklorik asit (Isolab), asetik asit (Sisco Research Laboratories/SRL), kloroform (Sisco Research Laboratories/SRL) Nobel İlaç ARGE laboratuvarından temin edildi.

Farmasötik form için gerekli olan; Pharmagar type E 406 Pharmaceutical Grade (The Agar Company), Sucrose (Sacchrose) Emprove Expert (Merck), Neosorb P100 -Sorbitol (Roquette), Dualake FD%C Red 40 (Sensient), Sitrik asit monohidrat (Jungbunzlauer), Sodyum Benzoat (Emerald) ve Kiraz Aroması (Aromsa) maddeleri de Nobel İlaç ARGE'den temin edildi.

2.4. KİMYASAL ÇÖZELTİLER VE HAZIRLANIŞLARI

Çalışmada kullanılan kimyasal çözeltiler analitik saflıkta aşağıda belirtildiği şekilde hazırlanmıştır;

Ekstraksiyon Çözücüleri:

0,1M HCl Hazırlanışı: 8.3 mL HCl 1000 mL'lik cam şişede karıştırılarak hazırlandı.

MeOH: Saf Su: 0,1M HCl (700:299:1) şeklinde 1000 mL'lik cam şişede karıştırılarak hazırlandı. Güllüoğlu vd. (2024) çalışması referans alındı [82].

EtOH: Saf Su: 0,1M HCl (700:299:1) şeklinde 1000 mL'lik cam şişede karıştırılarak hazırlandı.

MeOH: Saf Su (500:500) şeklinde 1000 mL'lik cam şişede karıştırılarak hazırlandı.

EtOH: Saf Su (500:500) şeklinde 1000 mL'lik cam şişede karıştırılarak hazırlandı.

MeCN: Saf Su (500:500) şeklinde 1000 mL'lik cam şişede karıştırılarak hazırlandı.

2.5. MELATONİN EKSTRAKSİYONU ÇÖZÜCÜ SEÇİMİ

1000 ppm standart stok çözeltisi: 1 mg MEL+ 1 mL çeşitli çözücüler ile çözdürülerek hazırlandı. Hazırlanan 1000 ppm standart stok çözeltisinden 100 ppm (100 µL (1000 ppm stok std) + 900 µL çözücü) konsantrasyonunda çeşitli çözücüler ile aşağıdaki Çizelge 2. 1'deki şekilde standartlar hazırlandı.

Çizelge 2. 1. Çeşitli çözücülerle 100 ppm konsantrasyonunda standart hazırlanması

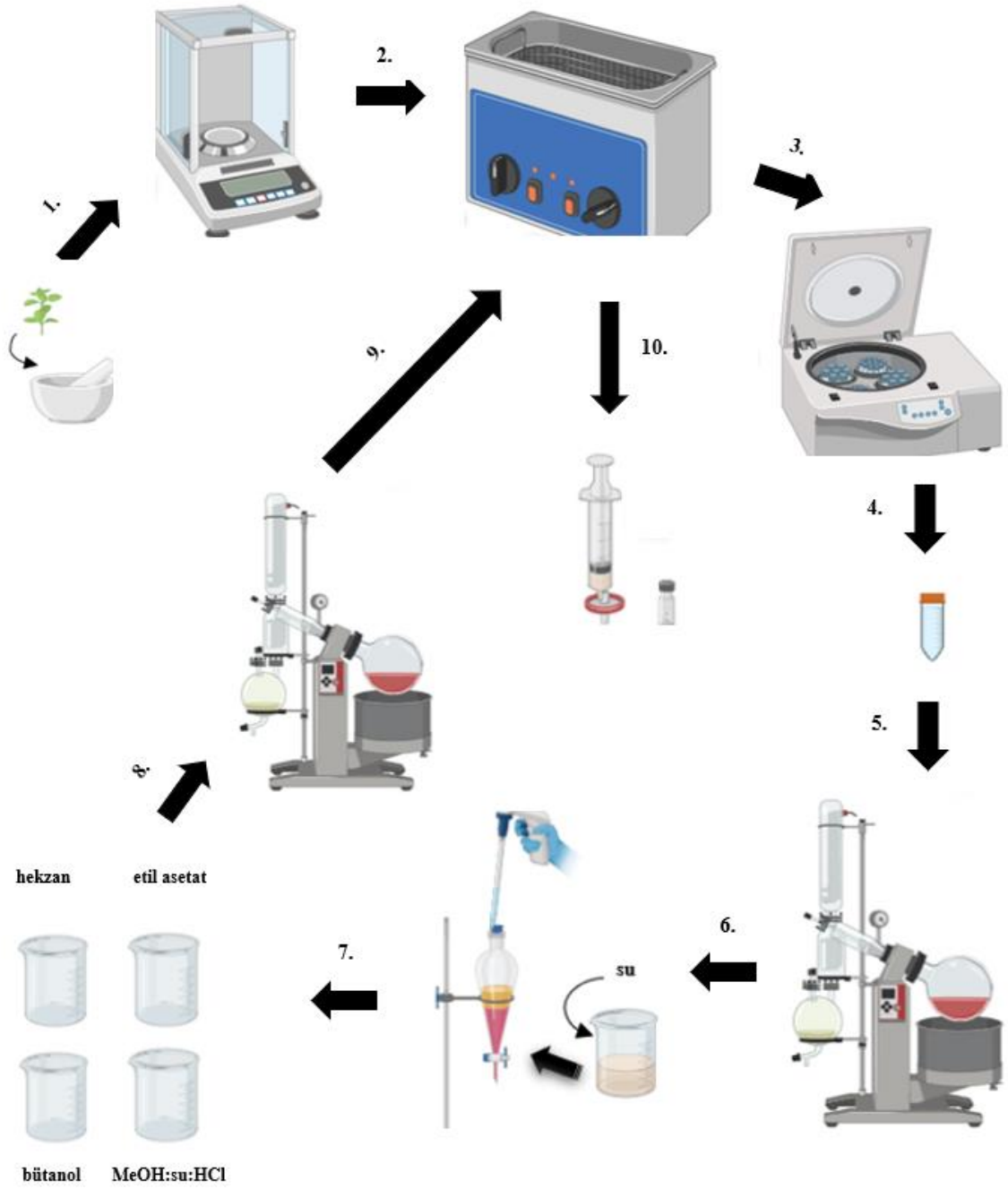
Çözücüler	Konsantrasyon (ppm)	Standart Stok Hacim (µL)	Çözücü (µL)	Toplam Hacim (µL)
Saf su	100 ppm	100 µL (1000 ppm)	900 µL	1000 µL
MeOH	100 ppm	100 µL (1000 ppm)	900 µL	1000 µL
EtOH	100 ppm	100 µL (1000 ppm)	900 µL	1000 µL
MeCN	100 ppm	100 µL (1000 ppm)	900 µL	1000 µL
MeOH: Saf Su (500:500)	100 ppm	100 µL (1000 ppm)	900 µL	1000 µL
EtOH: Saf Su (500:500)	100 ppm	100 µL (1000 ppm)	900 µL	1000 µL
MeCN: Saf Su (500:500)	100 ppm	100 µL (1000 ppm)	900 µL	1000 µL
EtOH: Saf Su: 0,1M HCl (700:299:1)	100 ppm	100 µL (1000 ppm)	900 µL	1000 µL

Çizelge 2.1. Çeşitli çözücülerle 100 ppm konsantrasyonunda standart hazırlanması
(Devam)

MeOH: Saf Su: 0,1M HCl (700:299:1)	100 ppm	100 µL (1000 ppm)	900 µL	1000 µL
--	---------	----------------------	--------	---------

2.6. MELATONİN EKSTRAKSİYON PROSEDÜRÜ

İhlamur, Papatya, Melisa, Şekerotu, Adaçayı ve Sarı Kantaronun kurutulmuş bitki örneklerinden ekstraksiyon ile ayırma hunisi kullanılarak gerçekleştirildi. Birbiri ile karışmayan iki sıvı çalkalanarak birbiri ile temas etmeleri sağlandı ve böylece melatoninin hangi çözücü fazına ne kadar geçebildiği incelendi. Bitki örneklerinin kurutulmuş formları havanda iyice toz ezildi. Hassas terazide beher içerisine 1 g kuru bitki örneği tartıldı. Üzerine 10 mL ekstraksiyon çözücüsü eklendi. Çözelti 4°C'deki ultrasonik banyoya 20 dk boyunca bırakıldı. Ultrasonik sonrası, beher içinde numune santifürüj tüpüne aktarılarak 8500 rpm'de 5 dk santifürüj edildi. Santifürüj edilen numunenin süpernatantı bir evaporatör balonuna aktarılarak uçurulur. Uçurulan numunenin üstüne 5 mL su eklenip ayırma hunisine aktarılır. 5 mL suyun üstüne +3 mL hekzan eklendi ve karıştırıldı. Birkaç dk bekleyip fazların ayrımı belirginleşince üst fazı bir vialle alındı. Daha sonra ayırma hunisine 3 mL etil asetat eklenip karıştırıldı. Birkaç dk bekleyip fazların ayrımı belirginleşince üst fazı bir vialle alındı. Daha sonra ayırma hunisine 3 mL bütanol eklenip karıştırıldı. Birkaç dk bekleyip fazların ayrımı belirginleşince üst fazı bir vialle alındı. Ayırma hunisinde kalan sulu faz ise tekrar evaporatörde uçuruldu ve kalan katı 2 mL ekstraksiyon çözücüsü ile karıştırılıp 5 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Ultrasonikten alınan ve diğer faz numuneleri PTFE 0,45 µm'lik filtreden süzülerek HPLC viallerine aktarıldı. Güllüoğlu vd. (2024)'nın çalışması referans alınıp, metot üzerinde çeşitli değişimler yapılarak optimize edilmiştir [82].



Şekil 2. 1. Kurutulmuş bitki örneklerinde yapılan melatonin ekstraksiyonunun aşamaları
(S. ZARF TOKAN tarafından BioRender programında çizilmiştir)

2.6.1. Melatonin Ekstraksiyonuna Işık ve Karanlık Etkisi

İlk olarak, normal şartlarda tek konsantrasyon (1000 ppm) melatonin standardı hazırlanır ve cihaza yüklenir.

Karanlık numunesi: Tamamen karanlık şartlarda 1 mg melatonin standardı, dışı alüminyum folyo ile kaplanmış bir ependorf tüpüne tartılır ve MeOH: Saf Su: 0,1M HCl ile çözülür. 1000 ppm konsantrasyonundaki bu numune 24 saat boyunca oda şartlarında karanlıkta bekletildikten sonra cihaza yüklenir.

Işık numunesi: Aydınlik şartlarda 1 mg melatonin standardı, bir ependorf tüpüne tartılır ve MeOH: Saf Su: 0,1M HCl ile çözülür. 1000 ppm konsantrasyonundaki bu numune 24 saat boyunca oda şartlarında beyaz ışık altında bekletildikten sonra sonra cihaza yüklenir.

2.7. MELATONİN İÇERİĞİNİN HPLC-UV İLE KANTİTATİF TAYİNİ

HPLC-UV Mobil Faz:

MeOH: Saf Su: Asetik Asit (550:449:1) şeklinde 1000 mL'lik mobil faz şişesinde karıştırılarak hazırlandı.

MEL Standart Stok Çözelti:

1000 ppm: 1 mg MEL + 1 mL MeOH: Saf Su: 0,1M HCl (70:29.9:0,1) çözücü ile hazırlandı. Hazırlanan 1000 ppm standart stok çözeltisinden 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm, 50 ppm ve 100 ppm konsantrasyonlarında melatonin çözeltileri aşağıdaki Çizelge 2. 2'deki gibi hazırlandı.

Çizelge 2. 2. 1000 ppm standart stok çözeltisinden çeşitli konsantrasyonlarda standart hazırlanması

Konsantrasyon (ppm)	Standart Stok Hacim (µL)	Çözücü (µL)	Toplam Hacim (µL)
1 ppm	100 µL (10 ppm)	900 µL	1000 µL

Çizelge 2.2. 1000 ppm standart stok çözeltisinden çeşitli konsantrasyonlarda standart hazırlanması (Devam)

5 ppm	500 µL (10 ppm)	500 µL	1000 µL
10 ppm	100 µL (100 ppm)	900 µL	1000 µL
25 ppm	500 µL (50 ppm)	500 µL	1000 µL
50 ppm	500 µL (100 ppm)	500 µL	1000 µL
100 ppm	500 µL (1000 ppm)	500 µL	1000 µL

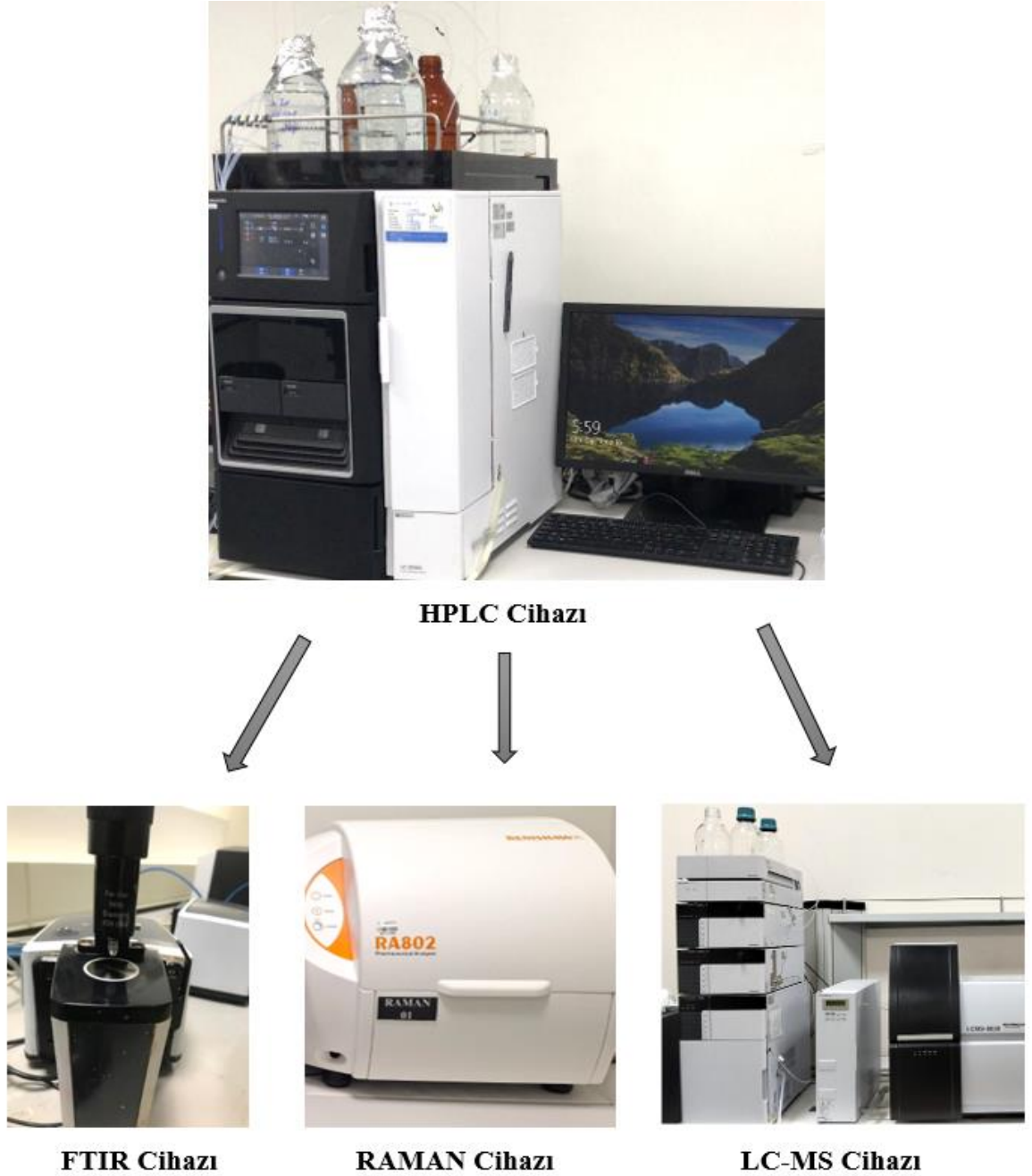
Ekstraksiyonu yapılan bitki örneklerindeki melatonin analizi HPLC-UV ile gerçekleştirildi. Güllüoğlu vd. (2024)'nın çalışması [82] referans alınarak hazırlanan MeOH: Saf Su: Asetik Asit (550:449:1) mobil faz ve ACE 5 C18 250×4,6 mm 5µ kolon cihaza takılır. Cihaz parametreleri; 280 nm dalga boyu, 0.5 mL/dk akış hızı, kolon sıcaklığı 40°C ve numune sıcaklığı 15°C olarak analiz gerçekleştirildi. 10 µl enjeksiyon hacmi ve analiz süresi 10 dk olarak belirlendi. Cihaza ilk olarak stok standarttan seyreltilerek hazırlanmış olan 1,5,10,25,50 ve 100 ppm konsantrasyonları sırasıyla okutularak kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Daha sonra numuneler sırasıyla cihaza verildi.

2.8. MELATONİNİN SAFLAŞTIRILMA AŞAMALARI

Ekstraksiyonda en yüksek verim sağlayan yani melatonin içeriği en yüksek olan bitki numunesi seçilip verimi artırmak için büyük ölçekte ekstraksiyon yapıldı. Burada amaç, miktarlar artırılarak verimi artırmak hedeflendi. Hacimlerin artırılması dışında her şey aynı şekilde ekstraksiyon prosedürüne göre yapıldı ve numune cihaza yüklendi. Daha sonra kullandığımız HPLC-UV analitik metodu ile melatonin pikinin kolona tutunduğu zaman aralıkları belirlendi ve bu zaman aralıklarındaki melatonin piki cihazdan toplanarak saflaştırılmış oldu. Saflaştırılan melatoninin kesin karakterizasyonu için LC-MS ile analiz edildi.

2.9. SAFLAŞTIRILAN MELATONİN KARAKTERİZASYONU

HPLC-UV cihazından saflaştırılan melatoninin karakterizasyonu için FTIR, RAMAN ve LC-MS cihazları kullanıldı.

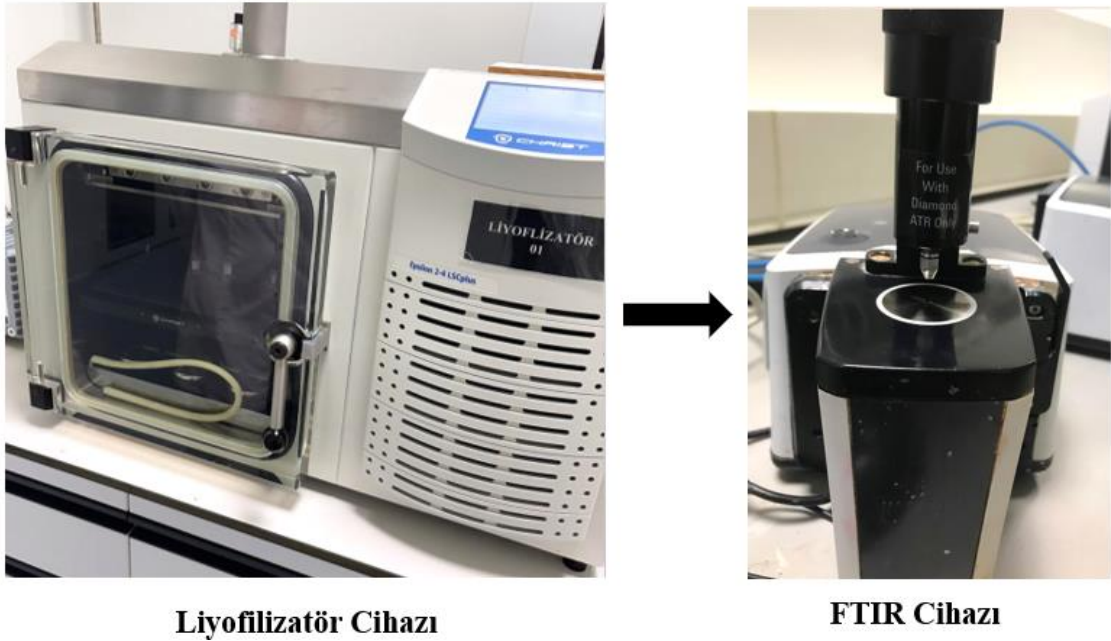


Şekil 2.2. HPLC-UV cihazından saflaştırılan melatoninin karakterizasyon analizi için kullanılan FTIR, RAMAN ve LC-MS cihaz sistematiği

2.9.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) ile Analizi

HPLC-UV cihazından saflaştırılan sıvı melatonin numunesinden çözücüyü uzaklaştırmak için liyofilizatör kullanıldı. Numune, kapağı yarım açık şekilde cam GC vialine ve kapak kısmı delinmiş HPLC vialine aktarılarak 26 saat boyunca kademeli bir şekilde çözücü uzaklaştırıldı. Daha sonra vial dibinde oluşan katı ile FTIR analizi yapıldı.

Melatoninin yapısında bulunan fonksiyonel grup ve atomlar arasındaki bağları belirlemek için Agilent Cary 630 FTIR spektroskopisi kullanılmıştır. Saflaştırılan liyofilize melatoninin transmisyon modunda ve spektrum aralığı $1000\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ arasında bakıldı.



Şekil 2.3. Liyofilizatör cihazında kurutulan melatonin numunesine, FTIR cihazında yapılan karakterizasyon analizi

2.9.2. Raman Spektroskopisi ile Analizi

HPLC-UV cihazından saflaştırılan sıvı melatonin numunesinden çözücüyü uzaklaştırmak için liyofilizatör kullanıldı. Numune, kapağı yarım açık şekilde cam GC vialine ve kapak kısmı delinmiş HPLC vialine aktarılarak 26 saat boyunca kademeli bir şekilde çözücü uzaklaştırıldı. Daha sonra vial dibinde oluşan katı ile Raman analizi yapıldı.

Melatoninde bulunan farklı fonksiyonel grupları tespit etmek amacıyla saflaştırılan liyofilize melatonin, lamın üstüne çok az miktarda eklenir ve WiRE yazılımına sahip

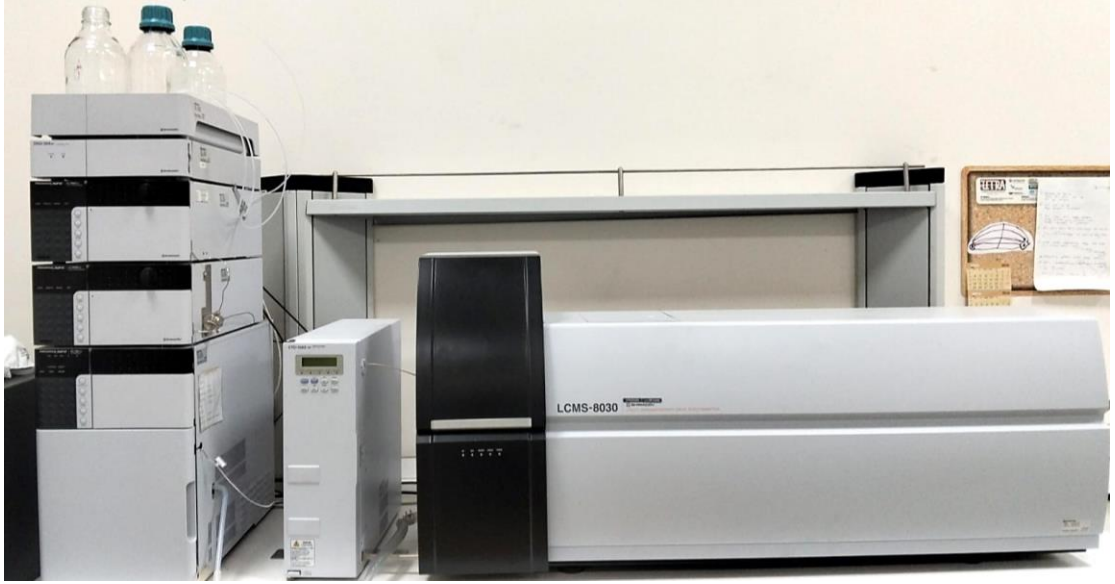
Renishaw Raman spektroskopisi kullanılarak analiz edilir. Cihazın lazer gücü ile 100-2000 cm^{-1} spektrum aralıklarına bakıldı.



Şekil 2.4. Liyofilizatör cihazında kurutulmuş melatonin numunesine, RAMAN cihazında gerçekleştirilen karakterizasyon analizi

2.9.3. LC-MS ile Melatonin Analizi

HPLC-UV cihazından saflaştırılan sıvı melatonin, kütle ve yavru iyon taraması için Shimadzu LC-MS/MS 8040 cihazı ve LabSolutions yazılımı kullanılmıştır. Bu analizde kullanılan MeOH ve su, MS-Grade olmasına dikkat edilerek hazırlanmıştır. Mobil faz A: % 1 formik asit içeren su ve mobil Faz B: % 1 Formik asit içeren MeOH'dır. Vial içindeki sıvı numune, kütle ve yavru iyon tarama amaçlı infüzyon şeklinde cihaza verildi. MS dedektöründe, 0,3 mL/dk akış hızı ve pozitif iyon elektrosprey modunda (ESI+) analiz gerçekleştirildi.



Şekil 2.5. HPLC-UV cihazından saflaştırılan melatoninin, LC-MS cihazında gerçekleştirilen karakterizasyon analizi

2.10. MELATONİNİN FARMASÖTİK FORMDA DEĞERLENDİRİLMESİ

Temel bileşeni hidrofilik ve kolloidal bir polisakkarit kompleksi olan agar agar ile diğer ana bileşenleri arasında tatlandırma amacıyla eklenen sorbitol ve sükroz, canlı görünüm için bir renklendirici ve tadı zenginleştirmek için eklenen bir aroma kullanılarak oluşturulan yumuşak tablet formu geliştirildi.

2.10.1. Yumuşak Tablet Formunun Hazırlanması

Yumuşak tablet preparatlarının formülasyonunda önemli birinci bileşen, kalıp formu oluşturma işlevi gören jelleştirici maddelerdir. Bunlar; agar agar, jelatin, nişasta, gam, PEG türleri ve pektin gibi çeşitli jelleştirici maddeler kullanılır. Çeşitli denemelerden sonra en uygun yumuşak tablet formülasyonunun agar agar ile olduğuna karar verildi. Agar, kaynar suda çözünür ve sulu çözelti soğutulduğunda jöle kıvamı oluşturur. İkinci önemli bileşen ise tatlandırıcı maddelerdir; sorbitol ve sükroz tatlandırıcı madde olarak ürün formülasyonuna eklendi. Sorbitol, kristalleşme riskini azaltır ve iyi bir nemlendiricidir fakat bazı kişilerde müshil etkisi yapabildiğinden sükroz ile birlikte kullanılıp tat dengesi ayarlandı. Kullanılan maddeler ve miktarları aşağıdaki Çizelge 2.3'de gösterilmektedir.

Çizelge 2. 3. Yumuşak tablet formunun formülasyon bileşenleri

Faz	Bileşenler	Yüzde (%)	Kullanım Amacı
A	Agar agar	1,60	Jelleştirici madde
	Saf su	62,96	Çözücü
B	Sorbitol	8,18	Tatlandırıcı
	Sükroz	11,62	Tatlandırıcı
	Saf su	15,82	Çözücü
C	Bitkisel melatonin	50 µL	Sakinleştirici ve uyku desteği
D	Sitrik Asit (%50)	0,020	Aroma artırıcı
	Sodyum Benzoat	0,006	Koruyucu
	Aroma	0,084	İlave aroma
	Renklendirici	0,087	Renklendirici madde
	Total Hacim	100 g	

Yumuşak tablet formunun aşamaları şu şekildedir:

1.Adım: A fazında agar, saf su ile karıştırılarak 150°C’de 15 dk manyetik karıştırıcı üzerinde (700 rpm) ısıtılarak karıştırılır.

2.Adım: B fazında sorbitol ve sükroz, saf su ile 120 °C’de 20 dk karıştırılarak, kalın kıvamlı bir hale gelene kadar ısıtılır.

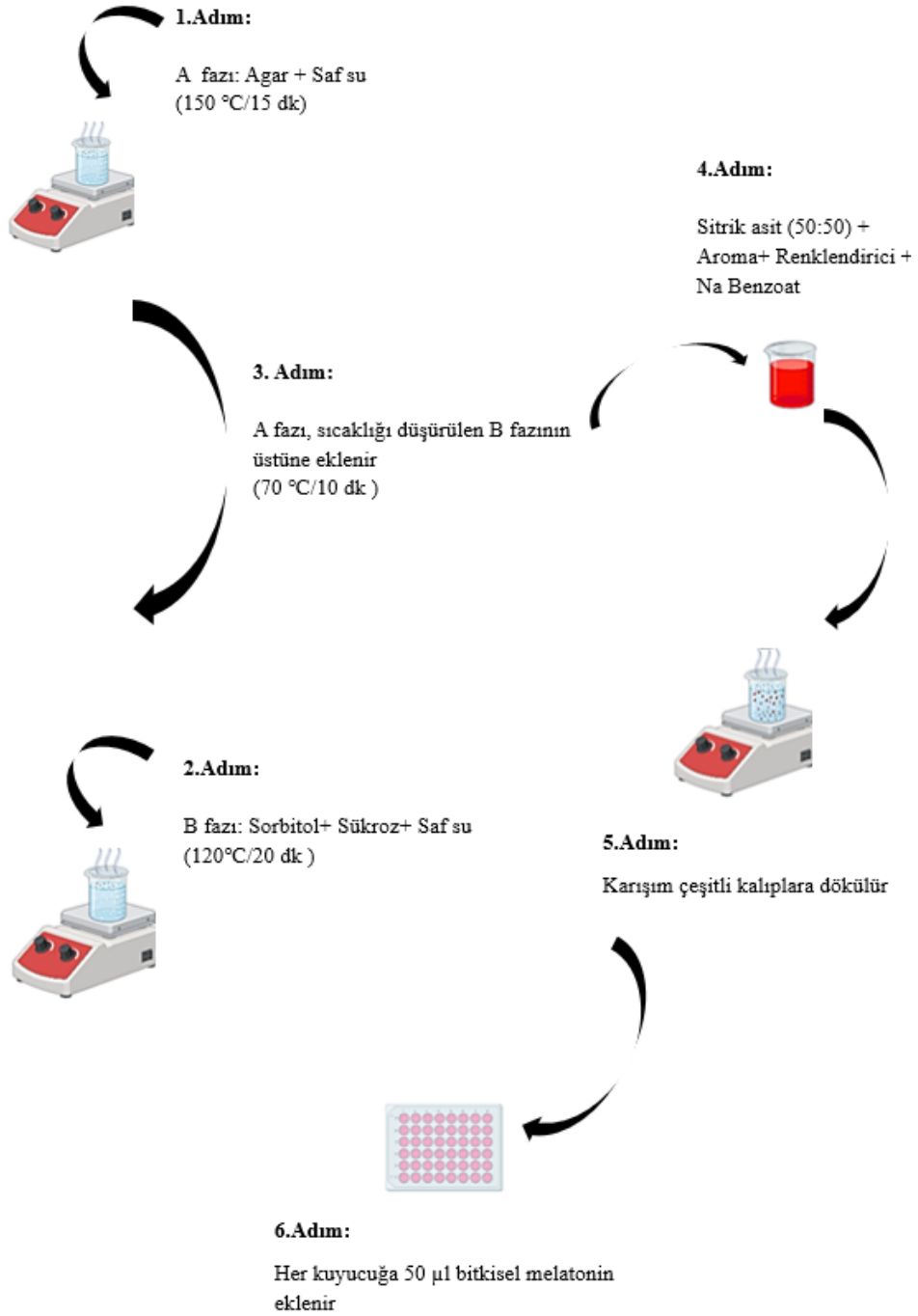
3.Adım: B fazının sıcaklığı 70-80 °C’lere düşürülür ve üstüne A fazı eklenir ve cam çubukla iyice 10 dk karıştırılır.

4.Adım: C fazı, sitrik su ile çözündürülür. Sitrik asidin çözelti olarak eklenmesi önemlidir. Aksi halde yumuşak tablet formunun içinde taneli olarak kalacaktır. Sitrik asit çözeltisinin içine Sodyum benzoat, aroma ve renklendirici eklenir ve çözelti cam çubukla

kariştırılır. Hazırlanan bu çözelti, A ve B fazları total karişımın üstüne eklenerek iyice kariştırılır.

5.Adım: pH metre ile pH seviyesi kontrol edilerek kalıplara dökülür.

6.Adım: Kalıplara dökülen her yumuşak tablet formunun içine mikropipet ile hızlıca 50 µl bitkisel melatonin (1,45 mg MEL) eklenir ve +4°C'ye kaldırılarak katılaşmasına izin verildi.



şekil 2.6. Yumuşak tablet formunu hazırlama adımları (S. ZARF TOKAN tarafından BioRender programında çizilmiştir)

2.11. YUMUŞAK TABLET FORMUNUN KARAKTERİZASYON ANALİZLERİ

+4°C’deki katılaşmanın ardından, yumuşak tablet kalıplardan dikkatlice çıkarıldı ve nihai ürün çeşitli değerlendirme parametreleri için analiz edildi.

2.11.1. Yumuşak Tablet Değerlendirme Parametreleri

1. Fiziksel Görünüm: Hazırlanan tüm yumuşak tabletler renk, şekil, koku, tat ve doku açısından olarak incelenir

2. Ağırlık Değişimi: Toplam 10 adet yumuşak tablet hassas terazide tartıldı ve toplam ağırlık belirlendikten sonra ortalama ağırlık belirlendi.

3. Dağılma analizi: 6 adet yumuşak tabletin Sotax DT2 dağılma cihazında çözünme süreleri incelenmiştir. 37°C'de 200 mL saf su bulunan bir beher içindeki dağılma aparatına 6 adet yumuşak tablet eklenir. Çözünme sürecini izlemek ve çözünme süresini belirlemek için kronometre kullanıldı.



Şekil 2.7. Yumuşak tablet formunun dağılma cihazında gerçekleştirilen karakterizasyon analizi

4.Nem İçeriği: 2 adet yumuşak tabletin Metrohm 915 KF Ti-Touch nem cihazında su içeriğine bakılmıştır.



Şekil 2.8. Yumuşak tablet formunun nem cihazında gerçekleştirilen karakterizasyon analizi

5.Sertlik: 10 adet yumuşak tabletin Sotax MT50 sertlik cihazında sertlikleri kontrol edilmiştir.



Şekil 2.9. Yumuşak tablet formunun sertlik cihazında gerçekleştirilen karakterizasyon analizi

6. pH: Yumuşak tablet formu kalıba dökülmeden önce pH metre kullanılarak pH'sı kontrol edildi.



Şekil 2.10. Yumuşak tablet formunun pH metre kullanılarak gerçekleştirilen karakterizasyon analizi

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. BİTKİ ÖRNEKLERİNDEN EKSTRE EDİLEN MELATONİNİN HPLC-UV ANALİZİ SONUÇLARI VE DEĞERLENDİRİLMESİ

3.1.1. Melatonin Ekstraksiyonunda En Uygun Çözücünün Belirlenmesi

Melatoninin amfifilik karakteri nedeniyle en verimli sonuçları elde etmek için doğru ekstraksiyon çözücüsünü seçmek oldukça zordur [56]. Bizde bu kapsamda MeOH, EtOH, MeCN, MeOH: Saf Su (500:500), EtOH: Saf Su (500:500), MeCN: Saf Su (500:500), EtOH: Saf Su: 0,1M HCl (700:299:1), MeOH: Saf Su: 0,1M HCl (700:299:1) ve saf su ekstraksiyon çözücüsü olarak denendi ve sonuçları Çizelge 3. 1’de gösterildi. En iyi çözünme, MeOH çözeltisi ile gerçekleşmesine rağmen pik simetrisi yeterince iyi değildi. Dolayısıyla, pik simetrisi ve çözünme veriminden ötürü MeOH: Saf Su: 0,1M HCl (700:299:1) en doğru ve uygun ekstraksiyon çözücüsü olarak belirlendi.

Çizelge 3. 1. Melatonin ekstraksiyonunda kullanılan 100 ve 1000 ppm konsantrasyonlarındaki çözücülerin HPLC-UV analizi ile belirlenen alanları

Çözücüler	100 ppm (280 nm / 20µL)	1000 ppm (280 nm / 20µL)
Saf su	-	20672197
MeOH	3697418	31163264
EtOH	1540235	16645734
MeCN	1601303	27046182
MeOH: Saf Su (500:500)	3007515	26242747
EtOH: Saf Su (500:500)	2701692	12018951

Çizelge 3. 1. Melatonin ekstraksiyonunda kullanılan 100 ve 1000 ppm konsantrasyonlarındaki çözücülerin HPLC-UV analizi ile belirlenen alanları (Devam)

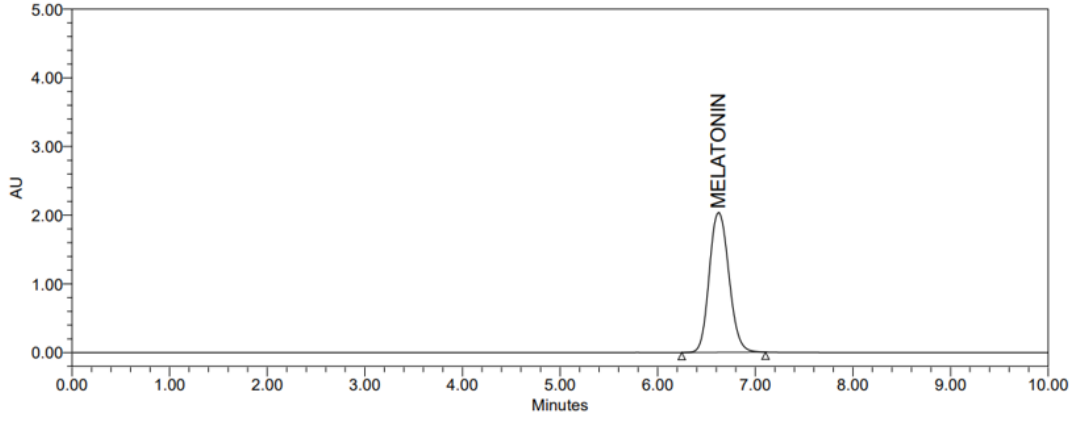
MeCN: Saf Su (500:500)	2987027	25219541
EtOH: Saf Su: 0,1M HCl (700:299:1)	3233900	28361045
MeOH: Saf Su: 0,1M HCl (700:299:1)	3533207	29494362

3.1.2. Melatonin Ekstraksiyonuna Işık ve Karanlık Etkisinin Sonuçları

Ekstraksiyon koşullarına ışık/karanlık etkisini belirlemek adına, saf melatonin standardı üzerinden karanlık ve ışık numuneleri hazırlanarak HPLC-UV cihazında analiz edildi. Analiz sonucuna göre, karanlık test numunesinin alanı 29126988 iken ışık test numunesinin alanı 32442002 olduğu görülmüştür. Bu sonucuna göre beyaz ışık, melatonin yapısında herhangi bir bozulmaya sebep olmamaktadır. Bizde bu sonuç doğrultusunda, ekstraksiyon koşullarını karanlık yerine normal oda koşullarında gerçekleştirdik.

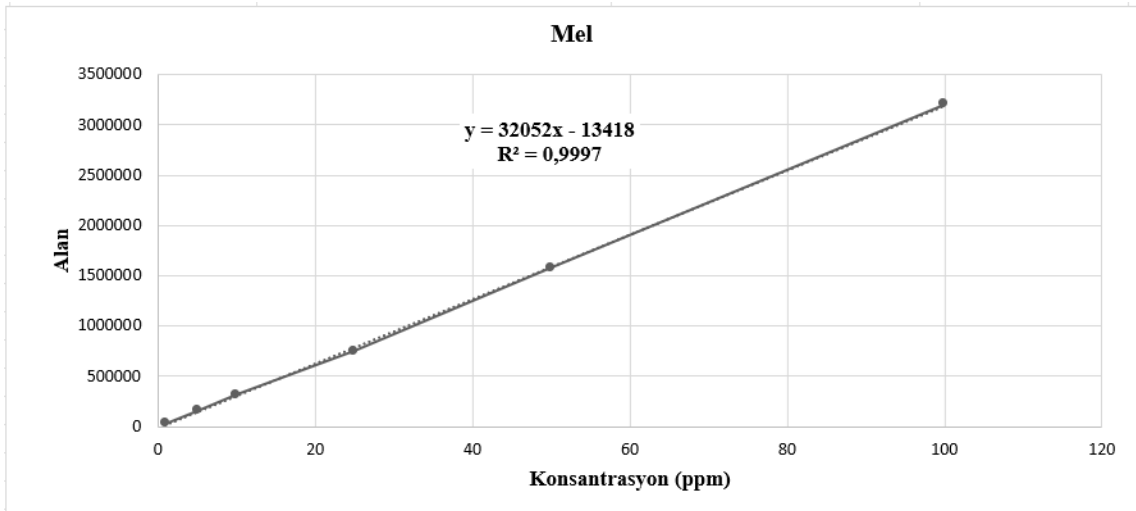
3.1.3. Melatonin Ekstraksiyon Sonuçları ve Değerlendirilmesi

Ihlamur, Papatya, Melisa, Şekerotu, Adaçayı ve Sarı Kantaron bitki örneklerinden, melatonin ekstre etmek için ekstraksiyon yöntemi kullanıldı. Ekstre edilen bitki örneklerinin HPLC-UV ile kalitatif ve kantitatif analizi gerçekleştirildi. Tüm analizler üç tekrarlı şekilde gerçekleşti. 1 ppm ila 100 ppm konsantrasyon aralığındaki melatonin standartları da üç tekrarlı şekilde cihaza verildi.



Şekil 3. 1. MeOH: Saf Su: 0,1M HCl (700:299:1) çözücüsü ile hazırlanan 1000 ppm konsantrasyonda melatonin standardı HPLC-UV kromotogramı (0.5 mL/dk, 20 µL ve 280 nm)

1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm, 50 ppm ve 100 ppm konsantrasyonlarındaki melatonin standartlarına karşılık gelen absorbans değerlerinden standart kalibrasyon grafiği çizildi. Bu kalibrasyon grafiği eğrisinden elde edilen $y = 32052x - 13418$ ($r^2 = 0,9997$) formül kullanılarak İhlamur, Papatya, Melisa, Şekerotu, Adaçayı ve Sarı Kantaron bitki örneklerinin melatonin içeriği µg/g olarak hesaplandı.



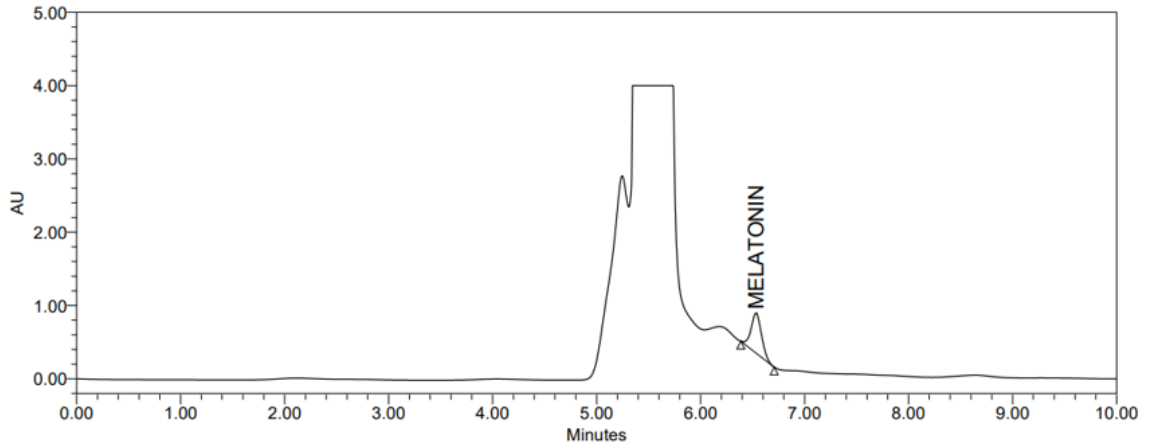
Şekil 3. 2. Melatonin standart eğri grafiği

Bitki örneklerinin sulu çözeltileri sırasıyla hekzan, etil asetat ve bütanol ile ayırma hunisi içerisinde karıştırılıp, evaporatörde uçurulduktan sonra en son kendi çözücüsü olan MeOH: Saf Su: 0,1M HCl (700:299:1)'de çözdürüldü. Bitki numunelerindeki MEL içeriğinin kullanılan çözücülere ne kadar geçebildiği belirlemek amacıyla tüm fazlar ayrı ayrı HPLC-UV'de analiz edildi. En iyi ekstraksiyon verimi MeOH: Saf Su: 0,1M HCl (700:299:1) ve bütanol de görüldü. MEL, etil asetatta daha az çözünürken, hekzana neredeyse hiç geçmediği görülmektedir. Bunun sebebi, melatoninin yapısındaki asetamid fonksiyonel grubu ile bütanol ve metanol de bulunan OH gruplarının hidrojen bağları oluşturma etkileşimi melatoninin çözünürlüğünü artırabilir. Aynı zamanda melatoninin heterosiklik halkasının polarize edilebildiği ve böylece N-H grubunun hidrojen bağı oluşturabildiği bir indolamin olmasından ötürü polar grup içeren çözücülerde daha rahat çözünmektedir. Tersine, polar olmayan hekzan gibi çözücülerde ise daha düşük çözünürlük göstermektedir.

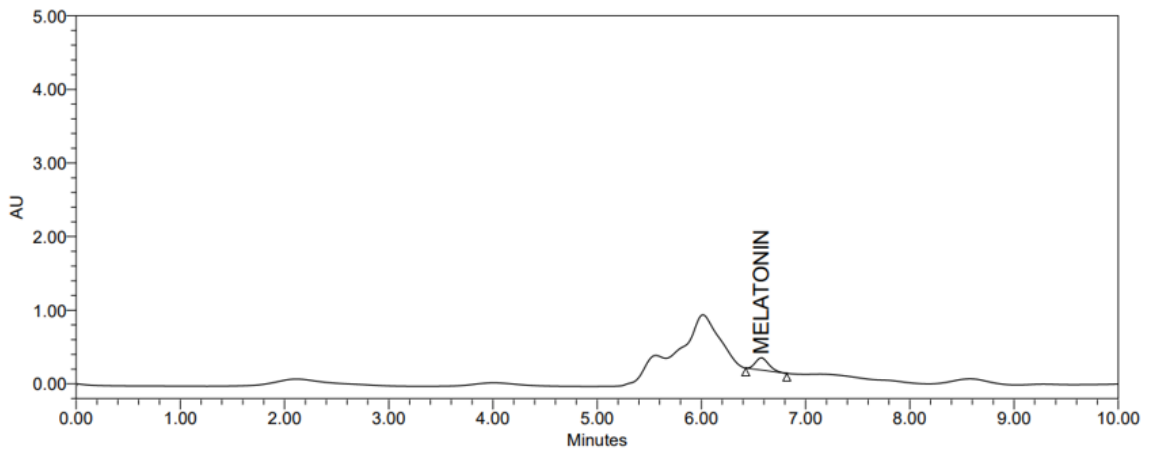
Çizelge 3. 2. Bitki örneklerinin MEL içeriğinin HPLC-UV analizi ile belirlenen miktarları

Bitki Örnekleri	Numunedeki Miktar (µg/g)			
	MeOH:su: 0,1M HCl	bütanol	etil asetat	hekzan
Adaçayı (Sakarya)	1192,66	463,86	-	-
Adaçayı (Konya)	1772,79	1104,80	-	-
Sarı Kantaron (Düzce)	481,15	635,21	-	-
Sarı Kantaron (Konya)	230,30	249,64	-	-
Ihlamur (Sakarya)	925,10	1680,34	101,53	21,37
Papatya	2207,45	2665,83	601,81	-
Melisa	482,27	661,88	102,26	-
Şekerotu	4513,35	-	277,03	22,81

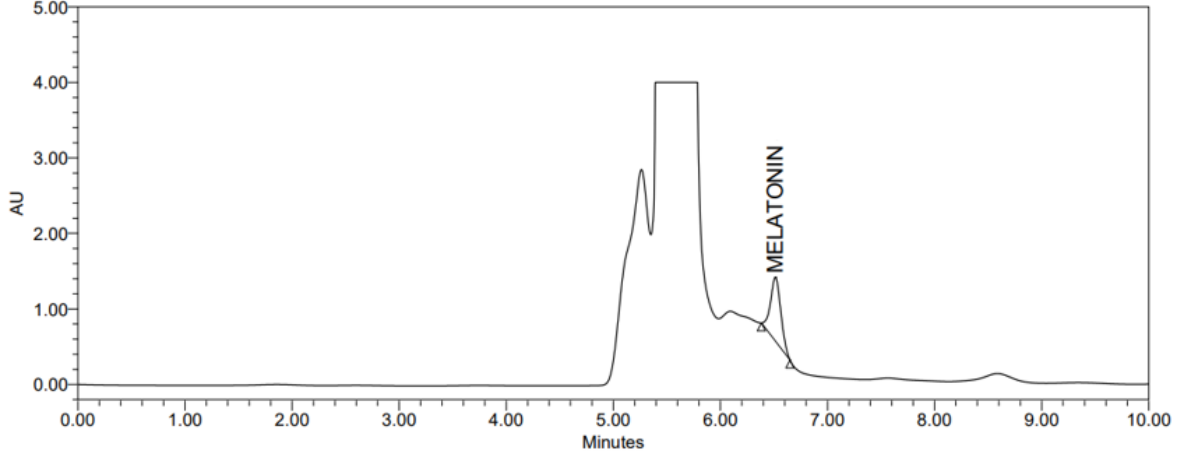
1 g bitkiden ekstraksiyonu yapılan Ihlamur, Papatya, Melisa, Adaçayı, Sarı Kantaron ve Şekerotu bitki örneklerinin HPLC-UV analiz sonuçlarına göre; MEL miktarı en yüksek verimle MeOH: Saf Su: 0,1M HCl (700:299:1) ile çözölen Şekerotu bitkisinde 4513,35 µg olarak elde edilirken, aynı numunenin bütanol çözöcüsünde melatonine ait pik elde edilemedi. Bitki örneklerinin HPLC-UV analizi ile elde edilen kromatogramları ise sırasıyla Şekil 3. 3, Şekil 3. 4, Şekil 3. 5, Şekil 3. 6, Şekil 3. 7, Şekil 3. 8, Şekil 3. 9, Şekil 3. 10, Şekil 3. 11, Şekil 3. 12, Şekil 3. 13, Şekil 3. 14, Şekil 3. 15, Şekil 3. 16 ve Şekil 3. 17’de gösterilmektedir.



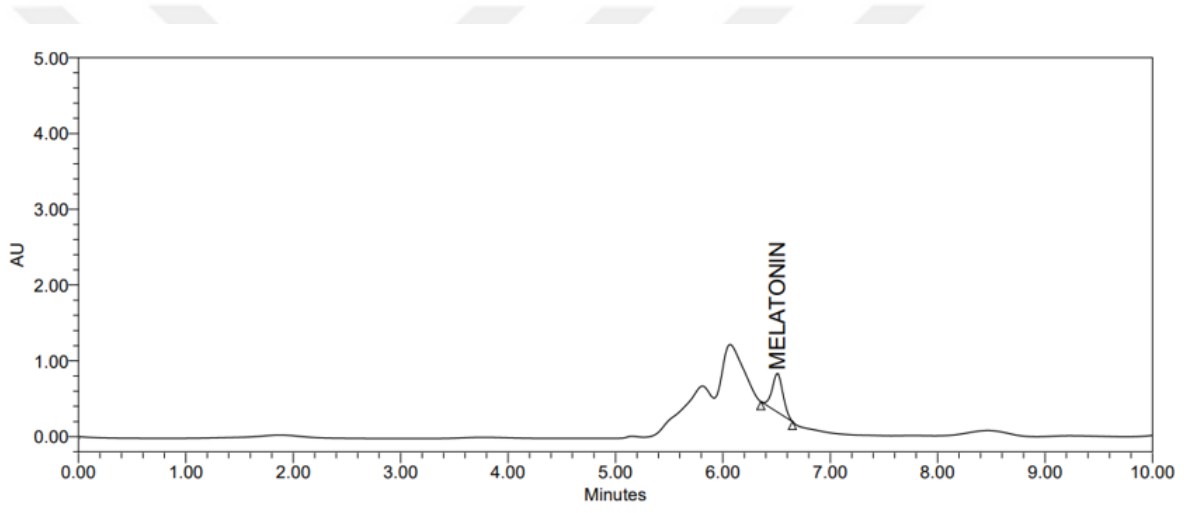
Şekil 3. 3. Sakarya adaçayı (MeOH: Saf Su: 0,1M HCl (700:299:1)) bitki örneğine ait HPLC-UV analizi kromotogramı



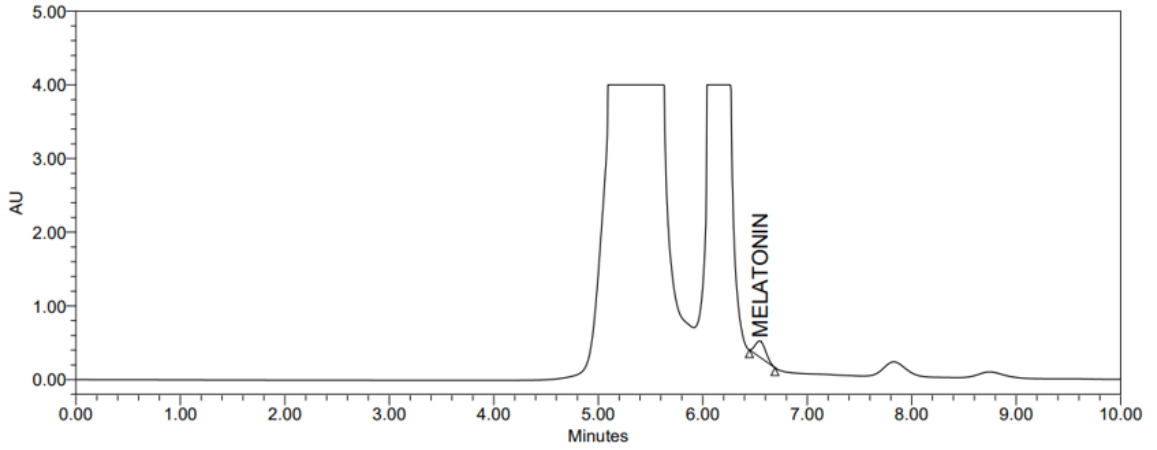
Şekil 3. 4. Sakarya adaçayı (bütanol) bitki örneğine ait HPLC-UV analizi kromotogramı



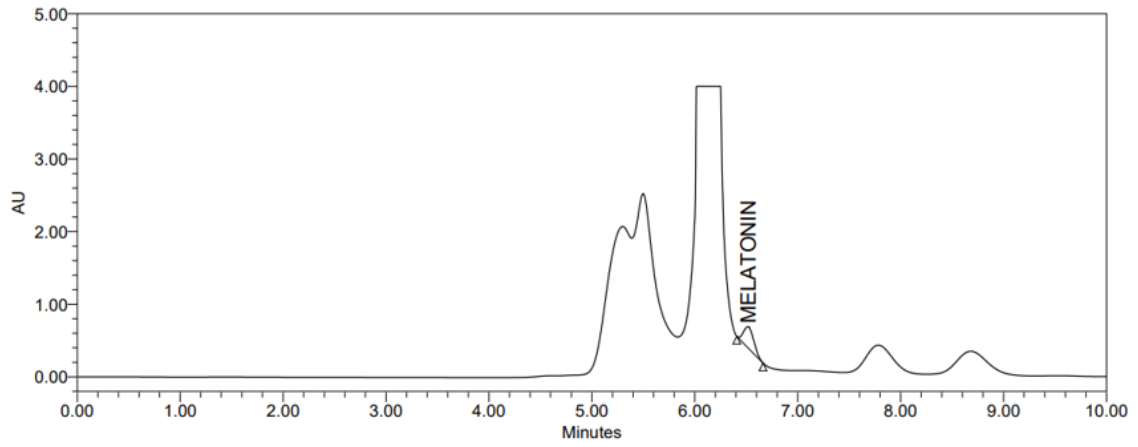
Şekil 3. 5. Konya adaçayı (MeOH: Saf Su: 0,1M HCl (700:299:1)) bitki örneğine ait HPLC-UV analizi kromotogramı



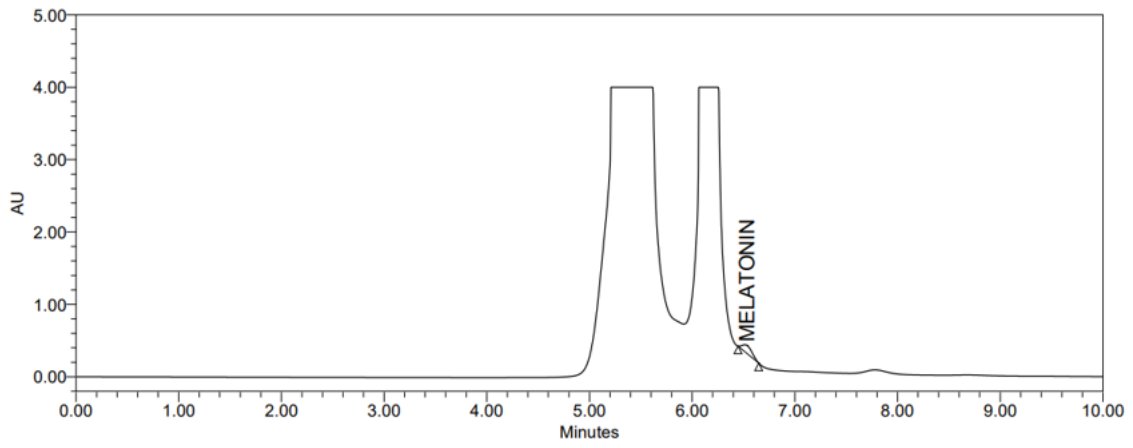
Şekil 3. 6. Konya adaçayı (bütanol) bitki örneğine ait HPLC-UV analizi kromotogramı



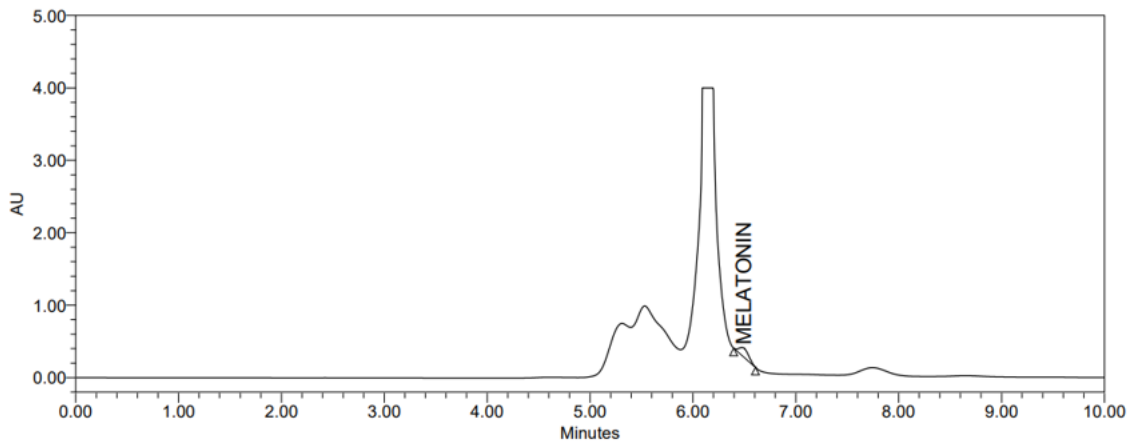
Şekil 3. 7. Düzce Sarı kantaron (MeOH: Saf Su: 0,1M HCl (700:299:1)) bitki örneğine ait HPLC-UV analizi kromotogramı



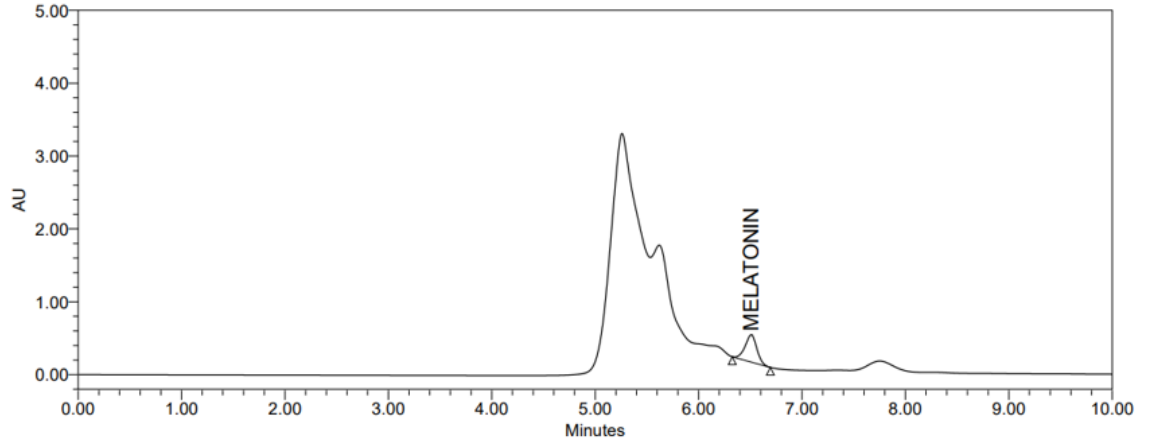
Şekil 3. 8. Düzce Sarı kantaron (bütanol) bitki örneğine ait HPLC-UV analizi kromotogramı



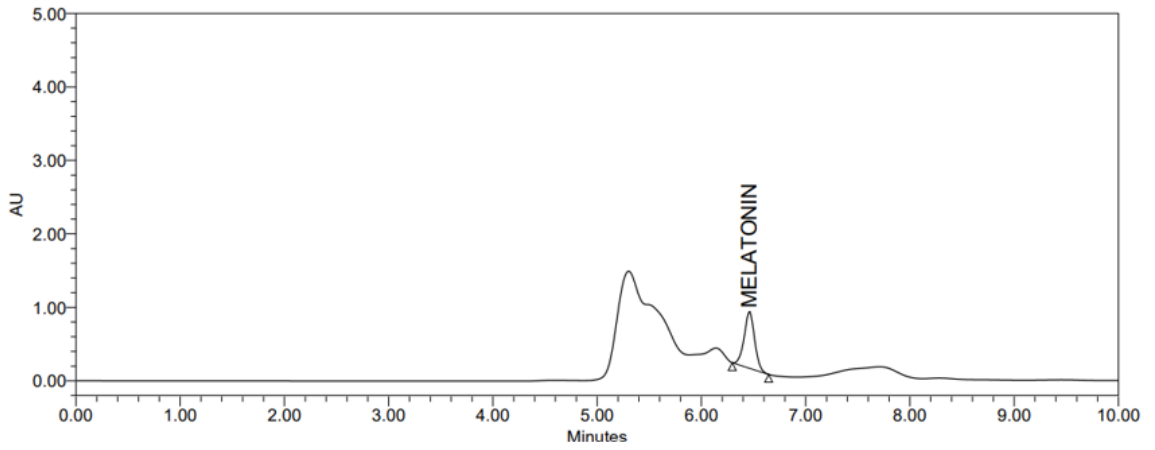
Şekil 3. 9. Konya Sarı kantaron (MeOH: Saf Su: 0,1M HCl (700:299:1)) bitki örneğine ait HPLC-UV analizi kromotogramı



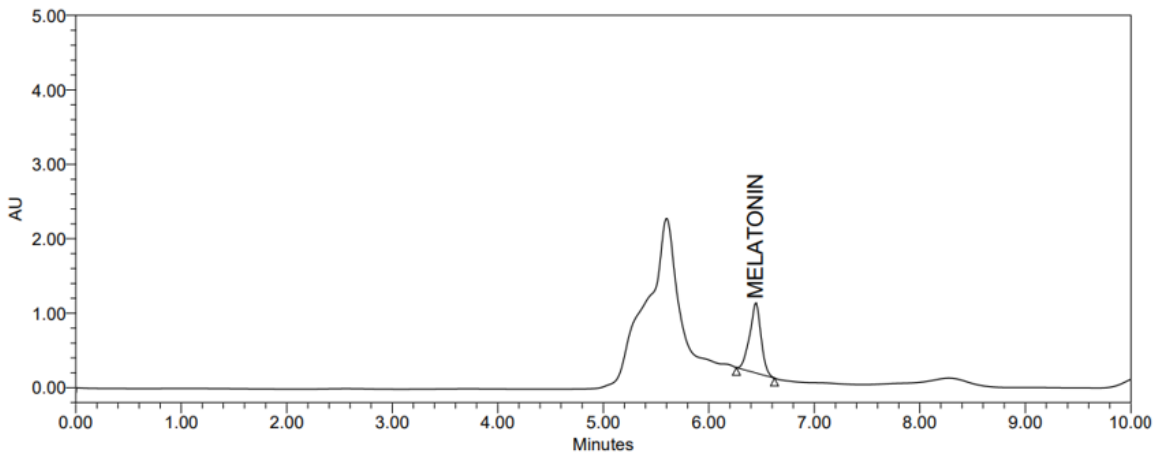
Şekil 3. 10. Konya Sarı kantaron (bütanol) bitki örneğine ait HPLC-UV analizi kromotogramı



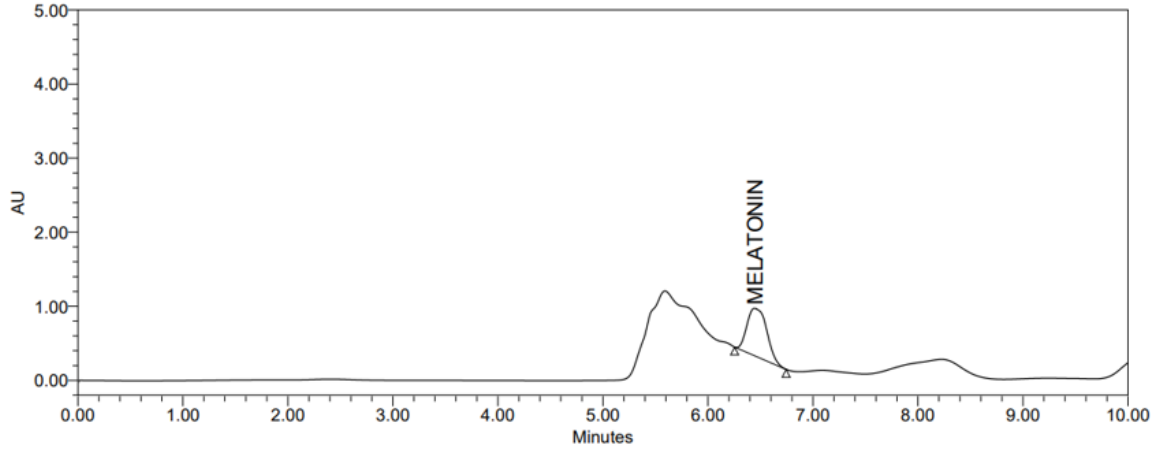
Şekil 3. 11. Sakarya Ihlamur (MeOH: Saf Su: 0,1M HCl (700:299:1) bitki örneğine ait HPLC-UV analizi kromotogramı



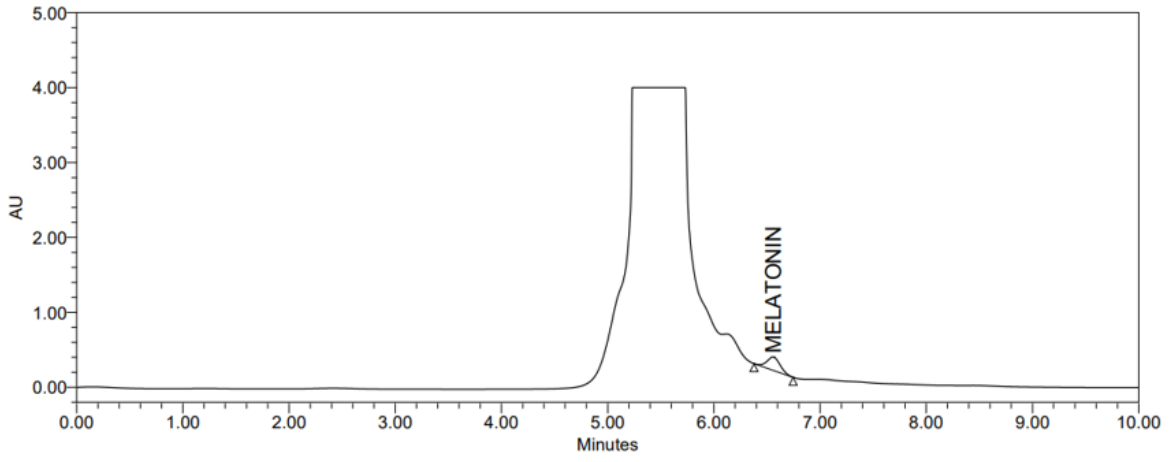
Şekil 3. 12. Sakarya Ihlamur (bütanol) bitki örneğine ait HPLC-UV analizi kromotogramı



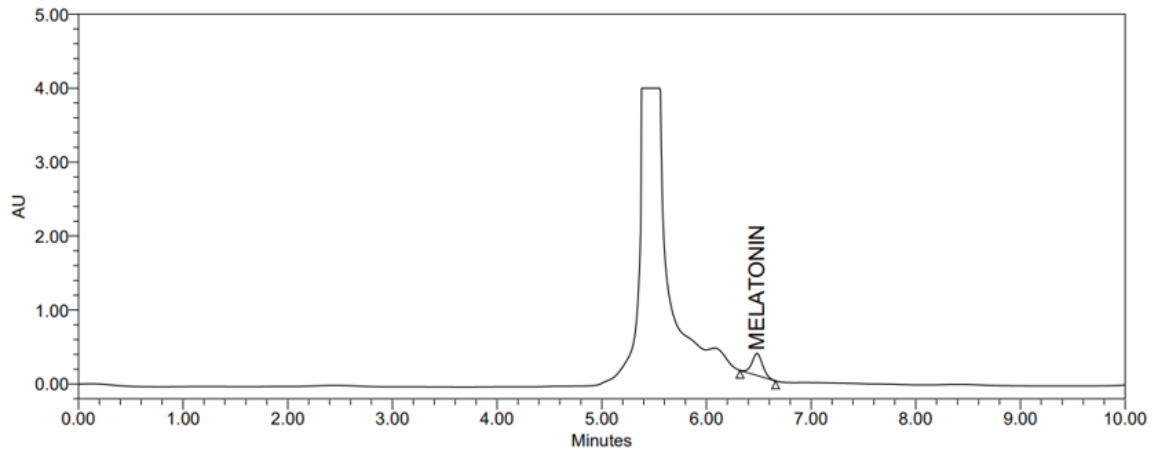
Şekil 3. 13. Papatya (MeOH: Saf Su: 0,1M HCl (700:299:1) bitki örneğine ait HPLC-UV analizi kromotogramı



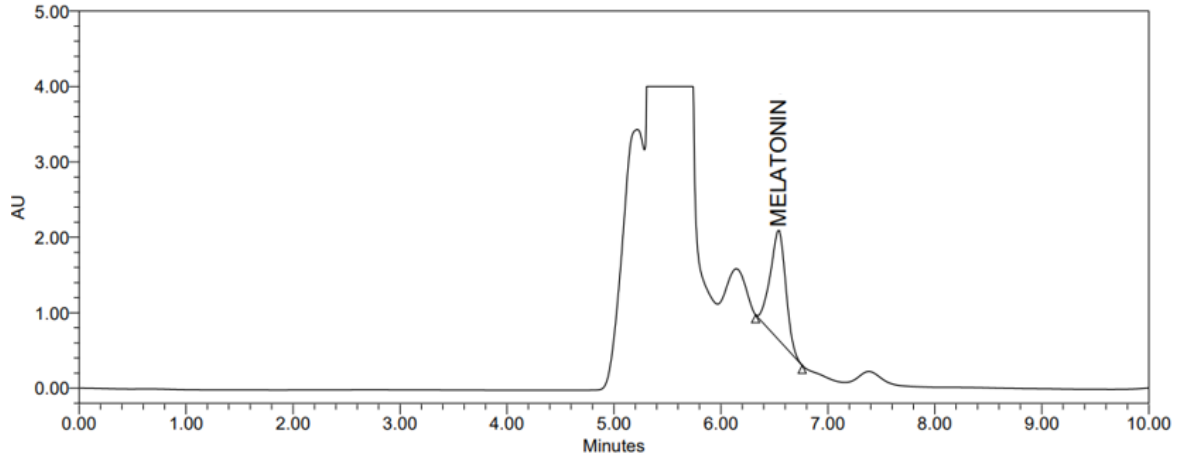
Şekil 3. 14. Papatya (bütanol) bitki örneğine ait HPLC-UV analizi kromotogramı



Şekil 3. 15. Melisa (MeOH: Saf Su: 0,1M HCl (700:299:1)) bitki örneğine ait HPLC-UV analizi kromotogramı



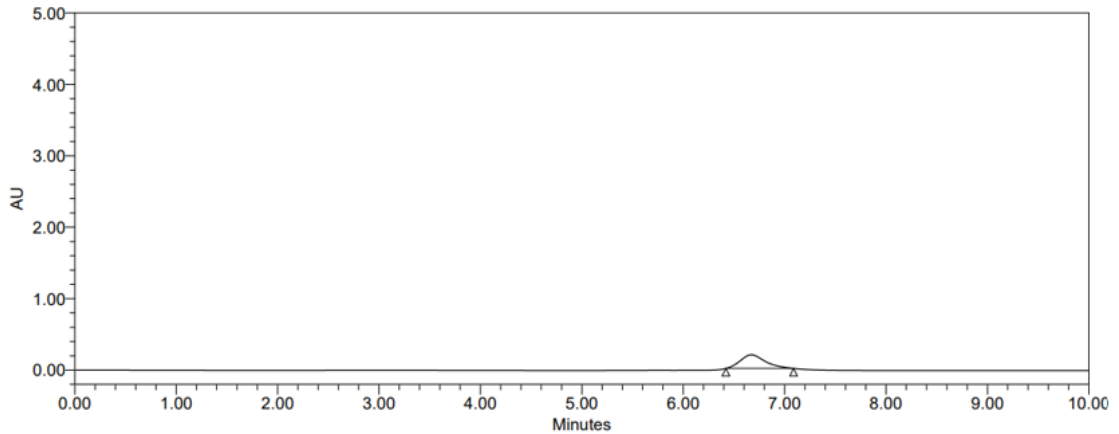
Şekil 3. 16. Melisa (bütanol) bitki örneğine ait HPLC-UV analizi kromotogramı



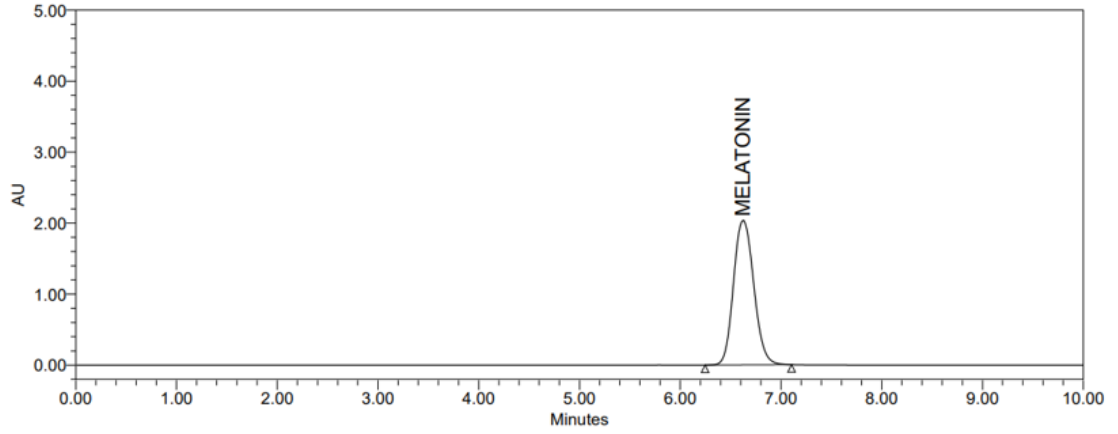
Şekil 3. 17. Şekerotu (MeOH: Saf Su: 0,1M HCl (700:299:1)) bitki örneğine ait HPLC-UV analizi kromotogramı

3.2. MELATONİN SAFLAŞTIRILMASI VE SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Ekstraksiyonda en yüksek verim sağlayan yani MEL içeriği en yüksek olan şekerotu bitki numunesi, HPLC-UV analitik metodu ile melatonin pikinin kolona tutunduğu zaman aralıklarına göre cihazdan toplanarak saflaştırıldı. Saflaştırılan melatoninin, standart kalibrasyon grafik eğrisinden elde edilen $y = 32052x - 13418$ ($r^2 = 0,9997$) formül kullanılarak MEL içeriği $\mu\text{g/g}$ olarak hesaplandı. Şekerotu bitkisinden saflaştırılan melatoninin miktarı $1452,17 \mu\text{g/g}$ olarak bulundu. Uyku desteği için yaygın kullanılan MEL dozu 1-3 mg arası olup, şekerotu bitkisinden saflaştırılan $1,45 \text{ mg/g}$ MEL miktarı farmasötik form için yeterli olacaktır.



Şekil 3. 18. Şekerotu bitki örneğinden saflaştırılan melatonine ait HPLC-UV analiz kromotogramı



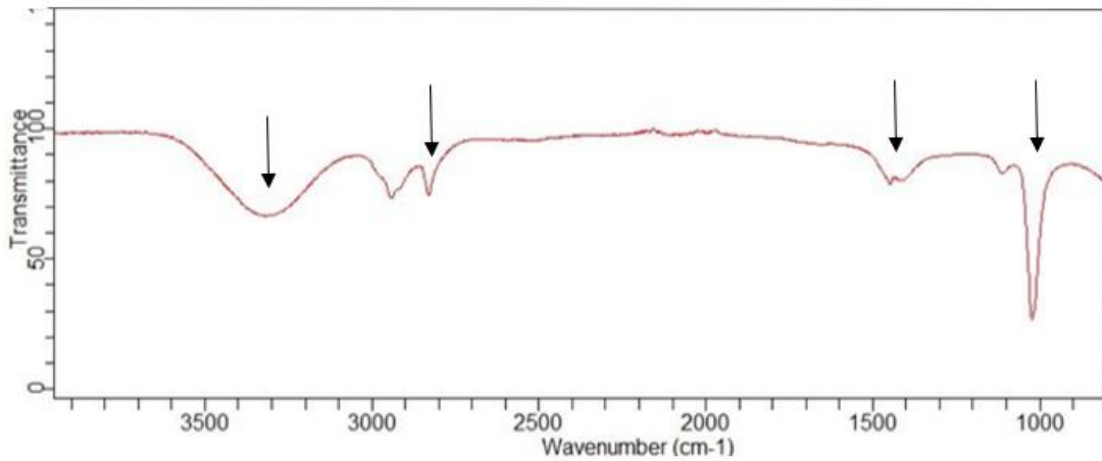
Şekil 3. 19. 1000 ppm konsantrasyonda melatonin standardı HPLC-UV analiz kromotogramı

3.3. SAFLAŞTIRILAN MELATONİNİN KARAKTERİZASYON ANALİZ SONUÇLARI VE DEĞERLENDİRİLMESİ

HPLC-UV cihazından saflaştırılan MEL'in karakterizasyon analizi FTIR, RAMAN ve LC-MS cihazları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.3.1. Saflaştırılan Melatoninin FTIR Analizi ve Sonuçlarının Değerlendirilmesi

MEL yapısında bulunan fonksiyonel grup ve atomlar arasındaki bağları belirlemek için kullanılan FTIR spektroskopisi ile 1000–3500 cm^{-1} spektral aralığında bakıldı. Bitki ekstraktının IR (infrared) ışığı absorplaması esasına dayalı olarak elde edilen fonksiyonel gruplara ait gerilme titreşimleri Şekil 3. 20'de FTIR spektrumundan görülebilir.

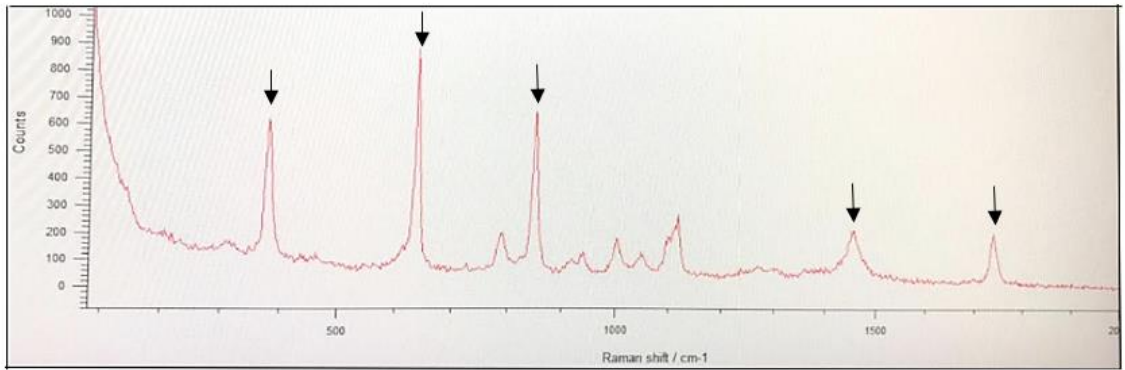


Şekil 3. 20. Saflaştırılan liyofilize melatoninin FTIR spektrumu

Şekil 3. 20' de görüldüğü gibi aromatik amin grubundaki NH bağı (N–H) $3380\text{--}3510\text{ cm}^{-1}$ 'de orta şiddetli ışık spektrumu olarak gözlemlendi [83],[84]. C-H arasındaki bağlardan kaynaklanan $\sim 2800\text{--}3150\text{ cm}^{-1}$ de zayıf şiddetli bir ışık spektrumu olarak gözlemlendi [85]. Amid II olarak tanımlanan N-H deformasyon titreşimlerinden kaynaklanan $1490\text{--}1580\text{ cm}^{-1}$ 'de zayıf şiddetli bir ışık spektrumu olarak gözlemlendi [86]. $900\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ spektrum aralığında ise C=O, C-C ve C-N gerilmesi, C-H ve N-H bükülmesi ile ilişkilendirilir [85].

3.3.2. Saflaştırılan Melatoninin Raman Analizi ve Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Raman spektroskopisi, bir titreşim spektroskopi türüdür [87] ve maddenin bir ışık kaynağı ile aydınlatılması sonucu maddenin titreşim modlarını belirlemek için kullanılır [88]. Raman spektrumu, her moleküle özgü olan bağ gerilmesi ve bükülmesi gibi karakteristik titreşim frekansları verir [89]. Raman spektroskopisinin temelini Raman saçılması oluşturur [87] çünkü moleküllerin enerji seviyeleri arasında absorpsiyon, emisyon olaylarının yanı sıra saçılma da gerçekleşir. Numuneye gönderilen ışığın dalga boyuna göre, numune moleküllerinden saçılan ışığın dalga boyunda oluşan ve Raman kayması olarak bilinen farklar ölçülebilmektedir [88].



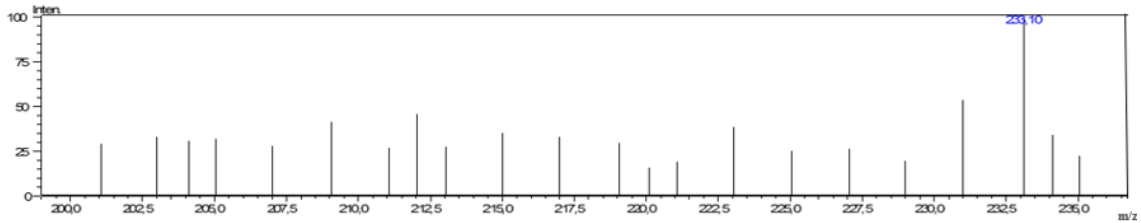
Şekil 3. 21. Saflaştırılan liyofilize melatoninin Raman spektrumu

$150\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ 'deki raman piki n-alkanlarda zincir genişlemesi, $630\text{--}1250\text{ cm}^{-1}$ 'deki raman piki C-C alifatik hidrokarbonlardan ve $830\text{--}930\text{ cm}^{-1}$ 'deki raman piki alifatik eterlerdeki C-O-C gerilmesinden kaynaklanmaktadır [90]. 1449 cm^{-1} 'deki raman piki CH_2 bükülme titreşimi olarak protein yapılarında görülebilmektedir [91]. $1480\text{--}1580\text{ cm}^{-1}$ 'deki raman piki amid II yani C–N gerilme ve N–H bükülme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. $1600\text{--}1690\text{ cm}^{-1}$ 'deki raman piki ise amid I olarak tanımlanan C =

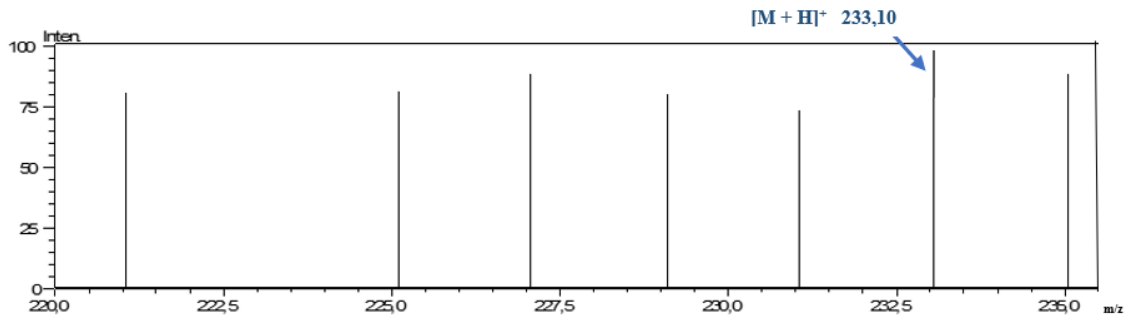
O gerilme titreşiminden kaynaklanmaktadır [92]. Organik moleküllerin raman aktif normal titreşim modları $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ aralığında meydana gelir [93]. Bu çalışmada ise $100\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$ spektral aralığında tarama yapıldığından amin gibi bazı fonksiyonel gruplara ait titreşim modları saptanamamıştır.

3.3.3. Saflaştırılan Melatoninin LC-MS Analizi ve Sonuçlarının Değerlendirilmesi

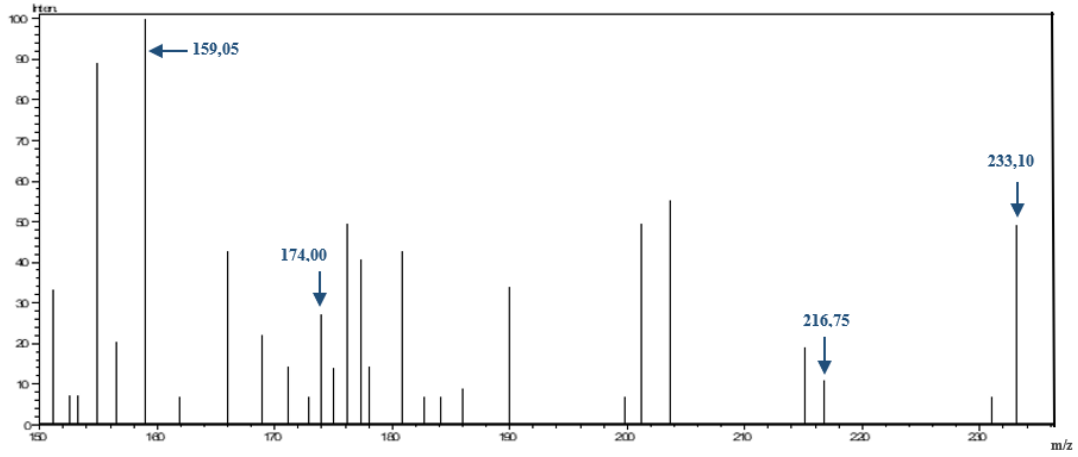
Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (LC-MS), Sıvı Kromatografisi (LC) ve Kütle Spektrometrisi'nin (MS) birleşimi olup HPLC'nin ayırma gücü ve Kütle Spektrometresinin (MS) tespit gücünü kullanan analitik bir tekniktir [94]. LC-MS yöntemi, yüksek hassasiyet ve mükemmel tespit özgülüğü sunar [95]. Kütle Spektrometrisi sayesinde bilinmeyen bileşiklerin, bilinen bileşiklerin tanımlanması, yapının açıklığa kavuşturulması ve moleküler ağırlıklarının belirlenmesinde kullanılır [94]. Biz de bu kapsamda, HPLC-UV'den saflaştırılan melatoninin tespiti ve karakterizasyonu için LC-MS'de analiz edildi.



Şekil 3. 22. Melatonin standardı LC-MS analiz kromotogramı



Şekil 3. 23. Saflaştırılan melatoninin LC-MS analiz kromotogramı



Şekil 3. 24. Saflaştırılan melatoninin yavru iyonlarının LC-MS analiz kromotogramı

HPLC-UV cihazından saflaştırılan sıvı melatonin, kütle ve yavru iyon taraması için LC-MS cihazında, pozitif iyon elektrosprey modunda (ESI+) ve MS dedektörü kullanılarak infüzyon yöntemiyle analiz edildi. Melatonin standardı, HPLC-UV'den saflaştırılan melatonin numunesi ve yavru iyonlarına ait kromotogramlar verileri Şekil 3. 22, Şekil 3. 23 ve Şekil 3. 24'de gösterilmektedir. Melatoninin pozitif kütle spektrumu sonucunda, psödomoleküler iyon $[M+H]^+$ karşılık gelen m/z 233.1 'de ana pik olarak tanımlandı. Melatoninin standardında ve HPLC-UV'den saflaştırılan melatonin numunesi karşılaştırıldığında ikisinin de öncül iyonlarının m/z 233.1 olduğu görülmektedir. Öncül iyon olarak kullanılan m/z 233.1, ESI-MS/MS spektrum sonucunda; m/z 159.05, m/z 174.00, m/z 216.75 ve m/z 233.10 yavru iyonlarını üretmiştir. LC-MS analiz kromotogramlarında da görüldüğü üzere HPLC-UV'den saflaştırılan numunedeki maddenin, hem ana kütle hem de yavru iyonlarına bakıldığında melatonine ait olduğu doğrulanmış oldu.

3.4. MELATONİNİN FARMASÖTİK FORMA DÖNÜŞTÜRÜLMESİ VE SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Temel bileşeni agar agar olup diğer bileşenleri arasında tatlandırıcı olarak eklenen sorbitol ve sükroz, canlı görünüm için kırmızı bir renklendirici ve tadı zenginleştirmek için eklenen kiraz aroması kullanılarak geliştirilen yumuşak tablet formu Şekil 3. 25' de görüldüğü üzere çeşitli meyve kalıplarına dökülerek, tüketimi daha keyifli bir hale dönüştürülmüş oldu.



Şekil 3. 25. Bitkisel melatonin içeren yumuşak tablet formülasyonu

Yumuşak tablet formu ile bitkisel ekstraktların şifalı gücü birleştirilerek, lezzetli alternatif bir form amaçlanır [65]. Yumuşak tablet formülasyonunda bitki ekstraktlarının kullanımı çok sayıda çalışmanın konusu olmuştur. Örneğin, Charoen vd. (2015), *Psidium guajava* Linn. yaprak ekstraktının yumuşak tablet de antioksidan takviyesi olarak kullanılabileceğini bildirmiştir [67],[96]. Abinaya vd. (2023) tarafından yayınlanan bir başka çalışmada yumuşak tablete *Allium cepa* (kırmızı soğan) ekstraktının ilavesi incelenmiştir ve kırmızı soğan ekstraktının antioksidan aktiviteyi artırabileceği ve duyuşal özellikleri iyileştirebileceği görülmüştür [67]. Teixeira-Lemos vd. (2021) tarafından yapılan çalışma da ise, portakal suyu, meyve püresi ve balla formüle edilen yumuşak tabletin, hem organoleptik özellikleri iyileştiren hemde antioksidan özelliklere sahip daha sağlıklı formülasyonlar olduğunu göstermiştir [67],[69].

Yapılan diğer çalışmalar incelendikten sonra bu kapsamda, HPLC-UV ile kantitatif analizi sonucunda en yüksek MEL içeriğine sahip olduğu tespit edilen şekerotu (*Stevia rebaudiana* Bertoni) bitkisinden, MEL saflaştırılıp LC-MS' de karakterizasyonu yapıldıktan sonra, geliştirilen yumuşak tablet formuyla bitkisel MEL birleştirildi. Bitkisel MEL içeren yumuşak tablet formunun, tüketimi kolay ve keyifli olan doğal bir uyku desteği sağlaması beklenmektedir.

3.4.1. Yumuşak Tablet Formu Değerlendirme Parametrelerinin Sonuçları

Organoleptik analizler; renk, şekil, tat, koku ve doku incelemelerini içermektedir. Organoleptik analiz sonuçlarına göre, nihai ürün belirlenmiş kriterleri karşıladığı görülmektedir.

Çizelge 3. 3. Yumuşak tablet formu organoleptik analiz değerlendirmesi

Organoleptik analizler	Sonuç
Renk	Canlı Kırmızı
Şekil	Çeşitli Meyve Görselleri
Koku	Kiraz Aroması
Tat	Normal
Doku	Yumuşak

Yumuşak tablet formülasyonu hazırlanıp kalıplara dökülmeden önce pH sonucu kaydedilip, katılaşma gerçekleştikten sonra ağırlık değişimi, dağılma analizi, nem içeriği ve sertlik analizleri yapılarak sonuçları Çizelge 3. 4’ de belirtilmiştir.

Çizelge 3. 4. Yumuşak tablet formuna ait çeşitli parametrelerin sonuçları

Parametreler	Sonuçları
Ağırlık Değişimi	851,07 mg
Dağılma Analizi	18 dk
Nem İçeriği	%16,45
Sertlik	407,8 g
pH	3,66

Tek bir yumuşak tablet ağırlığı, kabul edilebilir olan ortalama ağırlığın $\pm\%10$ 'u dahilinde olmalıdır. 812,2- 888,5 mg aralığında değişen tabletlerin ortalama ağırlığı 851,07 mg olarak bulundu.

Dağılma analiz sonucunda 6 yumuşak tabletin ortalama dağılma süresi 18 dk olarak gözlenmiştir. Yumuşak tablet ortamda ne kadar hızlı çözülürse, melatonin etkeni o kadar hızlı salınacaktır. Ganea vd. (2025)’nin jelatin bazlı yumuşak tablet çalışma sonuçlarına göre; 30 rpm, 37 °C ve pH 6,8’de 6 dk, pH 5’de 12 dk, pH 7,3’de 11 dk ve pH 8’de 17 dk sonra çözünmenin gerçekleştiğini gözlemlemiştirler [97]. İçerik, boyut ve ortam sıcaklığı gibi birçok faktör, yumuşak tabletin ne kadar çabuk eridiğini etkileyebilir. Genellikle, yumuşak tablet jel benzeri kıvamı nedeniyle diğer formülasyon türlerine kıyasla nispeten yavaş parçalanırlar [98].

Bu çalışma kapsamında yapılan 2 adet yumuşak tabletin ortalama nem içeriğinin sonucu %16,45 olarak bulunmuştur. Nem kaybı, yumuşak tablet yaparken karşılaşılan ana sorunlardan biridir çünkü yumuşak tablet bileşimi yüksek oranda su içerirken, önerilen nem içeriğinin %24 civarında olması gerektiği bildirilmiştir [99]. Pizzoni vd. (2015)'nın yaptıkları çalışmada nem içeriği, jelleştirici madde ile ilişkilendirilmiştir [68]. İleride yapılması planlanan stabilite çalışmalarında zaman içinde nem kaybının nasıl değiştiği incelenecektir.

Bu çalışma kapsamında yapılan 10 yumuşak tabletin ortalama sertlik sonucu 4 N (407,87 g) olarak bulunmuştur. Cižauskaite vd. (2019)'nın yaptıkları çalışma sonucunda yumuşak tablet ortalama sertliği olarak 439,29 g olarak bulmuşlardır ve yumuşak tablet tabanını oluşturmak için kullanılan jelleştiricinin, ürünün sertliği ve gücü üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir [99]. Kullanılan agar agar miktarı, yumuşak tablet elastikiyetinin artmasına neden olur. Kısaca, agar konsantrasyonu ne kadar düşükse yumuşak tablet o kadar yumuşak form elde edilirken; agar konsantrasyonu arttıkça sert ve daha az elastik formlar elde edilir [66].

Niam vd. (2022)'nin yaptıkları çalışmada, jel formülasyonu için optimum pH koşullarının pH 3,2'ye yakın veya asidik bir pH olması gerektiğini bildirmiştir [66]. Yine Zamarron vd. (2019)'da yaptığı çalışmada, yumuşak tablet için ideal pH aralığı 3,0 ila 4,5 olduğunu ve daha düşük bir pH'nın ise ürün stabilitesi veya jel oluşmama ihtimallerinden dolayı istenmeyeceğini bildirmiştir [100]. Bu çalışmalara göre elde ettiğimiz yumuşak tabletin pH'sının ideal aralıkta olduğu anlaşılmaktadır.

4. SONUÇ

Son yıllarda çok fazla insanın uyku bozukluklarından muzdarip olduğu ve bu sebepten ötürü melatonin ürünlerine artan talep doğrultusunda, melatonin sentezi ile ilgili endüstriyel yaklaşımların iyileştirilmesi gerekmektedir [9]. Melatonin günümüzde esas olarak kimyasal sentez yoluyla üretilir ve bu da ağır reaksiyon adımları ve çevre kirliliği gibi önemli dezavantajlara sahiptir [10]. Bu yüzden, bitkiden melatonin ekstraksiyonu ve saflaştırma metodunu optimize etmek hem çevre için hem de insanların artan uyku problemlerine doğal bir çözüm olmasından ötürü umut vadeden alternatif bir yöntemdir.

Bu çalışmada, sirkadiyen ritmi (uyku-uyanıklık döngüsü) düzenlemesinden dolayı [5] uyku bozukluklarının hafifletilmesinde benzersiz bir molekül olan MEL'in [23] en verimli seviyelerde bitkisel kaynaklardan elde edilip, birçok uyku bozukluklarının tedavisi için farmasötik formda ürün geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Çeşitli literatür araştırmaları doğrultusunda, MEL'in verimli bir şekilde elde edilmesi için seçilen; Gümüşi İhlamur (*Tilia tomentosa* Moench), Papatya (*Matricaria recutita* L.), Melisa (*Melissa officinalis* L.), Şekerotu (*Stevia rebaudiana* Bertoni), Adaçayı (*Salvia officinalis* L.) ve Sarı Kantaron (*Hypericum perforatum* L.) kurutulmuş bitki örneklerinden ekstraksiyon yöntemleri optimize edilmeye çalışılmıştır. MEL'in kalitatif ve kantitatif olarak tespit edilmesi için ultraviyole dedektörlü HPLC kullanılarak analitik metot geliştirilmiştir. Bu analitik metot ile seçilen bitkiler içerisinde, 1g şekerotu bitkisinin sıvı ekstraksiyonu sonucunda en yüksek melatonin (4513,35 µg) içeriğine sahip olduğu tespit edilmiştir. MEL, şekerotu bitki numunesinden, HPLC-UV analitik metodundaki melatonin pikinin alıkonma zamanı esas alınarak cihazdan saflaştırıldı. Saflaştırılan melatoninin kimyasal yapısı Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR), Raman Spektroskopisi ve Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi (LC-MS) cihazları ile karakterize edilerek melatonin olduğu doğrulanmıştır. Saflaştırılan melatoninin farmasötik formda değerlendirilmesi için tüketimi daha kolay ve keyifli bir form amaçlanıp yumuşak tablet formülasyonu tasarlanmıştır. Bu formun temel bileşeni olarak önemli bir jel oluşturma yeteneğine sahip olan polisakkarit bazlı kolloidal agar agar kullanılmıştır. Yumuşak tablet formunda, agar agara ilave olarak tatlandırıcı olarak eklenen sorbitol ve sükroz, canlı görünüm için kırmızı bir renklendirici, tadı zenginleştirmek için eklenen kiraz aroması ve şekerotu bitkisinden saflaştırılan bitkisel MEL (1452,17 µg) ile total form oluşturuldu. Yaygın kullanılan MEL günlük alım dozu

1-3 mg arası olduğundan, yumuşak tablet formuna eklenen 1,45 mg MEL uyku desteği için yeterli olmaktadır. Yumuşak tabletin karakterizasyon analiz sonuçlarına göre, pH'sı 3,66 ve ortalama ağırlığı 851,07 mg olarak bulundu. 6 adet yumuşak tablet için ortalama dağılma süresi 18 dk olduğu görüldü. 10 adet yumuşak tablet için ortalama sertlik sonucu 407.8 g olarak bulunurken, nem içeriğinin ise %16,45 olarak bulunmuştur. Tüm bu karakterizasyon analiz sonuçları, farklı yumuşak tablet çalışmaları ile karşılaştırıldığında tutarlı olduğumuz anlaşılmaktadır.

Kısaca bu çalışma kapsamında; melatoninin bitkilerden ekstraksiyonu, saflaştırılması, karakterizasyon analizleri ve farmasötik bir forma dönüştürme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca Gümüşi Ihlamur (*Tilia tomentosa* Moench), Papatya (*Matricaria recutita* L.), Melisa (*Melissa officinalis* L.), Adaçayı (*Salvia officinalis* L.) ve Sarı Kantaron (*Hypericum perforatum* L.) bitkilerinin MEL içeriği ile ilgili literatürde çok çeşitli çalışmalar mevcut iken, Şekerotu (*Stevia rebaudiana* Bertoni) bitkisinin MEL içeriği ile ilgili literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Dolayısıyla bu çalışma, doğal tatlandırıcı olarak bilinen Şekerotu bitkisinin, MEL içeriği hakkında yapılan ilk çalışma olarak görülmektedir.

Bitki kaynaklı melatoninin, farmasötik ürüne dönüştürme aşamasında yumuşak tablet formuna karar verilmiştir. Genellikle bu farmasötik formlar, bitki içeriğindeki etken yetersizliğinden yada saflaştırma yapılamamasından dolayı tüm bitki ekstresi içerir. Bu çalışma kapsamında ise Şekerotu bitkisinden saflaştırılan MEL ile yumuşak tablet farmasötik formu birleştirilmiştir. Bu sayede bitki kaynaklı MEL ile geliştirilen yumuşak tablet formu, doğal bir uyku desteği sağlayacak olan alternatif takviye formuna dönüştürülmüştür.

Geliştirilen yumuşak tablet formülasyonu aslında ön bir çalışma olup, ilerleyen süreçte biyoyararlanım çalışmaları ve stabilizasyon analizlerinin de eklenmesi hedeflenmektedir. Bu analizler eklendiğinde, melatoninin etki kapasitesi ve raf ömrü belirlenerek, doğal bir uyku takviyesi olarak piyasaya sunulması planlanmaktadır. Hatta şekerotu bitkisinin doğal tatlandırıcı özelliği ile diyabet hastaları için farklı formülasyonlarında geliştirilmesi hedeflenmektedir.

5. KAYNAKÇA

- [1] C. E. Beyer, J. D. Steketee, and D. Saphier, "Antioxidant properties of melatonin-an emerging mystery," *Biochemical Pharmacology*, c.56, sayı. 10, ss. 1265-1272, 1998.
- [2] G. Yakupoğlu, Ş. Köklü, and A. Korkmaz, "Bitkilerde melatonin ve üstlendiği görevler," *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Doğa Bilimleri Dergisi*, 2018, doi: 10.18016/ksudobil.320180.
- [3] A. Koçak and A. Çolak, "Melatonin ve santral sinir sistemi," *Journal of Turgut Özal Medical Center*, c.3, sayı.3, ss. 237-244, 1996.
- [4] G. Şener, "Karanlığın hormonu: melatonin," *Marmara Eczacılık Dergisi*, c.14, ss. 112-120 2010.
- [5] R. J. Reiter, R. Sharma, D-X. Tan, L.G. Chuffa, D.G.Silva, A.T. Slominski, K.Steinbrink, K. Kleszczyn, "Dual sources of melatonin and evidence for different primary functions," *Front. Endocrinol*, c.15, 2024, doi: 10.3389/fendo.2024.1414463.
- [6] D. Tan et al., "Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger," *Curr Top Med Chem*, c. 2, sayı 2, ss. 181–197, 2005.
- [7] E. H. Sohn, S. N. Kim, and S. R. Lee, "Melatonin's Impact on Wound Healing," *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*, c.13, sayı.10, 2024.
- [8] L. Xie, H. Wu, X. Huang, and T. Yu, "Melatonin, a natural antioxidant therapy in spinal cord injury," c.11, 2023, *Frontiers Media SA*. doi: 10.3389/fcell.2023.1218553. *Synth Syst Biotechnol*.
- [9] X. Xie, D. Ding, D. Bai, Y. Zhu, W.Sun, Y. Sun, D. Zhang, "Melatonin biosynthesis pathways in nature and its production in engineered microorganisms," *Synth Syst Biotechnol.*, c. 7, sayı.1, ss. 544-553, 2022.
- [10] L. Wang, Y. Deng, J. Gao, B. Wang, H. Han, Z. Li, W. Zhang, Y. Wang, X. Fu, R. Peng, Q. Yao, "Biosynthesis of melatonin from l-tryptophan by an engineered microbial cell factory," *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, c. 17, sayı 1, 2024.

- [11] D. Zhao, Y. Yu, Y. Shen, Q. Liu, Z. Zhao, R. Sharma, R.J. Reiter, "Melatonin synthesis and function: Evolutionary history in animals and plants," *Front Endocrinol(Lausanne)*, c. 10, sayı. 249, 2019.
- [12] Z. Özdemir, O. Ak, H. Cem Yüceer, D. Akgör, D. Aysun, and Ç. Asparuk, "Drakula hormon: melatonin," *Başkent Üniversitesi*, c. 16, ss. 1–14, 2014.
- [13] T. Kocadağlı, C. Yilmaz, and V. Gökmen, "Determination of melatonin and its isomer in foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry," *Food Chem*, c. 153, ss. 151–156, 2014.
- [14] A. Korkmaz, G. Yakupoğlu, Ş. Köklü, Y. Cuci, and F. Kocaçınar, "Determining diurnal and seasonal changes in melatonin and tryptophan contents of eggplant (*Solanum melongena* L.)," *Turk J Botany*, c. 41, sayı 4, ss. 356–366, 2017.
- [15] M. Çınar, U. Serbest, and A. Ceyhan, "Melatonin biyosentezi ve süt keçisi yetiştiriciliğinde eksojen kullanımının üreme performansı ile süt kalitesi üzerine etkisi," *TÜBAV Bilim Dergisi*, c. 4, sayı 2, ss. 92–96, 2011.
- [16] F. J. V. Gomez, J. Raba, S. Cerutti, and M. F. Silva, "Monitoring melatonin and its isomer in *Vitis vinifera* cv. Malbec by UHPLC-MS/MS from grape to bottle," *J Pineal Res*, c. 52, sayı 3, ss. 349–355, 2012.
- [17] B. Claustat, J. Brun, and G. Chazot, "The basic physiology and pathophysiology of melatonin," *Sleep Med Rev*, c. 9, sayı 1, ss. 11–24, 2005.
- [18] F. Özcelik, M. Erdem, A. Bolu, and M. Glsn, "An overview on melatonin hormone," *Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar - Current Approaches in Psychiatry*, c. 5, sayı. 2, ss. 1, 2013.
- [19] M. B. Arnao and J. Hernández-Ruiz, "Is phytomelatonin a new plant hormone?," *Agronomy*, c.10, sayı.95, ss. 2-14, 2020.
- [20] N. Atasoy, "Melatonin ve Antioksidan Etkileri," *Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, c. 9, sayı 3, ss. 196–201, 2019.
- [21] R. J. Reiter, D. X. Tan, Z. Zhou, M. H. C. Cruz, L. Fuentes-Broto, and A. Galano, "Phytomelatonin: Assisting plants to survive and thrive," *Molecules*, c. 20, ss. 7396-7437, 2015.

- [22] V.-C. Andronachi, C. Simeanu, M. Matei, R.-M. Radu-Rusu, and D. Simeanu, "Melatonin: an overview on the synthesis processes and on its multiple bioactive roles played in animals and humans," *Agriculture*, 2025, doi: 10.3390/agriculture.
- [23] P. Pothinuch and S. Tongchitpakdee, "Melatonin contents in mulberry (*Morus* sss.) leaves: effects of sample preparation, cultivar, leaf age and tea processing," *Food Chem*, c. 128, sayı 2, ss. 415–419, 2011.
- [24] S. D. Paredes, A. Korkmaz, L. C. Manchester, D. X. Tan, and R. J. Reiter, "Phytomelatonin: A review," *Journal of Experimental Botany*, c. 60, sayı. 1, ss. 57–69, 2009.
- [25] D. X. Tan et al., "Functional roles of melatonin in plants, and perspectives in nutritional and agricultural science," *Journal of Experimental Botany*, c. 63, sayı. 2, ss. 577–597, 2012.
- [26] D.-X. Tan, L. C. Manchester, R. J. Reiter, W.-B. Qi, M. Karbownik, and J. R. Calvo, "Significance of melatonin in antioxidative defense system: reactions and products," *Biological Signals and Receptors*, c.9, ss. 137-159, 2000.
- [27] Y. Zhao et al., "Melatonin and its potential biological functions in the fruits of sweet cherry," *J Pineal Res*, c. 55, sayı 1, ss. 79–88, 2013, doi: 10.1111/jpi.12044.
- [28] B. Poeggeler, R. Reiter, D. Tan, L. Chen, and L. Manchester, "Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage, and aging: a hypothesis melatonin and aging: an evolutionary approach," *J Pineal Res*, c.14, ss. 151-168, 1993.
- [29] F. J. V. Gomez, I. G. Hernández, S. Cerutti, and M. F. Silva, "Solid phase extraction/cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography for the analysis of melatonin and related indole compounds in plants," *Microchemical Journal*, c. 123, ss. 22–27, 2015.
- [30] G. Mannino, C. Pernici, G. Serio, C. Gentile, and C. M. Berteà, "Melatonin and phytomelatonin: chemistry, biosynthesis, metabolism, distribution and bioactivity in plants and animals—an overview," *Int. J. Mol. Sci.*, c. 22, sayı. 9996, ss. 2-39, 2021.
- [31] M. B. Arnao and J. Hernández-Ruiz, "The potential of phytomelatonin as a nutraceutical," *Molecules*, c. 23, sayı.238, ss. 2-19, 2018.
- [32] U. Koca Çalışkan, C. Aka, and E. Bor, "Yenilebilen ve yenilemeyen bitkilerde melatonin," *Turk J Pharm Sci*, c. 14, sayı 1, ss. 75–83, 2017.

- [33] H. Shi, Y. Qian, D. X. Tan, R. J. Reiter, and C. He, "Melatonin induces the transcripts of CBF/DREB1s and their involvement in both abiotic and biotic stresses in *Arabidopsis*," *J Pineal Res*, c. 59, sayı 3, ss. 334–342, 2015.
- [34] G. Yakupoğlu, Ş. Köklü, and A. Korkmaz, "Bitkilerde melatonin ve üstlendiği görevler," *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Doğa Bilimleri Dergisi*, 2018, doi: 10.18016/ksudobil.320180.
- [35] J. Kolár, C. H. Johnson, and I. Machácková, "Presence and possible role of plant melatonin in a short-day flowering, *Chenopodium rubrum*," *Advances in Experimental Medicine and Biology*, c. 460, ss. 391–393, 1999.
- [36] Y. Zhao et al., "Melatonin and its potential biological functions in the fruits of sweet cherry," *J Pineal Res*, c. 55, sayı 1, ss. 79–88, 2013.
- [37] D. Tan, L. C. Manchester, P. Di Mascio, G. R. Martinez, F. M. Prado, and R. J. Reiter, "Novel rhythms of N¹-acetyl-N²-formyl-5-methoxykynuramine and its precursor melatonin in water hyacinth: importance for phytoremediation," *The FASEB Journal*, c. 21, sayı 8, ss. 1724–1729, 2007.
- [38] F. A. Badria, "Melatonin, Serotonin, and Tryptamine in Some Egyptian Food and Medicinal Plants," *Journal of Medicinal Food*, c. 5, sayı.3, ss. 153-157, 2002.
- [39] J. N. Losso, "Melatonin contents of raw and roasted American pistachios," *School of Nutrition and Food Sciences*, 2018.
- [40] M. M. Posmyk and K. M. Janas, "Melatonin in plants," *Acta Physiologiae Plantarum*, c. 31, ss. 1-11, 2009.
- [41] L. C. Manchester, D.-X. Tan, R. J. Reiter, W. Park, K. Monis, and W. Qi, "High levels of melatonin in the seeds of edible plants possible function in germ tissue protection," *Life Sci.* c. 67, sayı. 25, ss. 3023-3029, 2000.
- [42] S. M. Hasan, "Study on the effect of Chamomile extract on melatonin hormone levels in subjects suffering from insomnia and anxiety," *Biomedicine (India)*, c. 42, sayı 6, ss. 1301–1304, 2022.
- [43] B. Muszyńska and K. Sułkowska-Ziaja, "Analysis of indole compounds in edible Basidiomycota species after thermal processing," *Food Chem*, c. 132, sayı 1, ss. 455–459, 2012.

- [44] B. Muszyńska, K. Kała, K. Sułkowska-Ziaja, A. Krakowska, and W. Opoka, "Agaricus bisporus and its in vitro culture as a source of indole compounds released into artificial digestive juices," *Food Chem*, c. 199, ss. 509–515, 2016.
- [45] B. Muszyńska, K. Sułkowska-Ziaja, and H. Ekiert, "Indole compounds in fruiting bodies of some edible Basidiomycota species," *Food Chem*, c. 125, sayı 4, ss. 1306–1308, 2011.
- [46] G. Chen, Y. Huo, D. X. Tan, Z. Liang, W. Zhang, and Y. Zhang, "Melatonin in Chinese medicinal herbs," *Life Sci*, c. 73, sayı 1, ss. 19–26, 2003.
- [47] J. Hernández-Ruiz and M. B. Arnao, "Distribution of melatonin in different zones of lupin and barley plants at different ages in the presence and absence of light," *J Agric Food Chem*, c. 56, sayı 22, ss. 10567–10573, 2008.
- [48] S. J. Murch, C. B. Simmons, and P. K. Saxena, "Melatonin in feverfew and other medicinal plants," c. 350, 1997.
- [49] S. J. Murch and P. K. Saxena, "A melatonin-rich germplasm line of St John's wort (*Hypericum perforatum* L.)," *J Pineal Res*, c. 41, sayı 3, ss. 284–287, 2006.
- [50] P. W. Stege, L. L. Sombra, G. Messina, L. D. Martinez, and M. F. Silva, "Determination of melatonin in wine and plant extracts by capillary electrochromatography with immobilized carboxylic multi-walled carbon nanotubes as stationary phase," *Electrophoresis*, c. 31, sayı 13, ss. 2242–2248, 2010.
- [51] E. Hodžić, M. Balaban, N. Šuškalović, S. Galijašević, D. Hasanagić, and B. Kukavica, "Antioxidative response of *Melissa officinalis* L. and *Valeriana officinalis* L. leaves exposed to exogenous melatonin and excessive zinc and cadmium levels," *Journal of the Serbian Chemical Society*, c. 84, sayı 1, ss. 11–25, 2019.
- [52] M. Stürtz, A. B. Cerezo, E. Cantos-Villar, and M. C. Garcia-Parrilla, "Determination of the melatonin content of different varieties of tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) and strawberries (*Fragaria ananassa*)," *Food Chem*, c. 127, sayı 3, ss. 1329–1334, 2011.
- [53] Q. Lei et al., "Identification of genes for melatonin synthetic enzymes in 'Red Fuji' apple (*Malus domestica* Borkh.cv.Red) and their expression and melatonin production during fruit development," *J Pineal Res*, c. 55, sayı 4, ss. 443–451, 2013.

- [54] L. Wang et al., “Changes in melatonin levels in transgenic ‘Micro-Tom’ tomato overexpressing ovine AANAT and ovine HIOMT genes,” *J Pineal Res*, c. 56, sayı 2, ss. 134–142, 2014.
- [55] S. Vitalini et al., “The presence of melatonin in grapevine (*Vitis vinifera* L.) berry tissues,” *J Pineal Res*, c. 51, sayı 3, ss. 331–337, 2011.
- [56] A. C. Gonçalves, A. R. Nunes, G. Alves, and L. R. Silva, “Serotonin and melatonin: plant sources, analytical methods, and human health benefits,” *Revista Brasileira de Farmacognosia Springer Science*, 2021 doi: 10.1007/s43450-021-00141-w.
- [57] Scientific Committee on Consumer Safety (European Commission), “Opinion on melatonin,” 2010. doi: 10.2772/23346.
- [58] C. S. Shida, A. M. L. Castrucci, and M. T. Lamy Freund, “Melatonin solubility in aqueous medium,” *J Pineal Res*, c. 16, ss. 198–201, 1994.
- [59] J. Kolář and I. Macháčková, “Melatonin in higher plants: Occurrence and possible functions,” *J Pineal Res.*, c. 39, sayı. 4, ss. 333–341, 2005.
- [60] G. Allegrone, F. Razzano, F. Pollastro, and G. Grassi, “Determination of melatonin content of different varieties of hemp (*Cannabis sativa* L.) by liquid chromatography tandem mass spectrometry,” *SN Appl Sci*, c. 1, sayı 7, 2019.
- [61] R. S. Günhan, “Melatonin ve önemi,” *Biol Divers Conserv*, ss. 342–350, 2021, doi: 10.46309/biodicon.2021.974766.
- [62] T. Ye, Y. H. Hao, L. Yu, H. Shi, R. J. Reiter, and Y. Q. Feng, “A simple, rapid method for determination of melatonin in plant tissues by UPLC coupled with high resolution orbitrap mass spectrometry,” *Front Plant Sci*, c. 8, 2017, doi: 10.3389/fpls.2017.00064.
- [63] J. W. Yeom and C. H. Cho, “Herbal and natural supplements for improving sleep: a literature review,” *Psychiatry Investig.*, c.21, sayı.8, ss. 810–821, 2024.
- [64] F. Pérez-Llamas, J. Hernández-Ruiz, A. Cuesta, S. Zamora, and M. B. Arnao, “Development of a phytomelatonin-rich extract from cultured plants with excellent biochemical and functional properties as an alternative to synthetic melatonin,” *Antioxidants*, c. 9, sayı 2, 2020.

- [65] Amit Ashok Khune, Harishkumar Rathod, and Swati P. Deshmukh, "Development of herbal medicated gummies for nicotine cessation support," GSC Biological and Pharmaceutical Sciences, c. 28, sayı 2, ss. 084–089, 2024.
- [66] M. L. Q. Niam, R. S. Amin, N. Utami, and A. S. Wahyuni, "Formulation of dietary supplement chewable gummy with bastard cedar leaves (*Guazuma ulmifolia*), senna leaves (*Cassia angustifolia*) and lime extracts using a simplex lattice design," Proceedings of the International Conference on Sustainable Innovation on Health Sciences and Nursing, c.55, ss. 122–135, 2022.
- [67] M. Roudbari, M. Barzegar, M. A. Sahari, and H. A. Gavlighi, "Formulation of functional gummy candies containing natural antioxidants and stevia," Heliyon, c. 10, sayı 11, 2024.
- [68] D. Pizzoni, D. Compagnone, C. Di Natale, N. D'Alessandro, and P. Pittia, "Evaluation of aroma release of gummy candies added with strawberry flavours by gas-chromatography/mass-spectrometry and gas sensors arrays," J Food Eng, c. 167, ss. 77–86, 2015.
- [69] E. Teixeira-Lemos, A. R. Almeida, B. Vouga, C. Morais, I. Correia, P. Pereira, R.P.F. Guine, "Development and characterization of healthy gummy jellies containing natural fruits," Open Agriculture, c. 6, sayı 1, ss. 466–478, 2021.
- [70] R. Jayaprakash, A. Sharma, and N. A. Babu, "Therapeutic chewing gums: Review," Biomedical & Pharmacology Journal, c.8, ss.91-97, 2015.
- [71] L. Gupta, S. Patil, R. Kable, D. Sharma, and S. Pawar, "Formulation and evaluation of medicated gummies containing paracetamol and agar-agar," International Journal of Creative Research Thoughts (IJCRT), c. 12, sayı 6, 2024.
- [72] E. Ebcin Korkusuz (2014). Gümüşi ıhlamur (*Tilia tomentosa* Moench.)'un tohum özellikleri üzerine araştırmalar. Yayınlanmış doktora tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Orman Mühendisliği Anabilim Dalı, İstanbul.
- [73] C. Yaman, "Tıbbi adaçayının (*Salvia officinalis* L) herbal çaylarındaki mineral içeriği üzerine örnek miktarı ve uygulama süresinin etkisi," Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi, c. 8, sayı 2, ss. 336–343, 2021.
- [74] R. Bahtiyarca Bağdat and B. Coşge, "The essential oil of lemon balm (*Melissa officinalis* L.), its components and using fields," OMÜ Ziraat Fakülte Dergisi, c. 21, sayı 1, ss. 116–121, 2006.

- [75] H. Srivastava and K. K. Maheshwari, "Melissa officinalis – an overview and its properties as an anxiolytic," *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Medicine*, c. 8, sayı 3, ss. 33–41, 2023.
- [76] H. Haybar, A. Z. Javid, M. H. Haghighizadeh, E. Valizadeh, S. M. Mohaghegh, and A. Mohammadzadeh, "The effects of Melissa officinalis supplementation on depression, anxiety, stress, and sleep disorder in patients with chronic stable angina," *Clin Nutr ESPEN*, c. 26, ss. 47–52, 2018.
- [77] E. Ersoy and E. Eroğlu Özkan, "Geçmişten günümüze Hypericum perforatum (sarı kantaron) ve depresyon tedavisi neler biliyoruz," *Journal of Literature Pharmacy Sciences*, c. 9, sayı 2, ss. 137–148, 2020.
- [78] M. Doğan, Y. Sedetaltun, C. Odabaşioğlu, and M. İ. Odabaşioğlu, "Şanlıurfa ili çevresinde yetişen papatya (*Matricaria chamomilla* L.) türlerinde enzim miktar tayini," *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, c. 25, sayı 2, ss. 345–350, 2021.
- [79] M. Bhandarkar, "Chamomile plant (*Matricaria chamomilla*) in the management of insomnia," *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Research (IJPPR)*, c. 31, sayı 4, ss. 243–254, 2025.
- [80] N. Mousavi-Niri, M. Naseroleslami, E. Ghanimati, M. Moheb-Alian, F. Abdollahpour, and F. Khakpai, "Stevia and especially nano-stevia induced anti-diabetic, antidepressant, and analgesic effects in streptozotocin-induced diabetic rats," *Physiol Pharmacol*, c. 29, sayı.2, ss. 219-231, 2025.
- [81] M. Leour, C. Pascua, R. Mari, T. Rubio, and M. C. Pareja, "The neuro-physiological effect of stevia rebaudiana to imprinted control mice (ICR) mice," *INT J CURR SCI*, c. 13, ss. 138–146, 2014.
- [82] Y. Güllüoğlu et al., "Melatonin Extraction and Determination by UHPLC-FD from Different Plants," *Anatolian Journal of Pharmaceutical Sciences*, c. 3, sayı 2, 2024.
- [83] F. Noori Siahdasht, N. Farhadian, M. Karimi, and L. Hafizi, "Enhanced delivery of melatonin loaded nanostructured lipid carriers during: In vitro fertilization: NLC formulation, optimization and IVF efficacy," *The Royal Society of Chemistry Adv.*, c. 10, sayı 16, ss. 9462–9475, 2020.
- [84] B. Topal, D. Çetin Altındal, and M. Gümüşderelioglu, "Melatonin/HP β CD complex: microwave synthesis, integration with chitosan scaffolds and inhibitory effects on MG-63CELLS," *Int J Pharm*, c. 496, sayı 2, ss. 801–811, 2015.

- [85] G. Singh, J.M. Abbas, S.D. Dogra, R. Sachdeva, B. Rai, S.K. Tripathi, S. Prakash, V. Sathe, G.S.S. Saini, "Vibrational and electronic spectroscopic studies of melatonin," *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, c. 118, ss. 73–81, 2014.
- [86] M. Pharmawati and L. P. Wrsiati, "Phytochemical screening and ftir spectroscopy on crude extract from enhalus acoroides leaves (saringan fitokimia dan spektroskopi ftir ekstrak mentah daun enhalus acoroides)," *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, c. 24, sayı. 1, ss. 70 - 77 2020.
- [87] M. A. Akçe and Y. K. Kadioğlu, "Raman Spektroskopisinin İlkeleri ve Mineral Tanımlamalarında Kullanılması," *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi*, c. 9, sayı 2, ss. 99–115, 2020.
- [88] M. Sirkeci (2021). *İn vitro ortamda yetiştirilen buğdayın mikroyapısal analizlerinin spektroskopik ve mikroskopik yöntemlerle incelenmesi*. Yayınlanmış yüksek lisans tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [89] I. Chakraborty, S. Banik, R. Biswas, T. Yamamoto, H. Noolthapathi, and N. Mazumder, "Raman spectroscopy for microplastic detection in water sources: a systematic review," *International journal of Environmental Science and Technology*, 2022.
- [90] H. G. M. Edwards, "Spectra-Structure Correlations in Raman Spectroscopy," *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, 2006, doi: 10.1002/9780470027325.s4103.
- [91] X. Li, D. Zhang, Y. Bai, W. Wang, J. Liang, and J. X. Cheng, "Fingerprinting a living cell by raman integrated mid-infrared photothermal microscopy," *Anal Chem*, c. 91, sayı 16, ss. 10750–10756, 2019.
- [92] A. Rygula, K. Majzner, K. M. Marzec, A. Kaczor, M. Pilarczyk, and M. Baranska, "Raman spectroscopy of proteins: A review," *John Wiley and Sons Ltd.*, 2013, doi: 10.1002/jrs.4335.
- [93] G. S. Bumbrah and R. M. Sharma, "Raman spectroscopy – Basic principle, instrumentation and selected applications for the characterization of drugs of abuse," *Egyptian Forensic Medicine Authority*, 2016, doi: 10.1016/j.ejfs.2015.06.001.
- [94] N. A. Pratima and R. Gadikar, "Liquid chromatography-mass spectrometry and its applications: a brief review," *Archives of Organic and Inorganic Chemical Sciences*, c. 1, sayı 1, 2018.

- [95] X. Huang and G. Mazza, "Application of LC and LC-MS to the analysis of melatonin and serotonin in edible plants," *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, c.51, sayı. 4, ss. 269-284, 2011.
- [96] R. Charoen, W. Savedboworn, S. Phuditcharnchnakun, and T. Khuntaweeatap, "Development of antioxidant gummy jelly candy supplemented with psidium guajava leaf extract," *KMUTNB International Journal of Applied Science and Technology*, ss. 1–7, 2015, doi: 10.14416/j.ijast.2015.02.002.
- [97] M. Ganea, P. C.G. Loana, T.C. Ghitea, L. Ștefan, F. Groza, O. D. Frent, C. Nagy, C.S.Lova, A.F. Schwarz- Madar, G. Ciavoi, L.G. Vicas, P. D. Constanta, C. Moisa, "Development and Evaluation of Gelatin-Based Gummy Jellies Enriched with Oregano Oil: Impact on Functional Properties and Controlled Release," *Foods*, c. 14, sayı 3, 2025.
- [98] K. Yadav, N. M. Gawai, B. Shivhare, L. S. Vijapur, and G. Tiwari, "Development and evaluation of herbal-enriched nutraceutical gummies for pediatric health," *Pharmacognosy Res*, c. 16, sayı 4, ss. 872–878, 2024.
- [99] U. Čižauskaite, G. Jakubaityte, V. Žitkevičius, and G. Kasparavičiene, "Natural ingredients-based gummy bear composition designed according to texture analysis and sensory evaluation in vivo," *Molecules*, c. 24, sayı 7, 2019.
- [100] K. F. Romo-Zamarrón, L. E. Pérez-Cabrera, and A. Tecante, "Physicochemical and sensory properties of gummy candies enriched with pineapple and papaya peel powders," *Food Nutr Sci*, c. 10, sayı 11, ss. 1300–1312, 2019.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı :Sümeyye ZARF TOKAN

Yabancı Dili :İngilizce

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Doktora	Doğal ve Bitkisel Ürünler, Kozmetik Ürünler	Düzce Üniversitesi	2025
Y. Lisans	Moleküler Biyoloji	Bülent Ecevit Üniversitesi	2019
Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Bülent Ecevit Üniversitesi	2017

YAYINLAR

Tez Dışı Yayınlar

Altıntaş, D., Zarf Tokan, S. ve Koca Çalışkan, U.(2022). *Helichrysum arenarium* (L.) Moench' in taksonomik, biyolojik aktivite ve biyokimyasal açıdan incelenmesi (Editör: R. Tunçtürk). *Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Fonksiyonel Kullanım Alanları, Ticareti ve Sürdürülebilirliği*. Ankara: İksad Yayınevi, 119-146.

Zarf, S. ve Arman, I. (2020).Effect of Fluconazole, an Anti-Fungal Drug, on Human Flora Bacteria. *Journal of Bacteriology and Mycology*, c.7, sayı. 2.

Zarf, S. ve Arman, I. (2020). In Vitro and In Silico Analysis of the Effect of Fluconazole, an Antifungal Drug, on DNA. *J. Serb. Chem. Soc.*, c. 85, sayı. 9, ss. 1137–1147.