

**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TOKSİK MELAMİNİN UZAKLAŞTIRILMASINA**  
**YÖNELİK AFİNİTE MATRİKSİNİN**  
**HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

**Simge ÖZTÜRK**

**Ağustos, 2017**

**İZMİR**

# **TOKSİK MELAMİNİN UZAKLAŞTIRILMASINA YÖNELİK AFİNİTE MATRİKSİNİN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

**Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Kimya Anabilim Dalı**

**Simge ÖZTÜRK**

**Ağustos, 2017**

**İZMİR**

## YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

**SİMGE ÖZTÜRK** tarafından **PROF. DR. M. NALAN TÜZMEN** yönetiminde hazırlanan **“TOKSİK MELAMİNİN UZAKLAŞTIRILMASINA YÖNELİK AFİNİTE MATRİKSİNİN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU”** başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

  
Prof. Dr. M. Nalan TÜZMEN

Yönetici

  
Prof. Dr. Serap Seyhan Bozkurt

Jüri Üyesi

  
Doç. Dr. Dilek ODACI DEMİRKOL

Jüri Üyesi

  
Prof. Dr. Emine İlknur CÖCEN

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca çalışmalarımın her aşamasında bana yol gösteren, bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen saygı değer hocam Prof. Dr. M. Nalan TÜZMEN'e,

Yüksek lisans sırasında 2015.KB.FEN.043 nolu 'Toksik Melaminin Uzaklaştırılmasına Yönelik Afinite Matriksinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu' projesi ile tez çalışmamı destekleyen Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Hayatım boyunca yanımda olan, her konuda benden maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Simge ÖZTÜRK

# **TOKSİK MELAMİNİN UZAKLAŞTIRILMASINA YÖNELİK AFİNİTE MATRİKSİNİN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

## **ÖZ**

Genelde reçine, yapıştırıcı ve plastik üretiminde kullanılan ancak %66 gibi yüksek orandaki azot içeriği nedeniyle protein miktarını artırmak amacıyla süt, sütlu mama, çikolata gibi gıdalara illegal olarak ilave edilen melamin, böbrek yetmezliği, kanser gibi ciddi sağlık sorunlarına yol açan toksik bir triazindir. Bu nedenle gıda örneklerindeki melamin miktarının takibi önemli bir konudur. Ancak, gıdalar gibi kompleks matrislerdeki melaminin doğru tayini oldukça zordur ve analiz öncesi ekstraksiyonu gereklidir.

Bu çalışmada, melaminin yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile tayini öncesi ekstraksiyonunda karmaşık matrisli ortamlardan melaminin ekstraksiyonunda ve uzaklaştırılmasında kullanılmak amacıyla metal şelat etkileşimlerine dayalı immobilize metal şelat afinite sorbentinin (İMAK) hazırlanması ve karakterizasyonu hedeflenmiştir. Bu amaçla, kitosan (CTS), 2-hidroksietil metakrilat p(HEMA) ve çapraz bağlayıcı olarak etilenglikol dimetakrilat (EGDMA) kullanılarak kitosan-p(HEMA) sorbenti radikalik polimerizasyon yoluyla sentezlenmiştir. Cu(II) iyonları daha sonra CTS-p(HEMA) sorbenti üzerine şelatlanmıştır. CTS-p(HEMA)-Cu(II) afinite sorbenti, fourier infrared spektroskopisi (FTIR), taramalı elektron mikroskobu (SEM), termogravimetrik analiz (TGA) ve şişme testi ile karakterize edilmiştir. Melaminin ekstraksiyonu amacıyla hazırlanan CTS-p(HEMA)-Cu(II) sorbentinin adsorpsiyon parametreleri (süre, başlangıç melamin derişimi gibi) sulu çözeltiden melaminin ekstraksiyonu için optimize edilmiştir. Sorbent ayrıca süt ve bebek maması gibi günlük gıdalardaki melaminin tayini amacıyla kullanılmıştır. CTS-p(HEMA)-Cu(II) sorbentinin tekrar kullanılabilirliğini belirlemek üzere adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü aynı sorbent kullanılarak yapılmış ve beş döngüye kadar adsorpsiyon kapasitesinde kayda değer bir düşüş gözlenmemiştir.

**Anahtar kelimeler:** Melamin, immobilize metal şelat afinite kromatografi

## **PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF AN AFFINITY MATRIX TO REMOVE TOXIC MELAMINE**

### **ABSTRACT**

Melamine which is used in the manufacture of resins, adhesives and plastics and added illegally to the foods such as milk, milky formula and chocolate to increase their protein amounts due to its high nitrogen content (66%) is a toxic triazine that causes serious health problem like cancer and renal failure. Hence, it is imperative to monitor the amount of melamine in food samples. However, accurate determination of melamine in the complicated matrices like foods is quite difficult and therefore extraction of melamine from food samples is needed before analysis.

This study has been performed in order to prepare and characterize immobilized metal affinity chromatography (IMAC) sorbent based on the metal-chelate interaction for the extraction and removal of the melamine from complex matrices prior to HPLC analysis. For this purpose, chitosan-p(HEMA) sorbent were synthesized through radical polymerization by using chitosan (CTS), 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) and ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) as cross-linker agent. Cu(II) ions were then chelated on the CTS-p(HEMA) sorbent. CTS-p(HEMA)-Cu(II) affinity sorbent was characterized by using fourier transfer infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM), thermogravimetric analysis (TGA) and swelling test. Adsorption parameters (contact time, initial melamine concentration, etc.) of CTS-p(HEMA)-Cu(II) sorbent were optimized for the extraction of melamine from aqueous solutions. This sorbent was also used for the determination of melamine in dairy products such as milk and infant formula. In order to show the stability and reusability of CTS-p(HEMA)-Cu(II), the adsorption-desorption cycle was repeated five times using the same sorbent and no significant decrease was observed.

**Keywords:** Melamine, immobilized metal-chelate affinity chromatography

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                    | Sayfa     |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| YÜKSEK LİSANS TEZİ TEZ SONUÇ FORMU .....                                           | ii        |
| TEŞEKKÜR .....                                                                     | iii       |
| ÖZ.....                                                                            | iv        |
| ABSTRACT .....                                                                     | v         |
| ŞEKİLLER LİSTESİ.....                                                              | ix        |
| TABLolar LİSTESİ .....                                                             | xi        |
| <b>BÖLÜM BİR - GİRİŞ.....</b>                                                      | <b>1</b>  |
| 1.1 Melamin.....                                                                   | 1         |
| 1.1.1 Melaminin Maksimum Kalıntı Limitleri ve Tayin Yöntemleri.....                | 5         |
| 1.1.2 Gıdalardaki Melaminin Tayini Öncesi Örnek Hazırlama.....                     | 6         |
| 1.2 Afinite Kromatografisi .....                                                   | 9         |
| 1.2.1 Afinite Kromatografisinin Bileşenleri.....                                   | 11        |
| 1.2.2. Afinite Kromatografisinin Alt Dalları .....                                 | 14        |
| 1.3 İmmobilize Metal Şelat Afinite Kromatografisi (İMAK) .....                     | 15        |
| 1.3.1 İMAK İçin İdeal Kromatografik Destek Sorbentleri.....                        | 18        |
| 1.4 Literatür Özeti.....                                                           | 19        |
| 1.5 Çalışmanın Amacı .....                                                         | 24        |
| <b>BÖLÜM İKİ - MATERYAL VE METOT .....</b>                                         | <b>26</b> |
| 2.1 Reaktifler .....                                                               | 26        |
| 2.2 Kitosan-Poli(2-hidroksietilmetakrilat) [CTS-p(HEMA)] Sorbentinin Sentezi ..... | 26        |
| 2.3 CTS-p(HEMA) Sorbentine Bakır İmmobilizasyonu.....                              | 28        |
| 2.4 CTS-p(HEMA)-Cu <sup>2+</sup> Sorbentinin Karakterizasyonu .....                | 29        |

|                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.5 Melaminin CTS-p(HEMA)-Cu <sup>2+</sup> Sorbenti Üzerine Adsorpsiyon Koşullarının Optimizasyonu.....              | 30 |
| 2.5.1 CTS-p(HEMA)-Cu <sup>2+</sup> Üzerine Melamin Adsorpsiyonuna pH Etkisi.....                                     | 31 |
| 2.5.2 CTS-p(HEMA)-Cu <sup>2+</sup> Üzerine Melamin Adsorpsiyonuna Sorbent Miktarının Etkisi.....                     | 31 |
| 2.5.3 CTS-p(HEMA)-Cu <sup>2+</sup> Üzerine Melamin Adsorpsiyonuna Sürenin Etkisi.....                                | 31 |
| 2.5.4 CTS-p(HEMA)-Cu <sup>2+</sup> Üzerine Melamin Adsorpsiyonuna Melaminin Başlangıç Konsantrasyonunun Etkisi ..... | 32 |
| 2.5.5 CTS-p(HEMA)-Cu <sup>2+</sup> Üzerine Melamin Adsorpsiyonuna Sıcaklığın Etkisi.....                             | 32 |
| 2.6 CTS-p(HEMA)-Cu <sup>2+</sup> Sorbentinden Melaminin Desorpsiyonu .....                                           | 32 |
| 2.7 CTS-p(HEMA)-Cu <sup>2+</sup> Sorbentinin Tekrar Kullanılabilirlik Denemeleri.....                                | 33 |
| 2.8 CTS-p(HEMA)-Cu <sup>2+</sup> Sorbenti ile Süt Ürünlerinden Melaminin Ekstraksiyonu .....                         | 34 |
| 2.8.1 Süt.....                                                                                                       | 34 |
| 2.8.2 Bebek Maması .....                                                                                             | 34 |
| 2.9 Melaminin Yüksek Performanlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) İle Analizi .....                                        | 35 |
| 2.9.1 Yöntemin Analitik Performans Parametrelerinin Belirlenmesi.....                                                | 37 |

## **BÖLÜM ÜÇ - BULGULAR VE TARTIŞMALAR ..... 39**

|                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1 CTS-p(HEMA)-Cu <sup>2+</sup> Sorbentinin Karakterizasyonu .....                                      | 39 |
| 3.1.1 CTS-p(HEMA) Sorbentinin FTIR Spektrumu .....                                                       | 39 |
| 3.1.2 CTS-p(HEMA)-Cu <sup>2+</sup> Sorbentinin Termal Analizi .....                                      | 41 |
| 3.1.3 CTS-p(HEMA) ve CTS-p(HEMA)-Cu <sup>2+</sup> Sorbentlerinin SEM Görüntüleri.....                    | 42 |
| 3.1.4 CTS-p(HEMA)-Cu <sup>2+</sup> Sorbentinin Şişme Kapasitesinin Belirlenmesi.....                     | 43 |
| 3.2 Melaminin CTS-p(HEMA)-Cu <sup>2+</sup> Sorbentin Üzerine Adsorpsiyon Koşullarının Optimizasyonu..... | 44 |
| 3.2.1 CTS-p(HEMA)-Cu <sup>2+</sup> Üzerine Melamin Adsorpsiyonuna pH Etkisi.....                         | 44 |



|                                                                                                                   |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.2 CTS-p(HEMA)-Cu <sup>2+</sup> Üzerine Melamin Adsorpsiyonuna Sorbent Miktarının Etkisi.....                  | 45        |
| 3.2.3 CTS-p(HEMA)-Cu <sup>2+</sup> Üzerine Melamin Adsorpsiyonuna Sürenin Etkisi.....                             | 46        |
| 3.2.4 CTS-p(HEMA)-Cu <sup>2+</sup> Üzerine Melamin Adsorpsiyonuna Başlangıç Melamin Konsantrasyonunun Etkisi..... | 47        |
| 3.2.5 CTS-p(HEMA)-Cu <sup>2+</sup> Üzerine Melamin Adsorpsiyonuna Sıcaklığın Etkisi.....                          | 48        |
| 3.3 CTS-p(HEMA)-Cu <sup>2+</sup> Sorbentinden Melamin Desorpsiyonu .....                                          | 49        |
| 3.4 CTS-p(HEMA)-Cu <sup>2+</sup> Sorbentinin Tekrar Kullanılabilirlik Denemeleri.....                             | 51        |
| 3.5 Süt Ürünlerinde Melamin Tayini .....                                                                          | 52        |
| 3.6. Yöntemin Analitik Performans Parametrelerinin Belirlenmesi .....                                             | 53        |
| <b>BÖLÜM DÖRT - SONUÇLAR .....</b>                                                                                | <b>56</b> |
| <b>KAYNAKLAR .....</b>                                                                                            | <b>58</b> |

## ŞEKİLLER LİSTESİ

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Sayfa |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Şekil 1.1 Melaminin Yapısı.....                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 1     |
| Şekil 1.2 Melaminin kullanım alanları.....                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 2     |
| Şekil 1.3 Gıda güvenliğini tehdit eden unsurlar.....                                                                                                                                                                                                                                                                       | 3     |
| Şekil 1.4 Melamin-siyanürat kompleksi .....                                                                                                                                                                                                                                                                                | 4     |
| Şekil 1.5 Analiz edilecek örneğin özelliğine göre seçilmesi gereken SPE ayırım tekniği (SCX: Güçlü katyon değiştirici; SAX: Güçlü anyon değiştirici)...                                                                                                                                                                    | 7     |
| Şekil 1.6 Afinite kromatografisinin şematik gösterimi a) Ligandın tersinmez olarak uzatıcı kol yardımıyla destek sorbentine bağlanması; b) Saflaştırılacak molekülün seçici adsorpsiyonu; c) Safsızlıkların ortamdan uzaklaştırılması; d) Saflaştırılması istenen destek sorbentinden ayrıştırılarak saflaştırılması ..... | 10    |
| Şekil 1.7 Afinite kromatografisinin alt dalları .....                                                                                                                                                                                                                                                                      | 15    |
| Şekil 1.8 İMAK yöntemiyle saflaştırılacak olan molekülün adsorpsiyon ve desorpsiyonu içeren mekanizmaların diyagramı .....                                                                                                                                                                                                 | 17    |
| Şekil 2.1 CTS-p(HEMA) sorbentinin olası yapısı a) Kitosan radikalinin oluşumu b) Radikalik kitosana HEMA bağlanması.....                                                                                                                                                                                                   | 27    |
| Şekil 2.2 1 µg/mL melamin standart çözeltisinin kromatogramı (Rt: 1,45 dakika)...                                                                                                                                                                                                                                          | 35    |
| Şekil 3.1 CTS-p(HEMA) sorbentine ilişkin FTIR Spektrumu.....                                                                                                                                                                                                                                                               | 40    |
| Şekil 3.2 CTS-p(HEMA) sorbentine ilişkin TGA termogramı.....                                                                                                                                                                                                                                                               | 41    |
| Şekil 3.3.1 CTS-p(HEMA) sorbentine ilişkin SEM görüntüsü a) 300µm b) 100µm c) 30µm d) 5µm.....                                                                                                                                                                                                                             | 42    |
| Şekil 3.3.2 CTS-p(HEMA)-Cu <sup>2+</sup> sorbentine ilişkin SEM görüntüsü a) 300µm b) 100µm c) 50µm d) 5µm .....                                                                                                                                                                                                           | 43    |
| Şekil 3.4 CTS-p(HEMA)-Cu <sup>2+</sup> üzerine melamin adsorpsiyonuna pH etkisi (DeneySEL Koşullar: 0,05 g sorbent, 0,5 µg/mL MEL, 25°C, 60 dk) .....                                                                                                                                                                      | 45    |
| Şekil 3.5 CTS-p(HEMA)-Cu <sup>2+</sup> üzerine melamin adsorpsiyonuna sorbent miktarının etkisi (DeneySEL Koşullar: 0,5 µg/mL MEL, 25°C, 60 dk).....                                                                                                                                                                       | 46    |

|                                                                                                                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 3.6 CTS-p(HEMA)-Cu <sup>2+</sup> üzerine melamin adsorpsiyonuna sürenin etkisi<br>(Deneyisel Koşullar: 0,05 g sorbent, 0,5 µg/mL MEL, 25°C).....                                                        | 47 |
| Şekil 3.7 CTS-p(HEMA)-Cu <sup>2+</sup> üzerine melamin adsorpsiyonuna başlangıç<br>konsantrasyonunun etkisi (Deneyisel Koşullar: 0,05 g sorbent, 25°C, 60<br>dk).....                                         | 48 |
| Şekil 3.8 CTS-p(HEMA)-Cu <sup>2+</sup> üzerine melaminin adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi<br>(Deneyisel Koşullar: 0,05 g sorbent, 0,5 µg/mL MEL, 60 dk).....                                                  | 49 |
| Şekil 3.9 CTS-p(HEMA)-Cu <sup>2+</sup> sorbentinden organik çözücüler kullanarak melaminin<br>desorpsiyonu (0,5 µg/mL MEL, 25°C, t <sub>adsorpsiyon</sub> :60 dk, t <sub>desorpsiyon</sub> : 240 dk)<br>..... | 50 |
| Şekil 3.10 CTS-p(HEMA)-Cu <sup>2+</sup> sorbentinden tuz çözeltileri kullanarak melaminin<br>desorpsiyonu (0,5 µg/mL MEL, 25°C, t <sub>adsorpsiyon</sub> :60 dk, t <sub>desorpsiyon</sub> : 240 dk)<br>.....  | 50 |
| Şekil 3.11 CTS-p(HEMA)-Cu <sup>2+</sup> sorbentinin tekrar kullanılabilirliği .....                                                                                                                           | 51 |

## TABLÖLAR LİSTESİ

### Sayfa

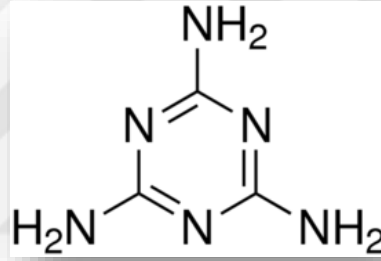
|                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 1.1 Afinite kromatografisinde kullanılan bazı sorbentler .....                                                | 12 |
| Tablo 1.2 Afinite kromatografisinde kullanılan bazı ligandlar .....                                                 | 13 |
| Tablo 1.3 Farklı kromatografik tekniklerin karşılaştırılması .....                                                  | 16 |
| Tablo 2.1 Atomik absorpsiyon spektroskopisindeki ölçümlerle ilgili parametreler ..                                  | 28 |
| Tablo 2.2 Melamin desorpsiyonu amacıyla çalışılan bazı desorpsiyon ajanları .....                                   | 33 |
| Tablo 2.3 Melaminin HPLC ile analizine ilişkin kromatografik koşullar .....                                         | 36 |
| Tablo 3.1 Süt ve bebek maması örneklerinden MEL adsorpsiyonu sonuçları .....                                        | 52 |
| Tablo 3.2 HPLC-FLD yönteminin süt ve bebek maması kullanarak elde edilen<br>analitik performans parametreleri ..... | 54 |
| Tablo 3.3 Süt ve bebek maması örneklerinden geri kazanım sonuçları .....                                            | 54 |

## BÖLÜM BİR

### GİRİŞ

#### 1.1 Melamin

Melamin (2,4,6-triamino-s-triazin, MEL), Şekil 1.1’de gösterilen,  $C_3H_6N_6$  kimyasal formülüne sahip, genellikle kimya endüstrisinde laminant kaplamalar, ticari filtreler, tutkallar veya tutkal maddeleri ile plastik ve alev geciktiriciler için melamin-formaldehit polimer reçinelerinin üretiminde kullanılan veya ham materyal olarak da oldukça geniş bir kullanım alanına sahip olan bazik organik bir bileşiktir (Tran ve diğer., 2010; Zhang ve diğer., 2014).



Şekil 1.1 Melaminin Yapısı

Geniş kullanım alanına sahip olan melamin-formaldehit reçineleri aynı zamanda

- ❖ beyaz yazı tahtasında,
- ❖ mutfak malzemelerinde,
- ❖ plastik malzemelerin yapımında,
- ❖ yapıştırıcılarda,
- ❖ ütü istemeyen kumaşlarda,
- ❖ yüzey kaplamalarında,
- ❖ kağıt üretimi gibi alanlarda yaygın olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Tyan ve diğer., 2009; Wang ve diğer., 2010).

Melamin aleve dayanıklı materyallerde de geniş bir kullanım aralığına sahip olup, bu türden elbiseleri giyen kişileri ateşin yarattığı tehlikelerden koruduğu ve uçak, otobüs gibi pek çok yerde yangının önüne geçilmesi amacıyla kaplama materyali olarak kullanıldığında yangının yayılmasına engel olduğu belirtilmiştir (Tyan ve diğer., 2009).

Bunlara ek olarak, melaminin 1950’li yıllarda azotun yavaş salınım özelliğine sahip olmasından dolayı gübre olarak kullanıldığı, sonra yerine daha ekonomik azot kaynakları bulunması nedeniyle bu amaçla kullanımının terk edildiği rapor edilmiştir (WHO, 2009; Wang ve diğer., 2010).

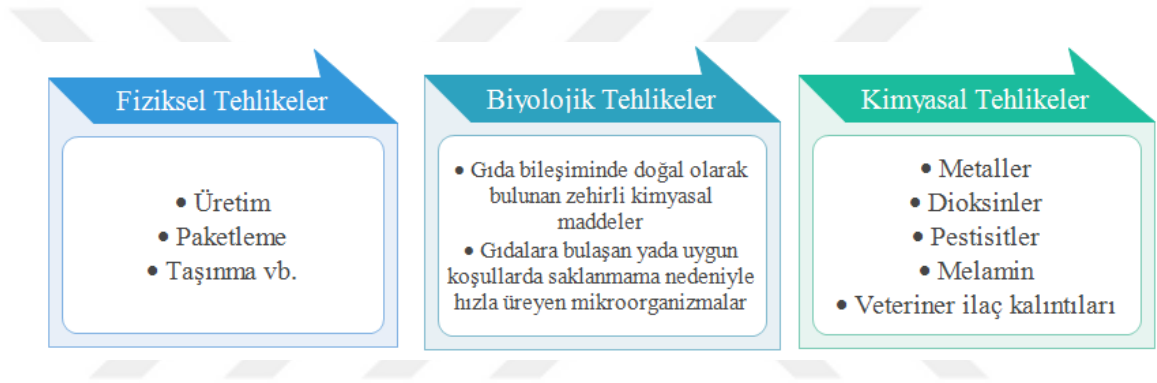


Şekil 1.2 Melaminin kullanım alanları

Ayrıca, melamin yukarıda yer alan endüstriyel amaçlı kullanımlarının yanı sıra yüksek azot içeriğine sahip olması nedeniyle gıdalara (süt, bebek maması, çikolata, bisküvi, evcil hayvan yemleri vb.) katkı maddesi olarak da ilave edilmektedir (Chan, Griffiths ve Chan, 2008; Erkmen, 2010).

Son yıllarda, küreselleşmenin getirdiği hızlı dünya nüfusunun artışı ile birlikte artan gıda tüketimi, çevre kirliliği ve ekonomik yetersizlik gibi sorunlar nedeniyle beslenme sorunları da artmakta ve güvenli gıda temini zorlaşmaktadır. Bu nedenle; gıda güvenliği konusu, insan sağlığının korunması yönünden tüm ülkeler açısından önem kazanan ve bu nedenle de araştırmaların ilgi odağı olan bir konu haline gelmiştir (Erkmen, 2010).

Gıda kaynaklı hastalıkların ortaya çıkmasına neden olan ve gıda güvenliğini tehdit eden unsurlar üç ana başlık altında değerlendirilmekte olup bu unsurlar Şekil 1.3’de verilmiştir.

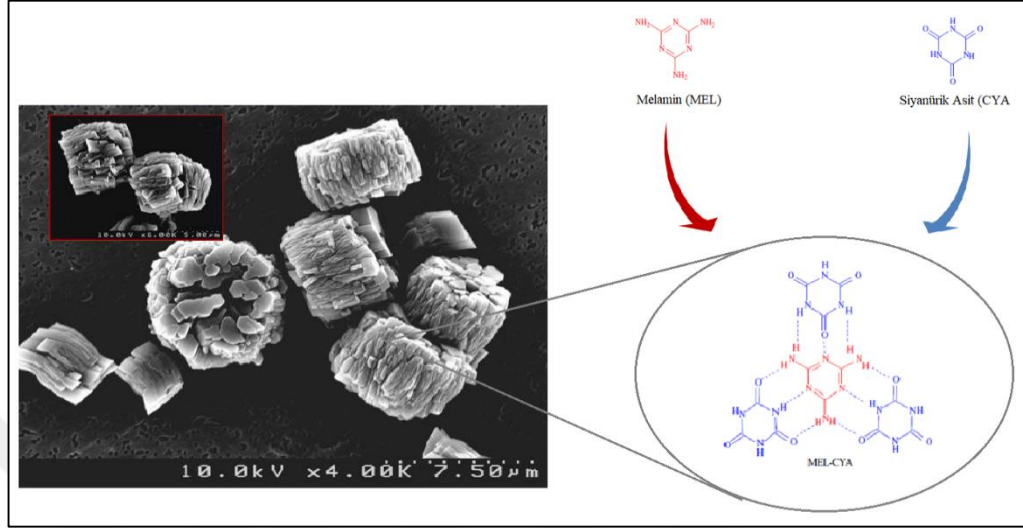


Şekil 1.3 Gıda güvenliğini tehdit eden unsurlar

Metaller, dioksinler, pestisidler ve veteriner ilaç kalıntıları gibi gıda güvenliğini tehdit eden, gıda kaynaklı hastalıkların ortaya çıkmasına neden olan kimyasal tehlikelerden biri de melamindir. Melamin, genellikle endüstriyel olarak reçine ve plastik üretimi gibi alanlarda kullanılmasına karşın küttele %66 oranında yüksek oranda azot içermesi sebebiyle, azot eksikliğini gidermek ya da protein içeriğini zenginleştirmek amacıyla gıdaların üretiminde katkı maddesi olarak illegal bir şekilde ilave edilmektedir (Chan, Griffiths ve Chan, 2008; Erkmen, 2010; Vasimalai ve John, 2013).

Fareler ve sıçanlarda yapılan deneyler sonucunda melaminin, oral ortalama öldürücü doz olan 3000 mg/kg’ı aşan dozlarda düşük akut toksisiteye sahip olduğu belirlenmiştir. Sulu koşullarda melamin ve siyanürik asitten melamin kristalleri

olarak da adlandırılan, melamin ve siyanürik asit arasında gergin hidrojen bağlarının bulunduğu melamin-siyanürat kompleksi oluşur.



Şekil 1.4 Melamin-siyanürat kompleksi

Oluşan melamin-siyanürat kompleksi (melamin kristalleri) renksiz monolitik prizma şeklindedir; suda ve organik çözümlerdeki çözünürlüğü 2,2 mg/L'tir. Melaminle (3,24 mg/L) karşılaştırıldığında bu değer melamin-siyanürat kompleksinin idrar yoluyla vücuttan atılması için oldukça düşük bir değerdir. Bu nedenle, bu melamin kristalleri idrarda bulunduğu zaman çok daha tehlikeli olan ve yüksek oranda çözünmeyen böbrek taşları oluşumuna yol açabilmektedir. Deney hayvanlarında yapılan araştırmalarda, melamine uzun süreli maruz kalınması durumunda böbrek taşı, epitel irritasyonu ve yangı oluşumlarının yanı sıra böbrek yetmezliği, idrar kesesi ve üreter kanseri gözlemlendiği bildirilmiştir. Ayrıca, hayvan çalışmaları sonucunda melaminin üreme üzerinde olumsuz etkilerinin olduğu belirlenmiştir (Brown ve diğer., 2007; Dobson ve diğer., 2008; Tyan ve diğer., 2009; Gossner ve diğer., 2009; Erkmen, 2010).

Melaminin zehirliliğine ilişkin ilk bulgular Amerika Birleşik Devletleri'nde 2007 yılında kedi ve köpeklerin böbrek yetmezliğine bağlı ani ölümleri üzerine yapılan araştırmalar sonucu ortaya konmuştur. Kedi ve köpek mamalarının içerisine konulmak üzere Çin'den ithal edilen buğday ve pirinç konsantrelerinde melamin



tespit edildiği ve ölümlerin buna bağlı olduğu bildirilmiştir (FDA, 2008). Böylece ticari olarak kullanımının dışında, melaminin kedi ve köpek mamalarına bulaştığını belirleyen veteriner hekimler, yüzlerce hayvanın ölmesi üzerine 2007’de tartışmanın odağı haline gelmişlerdir. Oysa bu raporlardan önce melaminin zehirli olmadığı veya çok az zehirli olduğu kabul edilmekteydi (Tyan ve diğer., 2009). Bu olaydan sonra bazı tahıl kaynaklı katkı maddelerine (örneğin; buğday unu, buğday gluteni, mısır unu ve pirinç protein konsantresi) toplam azot konsantrasyonunu arttırmak ve kedi-köpek ve çiftlik hayvanları yemlerinde görünür protein içeriğini fazla göstermek için bilinçli bir şekilde melamin katıldığı anlaşılmıştır (Muniz-Valencia ve diğer., 2008).

Melaminin toksisitesi, son yıllarda Çin’deki melamin içeren sütleri tüketen çocuklarda böbrek taşı oluşumunun gözlenmesiyle daha da dikkat çekici hale gelmiştir. 2008 yılında Çin’de 3 yaşından küçük çocuklarda böbrek taşı oluşumuna ilişkin salgın rapor edilmiştir (Hau, Kwan ve Li, 2009). Ayrıca, Çin Halk Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı’nın 2008 yılı verilerine göre bebek mamalarına katılan melaminden dolayı 294.000 çocukta idrar yollarında taş oluşumunun belirlendiği, bunlardan 51.900 bebeğin hastanede yoğun bakıma alındığı ve 6 bebeğin yaşamını kaybettiği bildirilmiştir (Gossner ve diğer., 2009; WHO, 2009). Bebeklerin üriner sisteminde lümen, tübüller ve kan damarlarının küçük olması, tübüller ve üriner sistem duvarlarının kolayca irrite olmasına ve oluşan böbrek taşları ile kolayca tıkanmasına yol açmaktadır (Melnick ve diğer., 1984). Çin’deki süt skandalının ardından yapılan geniş çaplı araştırmalarda bebek mamalarının yanı sıra; sütte, yoğurtta, süt tozlarında, tahıl ürünlerinde, donmuş tatlılarda, şekerlemelerde, kek ve bisküvilerde, protein tozları ve bazı işlenmiş gıdalarda da melamin bulunduğu bildirilmiştir (Gossner ve diğer., 2009).

#### ***1.1.1 Melaminin Maksimum Kalıntı Limitleri ve Tayin Yöntemleri***

Halk sağlığı ve gıda güvenliğini korumak için uluslararası sağlık organizasyonları tarafından birçok ülkede çeşitli gıda ürünlerine eklenen melamin içeriği için düzenlemeler yapılarak maksimum kalıntı limitleri (MKL) belirlenmiştir (FDA, 2008; EFSA, 2008; WHO, 2009;). Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (US FDA), Dünya

Sağlık Örgütü (WHO) ve Avrupa Birliği'ndeki birçok ülke tarafından belirlenen maksimum kalıntı limitleri (MKL) bebek mamalarında 1,0 mg/kg'a kadar, bunun haricindeki gıda veya yemlerde 2,5 mg/kg melamin olarak verilmektedir (Codex Alimentarius Commission, 2010; Sun ve diğer., 2010a). Bu limitler, bizim ülkemizde de Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği'ne göre melamin ve yapısal analoglarının maksimum kalıntı limitleri gıdalar için 2,5 mg/kg, bebek formülleri ve devam formüllerinin toz halde olanları için 1,0 mg/kg olarak verilmiştir (Türk Gıda Kodeksi, 2012) .

Melaminin gıda ürünlerine eklenmesine yönelik bazı yasadışı faaliyetler bulunmasından bu yana, yapılan bu tahşişin tayinine yönelik güvenilir, spesifik, yüksek duyarlıklı analitik yöntemlere ihtiyaç duyulmuştur (Wagers, Chui ve Adem, 2014). Bu amaçla, sütteki ve diğer gıda ürünlerindeki melaminin tayininde, kapiler elektroforez (CE), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), sıvı kromatografi-kütle spektrometri (LC-MS), sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometri (LC-MS/MS), gaz kromatografisi-kütle spektrometri (GC-MS), antijen-antibadi etkileşimleri, immunokromatografik analiz ve elektrokimyasal teknikler gibi analitik yöntemler kullanılmaktadır (Wang ve diğer., 2013; Zhu ve diğer., 2011). Ancak bu tekniklerin çoğu pahalı analitik cihazları, karmaşık numune hazırlama adımlarını, yoğun uçucu organik çözügen kullanımını, zaman alıcı tayin adımlarını gerektirir (Cao, Shen, Zhang ve Sun, 2014).

Bu nedenle, yukarıda yer alan çeşitli analitik cihazlar yardımıyla gerçekleştirilen analizler öncesinde gıdalar gibi kompleks matrislerden eser düzeyde bulunan analitlerin ekstrakte edilerek, ayrılması ve deriştirilmesi için örnek hazırlama işlemi önemli bir basamaktır.

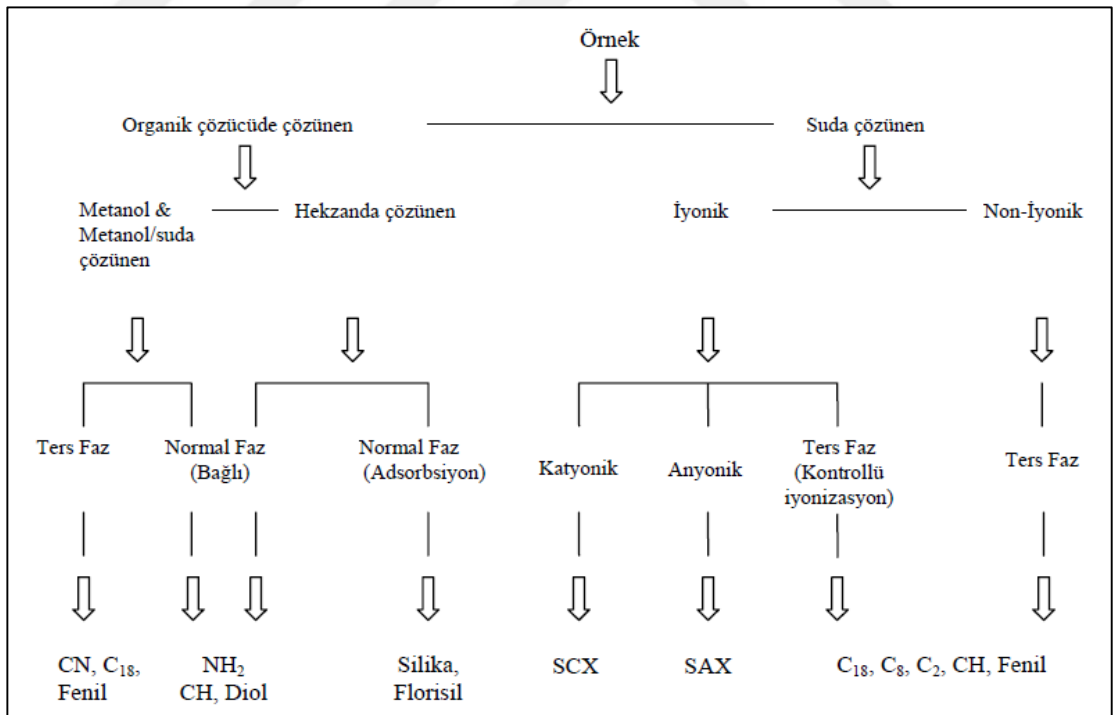
### ***1.1.2 Gıdalardaki Melaminin Tayini Öncesi Örnek Hazırlama***

Gıdalardaki örnek matriksinin son derece komplike olması nedeniyle, melaminin gıdalardaki analizi öncesi önışlem yapılması gerekli bir zorunluluktur. Gıda örnekleri, içeriğindeki proteinlerin, karbonhidratların ve yağların çokluğu nedeniyle

analizi zor olan ve genellikle kompleks matriksli numunelerdir. Kompleks matrikslerinden dolayı da, gıda örneklerindeki melaminin doğru tayini için etkili izolasyon ve ekstraksiyonu öncelikli olarak gereklidir.

Ekstraksiyon, önderiştirme ve türevlendirme gibi örnek hazırlama işlemlerinin temel amacı, analitlerin zenginleşmesini ya da algılanmasını etkileyebilecek matriks bileşenlerinin ortamdan uzaklaştırılmasıyla daha düşük dedeksiyon limitleri (LOD) elde edilebilmektedir (Yuan, Xu ve Peng, 2008). Ancak, matrikslerin karmaşıklığı nedeniyle, çoğu uzun süren örnek hazırlama prosedürleri adımlarının ardından ekstraksiyon gerektirir.

Analiz öncesi yapılacak olan numune hazırlama işlemlerinin çoğu, zor, zaman alıcı ve pahalı olabilmektedir. Kompleks matrikslerden analizi yapılacak maddelerin (analit) istenilen saflıkta ayrımının yapılarak, uygun bir örnek hazırlama basamağının gerçekleştirilmesi için doğru ayırım tekniğinin kullanılması çok önemlidir (Şekil 1.5).



Şekil 1.5 Analiz edilecek örneğin özelliğine göre seçilmesi gereken SPE ayırım tekniği (SCX: Güçlü katyon değiştirici; SAX: Güçlü anyon değiştirici). (<http://www.cobertassoc.com/xpertekspe.jpg>)

Numunenin özelliği örnek hazırlama işleminin seçiminde önemli bir faktör olmakla birlikte, sıklıkla kullanılmakta olan sıvı-sıvı ekstraksiyon (LLE) yöntemi, çok miktarda çözücüye gerek duyulması ve toksik özellikli bu çözücülerin çevre için zararlı olması, ekstraksiyon esnasında emülsiyon fazının oluşabilmesi, yüksek saflıkta ekstraktlar elde edilememesi ve kullanılan çözücülerin tam olarak uzaklaştırılamaması gibi istenmeyen durumların oluşumuna neden olabilir (Rosenfeld, 1999; Zief ve Kiser, 2005).

Katı faz ekstraksiyonu (SPE), karışmayan iki sıvı faz arasında çözünenin dağılımının gerçekleştiği sıvı-sıvı ekstraksiyonuna (LLE) benzer bir ekstraksiyon işlemidir. Ancak katı faz ekstraksiyonunda karışmayan iki sıvı yerine, bir katı faz (sorbent) ve bir sıvı faz (numune) arasındaki dağılım gerçekleşir. Katı faz ekstraksiyonu tekniği, sıvı numunenin analiti tutan bir sorbent (kolon, kartuş, disk vb.) içinden geçirilmesi ile tutulmuş olan analitin uygun bir çözücü ile yıkanması sonucunda, çözeltide bulunan analitin katı bir sorbent aracılığıyla saflaştırılması ve konsantre edilmesine dayanır (Camel, 2003).

Katı faz ekstraksiyonu (SPE), sıvı-sıvı ekstraksiyonuna alternatif bir yöntem olmakla birlikte diğer klasik örnek hazırlama teknikleriyle karşılaştırıldığında düşük maliyet, yüksek geri kazanım, hızlı faz ayrımı, düşük organik çözücü tüketimi gibi avantajları nedeniyle daha yaygın kullanılan bir numune hazırlama yöntemi haline gelmiştir (Wang ve diğer., 2015).

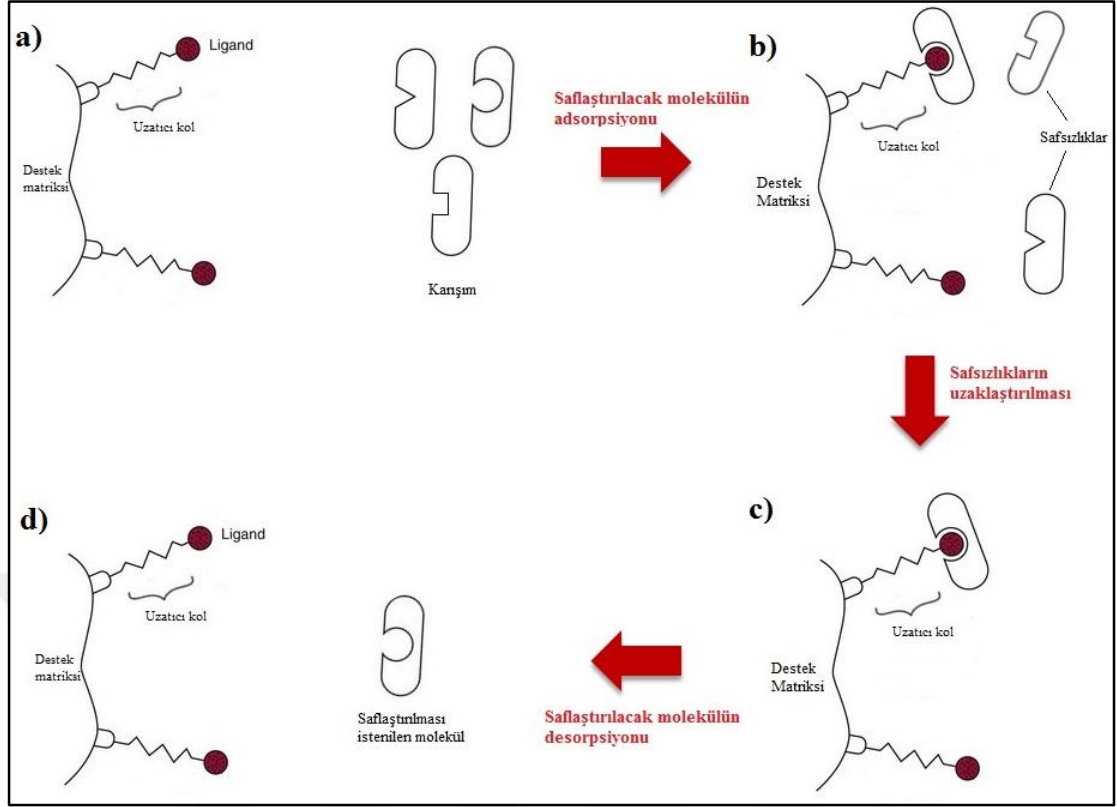
Silika jel, LiChroprep®, RP-2 tozu ve katyon değiştiriciler gibi çeşitli ticari katı faz sorbentleri günümüzde melaminin ekstraksiyonu amacıyla kullanılmaktadır (Wang ve diğer., 2015). Ancak, kompleks örneklerdeki safsızlıkları gidermek ve melaminini ekstrakte etmek için tek etkileşim mekanizmalı bu sorbentler yeterli gelmemektedir. Bu yüzden, karışık-mod mekanizmalı ticari sorbentler kullanılmaktadır (Deng ve diğer., 2010; Khedr, 2013). Bununla birlikte farklı moleküler tanıma mekanizmasına sahip moleküler baskılanmış polimerler, moleküler baskılanmış tabaka kaplı silika jel gibi sorbentler de geliştirilmiştir (He ve diğer., 2009; Yang ve diğer., 2009).

Son yıllarda ise gıda, serum gibi kompleks matrislerde eser düzeydeki analitlerin analizi öncesi ekstraksiyonunda katı faz sorbenti olarak afinite sorbentleri tercih edilmektedir.

## **1.2 Afinite Kromatografisi**

Biyolojik molekülerin ayrılması ve saflaştırılmasında fiziksel veya kimyasal özelliklerine dayalı olan geleneksel yöntemler (sıcaklık, tuz, iyonik şiddet, pH, çözücü ve polimerler ile çöktürülerek ayrılması vb.) zamanla yerini biyolojik özelliklerine dayalı olan ayırma yöntemlerine bırakmıştır (Zou, Luo ve Zhou, 2001).

Afinite kromatografisinin temel prensibi, Şekil 1.6'da gösterilen, saflaştırılması istenen biyolojik molekülün çözünmeyen bir destek materyali (sorbent) üzerine kovalent olarak immobilize edilmiş ve yüksek tanıma kapasitesine sahip bir ligand tarafından spesifik ve tersinir olarak adsorbe edilmesine dayanmaktadır (Wilchek ve Chaiken, 2000; Kumpalume ve Ghose, 2003). Oldukça yüksek spesifik 'moleküler tanıma' yeteneğine sahip olması nedeniyle, moleküler tanıma dayalı afinite kromatografisi olarak da adlandırılabilen bu yöntemle; proteinler, enzimler, hormonlar ve vitaminler gibi pek çok molekülün ayrılması ve saflaştırılması gerçekleştirilebilir (Hage, 2006).



Şekil 1.6 Afinite kromatografisinin şematik gösterimi a) Ligandın tersinmez olarak uzatıcı kol yardımıyla destek sorbentine bağlanması; b) Safleştirilacak molekülün seçici adsorpsiyonu; c) Safsızlıkların ortamdan uzaklaştırılması; d) Safleştirilmesi istenen destek sorbentinden ayrıştırılarak saflaştırılması

- ✓ Kullanılan ligandın seçici olması,
- ✓ Adsoplanan moleküllerin kolay elüe edilebilir olması,
- ✓ Kullanılan adsorbanın tekrar kullanılabilir olması,
- ✓ Kullanılan adsorbanın yapısal olarak kararlı olması ve kararlılığını uzun bir süre koruyabilir olması,
- ✓ Ekonomik olması

gibi unsurlar afinite kromatografisi sistemlerinde dikkat edilmesi gereken faktörlerdir. Bu parametrelerin arasında en önemlisi ise, ligandın hedef moleküle karşı gösterdiği seçiciliktir (Turkova, 2002).

Afinite kromatografisinin sahip olduğu yüksek seçicilik özelliğiyle, ideal ortam koşullarında analitlerin kompleks karışimlardan tek bir adımda hızlı ve çok yüksek bir verimle ekstrakte edilebilmesi ve saflaştırılabilmesi bu yöntemin diğer yöntemlere göre en büyük avantajıdır (Wilchek ve Chaiken, 2000).

### **1.2.1 Afinite Kromatografinin Bileşenleri**

#### **1.2.1.1 Afinite Sorbenti**

Afinite sistemlerinde dikkat edilmesi gereken ilk nokta sistemin başarısını etkileyen destek sorbentinin seçimidir. Bu nedenle destek sorbentinin, yüzeyine liganların tutunabilmesi için aşağıda verilen özelliklere uygun olması gerekir:

- Destek sorbenti, ideal ortam koşullarında çözünmez yapıda olmalı,
- Destek sorbenti, yüksek yüzey alanına sahip, uygun ve sağlam nitelikte partikül forumuna sahip olmalı,
- Destek sorbenti, yüzeyinde fonksiyonel gruplar (hidroksil, karboksil, amino gibi) içermeli,
- Destek sorbenti, hidrofilik ve nötral davranışa sahip olmalı,
- Destek sorbenti, iyi bir kimyasal, mekanik, biyolojik kararlığa sahip olup ayrıca sıcaklığa karşı da dayanıklılık göstermeli ve kimyasal reaksiyonlarla trevlendirilebilir olmalıdır (Wilchek ve Chaiken, 2000).

Kromatografik uygulamalarda agaroz, dekstran, selüloz ve türevleri, kitosan gibi polisakkaritler vb. gibi doğal veya poliakrilamid, poliakrilat türevleri gibi polimerik yapılar ile silika gibi anorganik özellikteki yapılar sentetik materyaller destek sorbenti olarak kullanılabilir (Tablo 1.1) (Lowe ve Pearson, 1984). Ancak, agaroz ve dekstran gibi doğal polimerlerin zayıf mekanik özellik göstermelerinin yanısıra yüksek basınç ve akış altında da dayanıksız olmaları, bir diğer destek sorbenti silikanın ise, u pH değerlerinde kararlılığını koruyamaması ve kolonların yıkanması esnasında kullanılan alkali çözeltilere dayanıksız olması bu matrikslerin

kromatografik çalışmalardaki kullanımlarını sınırlandırmaktadır (Wu, Zhu ve Jia, 2006). Bununla beraber, hazırlanmaları esnasında kontrol edilebilir yapısal özellikler sergilemeleri, yüksek mekaniksel ve kimyasal kararlılığa sahip olmaları nedeniyle sentetik polimerik destek sorbentleri, kromatografik çalışmalarda ilgi çekici hale gelmiştir (Kráčalíková, Tishchenko ve Bleha, 2006).

Tablo 1.1 Afinite kromatografisinde kullanılan bazı sorbentler

| <b>Afinite Sorbentleri</b> | <b>Doğal Polimerler</b> | <b>Sentetik Polimerler</b> |
|----------------------------|-------------------------|----------------------------|
|                            | Agaroz                  | Poliakrilamid              |
|                            | Silika                  | Poliamid                   |
|                            | Selüloz                 | Poliakrilat                |
|                            | Kitosan                 | Metakrilat türevleri       |

#### 1.2.1.2 Afinite Ligandı

Afinite kromatografisinde gerçekleşecek olan ayırımın başarısını etkileyen en önemli faktörlerden biri de afinite matrisine bağlanan ligandın afiniteye uygun bir şekilde seçilmesidir. Saflaştırılması istenen biyolojik moleküle (hedef molekül) özgün bağlanma yeteneği sergileyen moleküle ligand denilmektedir (Ming ve Howell, 1991; Zeng ve Ruckenstein, 1999). Afinite sistemlerindeki ayırmalarda kullanılacak olan ligandın sahip olması gereken iki önemli özellik vardır. Bunlardan ilki, ideal koşullar altında matrik üzerine tutunmuş olan ligandın hedef moleküle spesifik ve tersinir bir kompleks oluşturabilir olması; diğeri ise, destek sorbentine de bağlanmasına imkan sağlayacak fonksiyonel gruplar içermesidir (Klein, 1991). Bu iki koşulu da sağlayan pek çok ligand olup afinite kromatografisinde kullanılan bazı ligandlar Tablo 1.2’de belirtilmiştir (Hage ve Clarke, 2004).



Tablo 1.2 Afinite kromatografisinde kullanılan bazı ligandlar

| Ligand Çeşidi                                          | Tutulan Bileşik                                                     |
|--------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| ✓ <i>Yüksek spesifikteki (mono-spesifik) ligandlar</i> |                                                                     |
| Antikorlar                                             | İlaçlar, hormonlar, peptitler, proteinler, virüsler                 |
| Enzim inhibitörleri ve kofaktörler                     | Enzimler                                                            |
| Nükleik asitler                                        | Tamamlayıcı nükleik asit zincirleri, DNA/RNA'ya bağlanan proteinler |
| ✓ <i>Genel (grup-spesifik) ligandlar</i>               |                                                                     |
| Lektinler                                              | Sekerler, polisakkaritler, glikoproteinler, glikolipidler           |
| Boronatlar                                             | Katesoller, polisakkaritler, glikoproteinler                        |
| Sentetik boyalar                                       | Dehidrogenazlar, kinazlar                                           |
| Metal şelatlar                                         | Metal bağlayıcı aminoasitler, peptitler, proteinler                 |

Bu ligandlarının çoğunun biyolojik kökenli olmasına karşın, ayrılma işleminde kullanılan doğal veya sentetik olmak üzere kullanılan bazı moleküller de mevcuttur. Kökenine bakılmaksızın bu moleküller yüksek spesifik özellikli (mono-spesifik) ve genel amaçlı (grup-spesifik) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Yüksek spesifite gösteren ligandlar (mono-spesifik) bir veya birkaç yakın özelliğe sahip olan bileşiklere bağlanarak spesifik bir bileşiğin ayrımını sağlarken; genel amaçlı kullanılan ligandlar (grup-spesifik) ise birbiriyle ilişkili bir sınıf moleküle bağlanarak yapısal olarak birbirine benzer moleküllerin bulunduğu gruptaki bileşiklerin ayrımını sağlamaktadır (Hage, 1999; Hage ve Clarke, 2004).

#### 1.2.1.3 Uzatıcı Kol

Destek sorbentindeki reseptör, kimyasal bir antijen yada enzim kofaktörleri gibi ligandın küçük olduğu afinite kromatografisi sistemlerinde; saflaştırılacak olan molekülün (hedef molekül), liganda doğrudan bağlanması esnasında sorbent ile hedef molekül arasında sterik engellerden dolayı molekülün bağlanması konusunda

sorun meydana gelebilir (Charcosset, 1998). Bu sorunu gidermek ve bağlanma verimini arttırmak için ligand bağlanmadan önce destek sorbenti ile ligand arasına uygun bir uzatıcı kol takılır (Magdeldin ve Moser, 2012). Uzatıcı kol adı verilen bu materyaller, sorbent ile ligand arasındaki etkin bağlanmayı sağlayan maddelerdir ve bu materyallerin uzunluğu kritik öneme sahiptir (Charcosset, 1998).

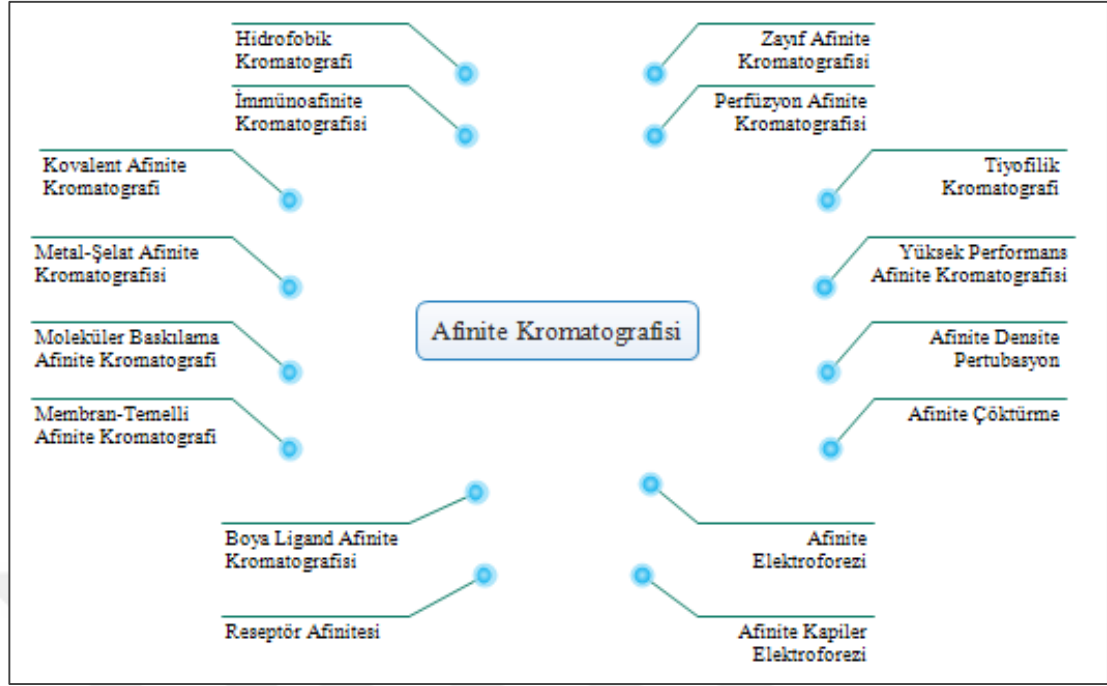
İdeal bir uzatıcı kol;

- En az üç atomlu olmak üzere uygun uzunlukta olmalı,
- Destek sorbenti ile hedef molekül arasında non-spesifik adsorpsiyona neden olmamalı,
- Kol üzerindeki fonksiyonel gruplar hem ligand hem de hedef molekül ile etkileşime girebilmelidir (Zou, Luo ve Zhou, 2001).

Eğer uzatıcı kol gereğinden kısa olursa, sterik engellerden dolayı ligand ile hedef molekül arasındaki bağlanma sorunu yaşanır ve kol etkisiz kalarak bağlanma verimi düşer. Gereğinden uzun olduğu durumda ise, kol üzerinde istenmeyen moleküller bağlanır ve non-spesik etkileşimler artar. Bunun sonucunda da ayırmanın seçiciliği azalır ve sorbentin saflaştırma derecesinde düşüş gözlenir (Ocarra, Barry ve Griffin, 1974; Arslan, 2001).

### ***1.2.2. Afinite Kromatografisinin Alt Dalları***

Afinite kromatografisinin geniş bir alanda kullanılması sebebiyle bu kromatografinin farklı yaklaşımlar sonucu türevlendirilmesiyle birçok afinite teknikleri ortaya çıkmıştır ve bu tekniklerden bazıları aşağıdaki Şekil 1.7’de verilmiştir.



Şekil 1.7 Afinite kromatografisinin alt dalları

### 1.3 İmmobilize Metal Şelat Afinite Kromatografisi (İMAK)

İmmobilize metal şelat afinite kromatografisinin (İMAK) başlangıcı, biyolojik molekülerin (aminoasitler, proteinler, nükleik asitler, peptitler vb.) ayrılmasında kullanılmak üzere immobilize metal-şelat komplekslerinden yararlanılma fikrinin ortaya çıktığı 1960'lı yılların başlarına kadar uzanmaktadır (Goldstein, 1967). Daha sonraları biyolojik moleküllerin saflaştırılmasında ligand değişimini de içine alan metal-şelat etkileşim kromatografisini bütün yönleriyle ele alan 'immobilize metal şelat afinite kromatografisi' terimi Porath ve arkadaşları tarafından ortaya konulmuştur. Bu yöntem, biyolojik moleküller ile metal iyonları arasında şelat oluşması esasına dayandığından 'metal-iyon etkileşim kromatografisi' olarak da adlandırılabilir (Porath, Carlsson, Olsson ve Belfrage, 1975).

İmmobilize metal şelat afinite kromatografisinin diğer yöntemlere göre birçok üstünlüğü söz konusudur (Tablo 1.3).

Tablo 1.3 Farklı kromatografik tekniklerin karşılaştırılması

| Özellikler       | Kromatografik Teknikler |             |            |             |
|------------------|-------------------------|-------------|------------|-------------|
|                  | İMAK                    | Afinite     | IEC        | HIC         |
| Kapasite         | Yüksek                  | Düşük       | Yüksek     | Yüksek-Orta |
| Yeniden kullanım | Yüksek                  | Orta        | Yüksek     | Orta        |
| Yükleme          | Yüksek-Orta             | Orta        | Orta       | Orta        |
| Elüsyon          | Yüksek                  | Zor         | Yüksek     | Yüksek      |
| Seçicilik        | Yüksek                  | Yüksek      | Düşük-Orta | Düşük-Orta  |
| Maliyet          | Düşük                   | Yüksek-Orta | Düşük      | Düşük       |

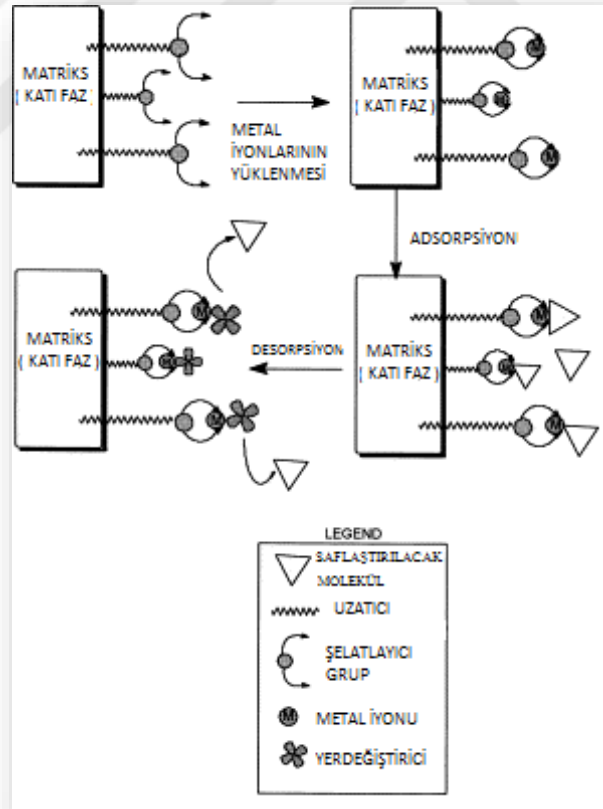
İMAK'ın diğer kromatografik yöntemlere göre sağladığı avantajlardan bazıları aşağıdaki şekilde sıralanabilir:

- diğer afinite sorbentlerine göre yüksek ligand kararlılığı,
- yüksek oranda analit yükleme kapasitesi,
- yıkama şartlarının uygunluğu ve rejenerasyonu,
- düşük maliyetli olması,
- geniş ölçekli saflaştırmalar için kullanılabilir olması (Comiskey, Albert, Yoshizawa ve Jacobsan, 1998; Chaga, 2001)

İmmobilize metal şelat afinite kromatografisinde biyolojik moleküllerin adsorpsiyonu, bu molekülün yüzeyindeki elektron verici gruplar ile immobilize edilmiş metal iyonu arasındaki tersinir koordinasyon kompleksi oluşumuna dayanmaktadır (Gaberc-Porekar ve Menartr, 2001; Chaga, 2001). Metal bağlayıcı gruplara eşdeğerlikli bir şekilde konulan destek matriksiyle İMAK'ın uygulaması gerçekleştirilir (Şekil 1.8). İMAK'daki ayırım işlemi, Lewis asidi olarak davranan (yani elektron çifti alıcısı) bir metal iyonu (örneğin  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  ve  $\text{Fe}^{2+}$  gibi geçiş metal iyonları) ile hedef molekülün yüzeyindeki elektron verici gruplar (N, S ve O) arasındaki etkileşim vasıtasıyla gerçekleşmektedir (Sulkowski, 1989; Arnold, 1991). Bu etkileşimdeki hedef molekül ile metal arasındaki bağ kuvveti, bağlanan hedef molekülün ilgisine göre farklılık gösterir (Kagedal, 2011). Bu farklılıklar Pearson tarafından ortaya konulan sert-yumuşak asit ve baz teorisiyle açıklanabilir. Bu teoriye göre, iki atom arasında bir bağ oluşacağı zaman, bu atomlardan biri Lewis asidi olarak davranırken, diğeri de Lewis bazı olarak davranır. Bu bağın kuvvetini,

atomları içeren ‘yumuşaklık’ veya ‘sertlik’ sınıflaması belirler.  $Ag^+$ ,  $Cu^+$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  metal iyonları yumuşak Lewis asitleri olarak sınıflandırılırken,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ , ve  $Fe^{3+}$  gibi metal iyonları sert Lewis asitleri olarak ayrılır.  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  ve  $Co^{2+}$  gibi metal iyonları ise sınır metal iyonları olarak yer alır (Pearson, 1968).

Kromatografik destek matriksine bağlanan şelat oluşturucu bileşiklerdeki elektron verici atomların (N, S ve O) metal ile oluşturduğu koordinasyon sayısına bağlı olarak, bidentat, tridentat, tetradentat, pentadentat vb. metal şelatları oluşabilir ve geriye kalan koordinasyon bölgeleri su molekülleri tarafından işgal edilmiştir. Hedef molekül üzerindeki uygun olan elektron verici gruplar ile yer değiştirmesi sonucunda da molekül matrikse bağlanır (Prasanna ve Vijayalakshmi, 2010).



Şekil 1.8 İMAK yöntemiyle saflaştırılacak olan molekülün adsorpsiyon ve desopsiyonu içeren mekanizmaların diyagramı (Ueda, Gout ve Morganti, 2003)

### **1.3.1 İMAK İçin İdeal Kromatografik Destek Sorbentleri**

İMAK’da kullanılan çok çeşitli destek sorbentleri geliştirilmiştir. Geleneksel matriksler (agaroz, dekstrin ve selüloz gibi) yüksek afinite gösteren sorbentler olup düşük mekanik kararlılığa sahiptirler. Öte yandan sentetik sorbentler (silika, metakrilat türevleri gibi) yüksek mekanik özelliklere sahiptir ve yeni sorbentlerin hazırlanmasında son derece elverişlilerdir (Belew ve Porath, 1990). İMAK için uygun olabilecek bazı polimerik destek sorbentleri aşağıdaki yer alan niteliklerde olmalıdır:

- Kolay türevine dönüştürülebilmek,
- Spesifik olmayan adsorpsiyon sergilememek,
- Farklı şartlar altında iyi fiziksel, mekanik ve kimyasal dayanıklılık sergilemek,
- Kolay ligand erişimi sağlamak için yüksek gözenekliliğe sahip olmak,
- Yüksek akış hızlarında kullanılabilir olmak,
- Denatüre özellikte olanlar dahil eluentlere dayanıklı olmak,
- Herhangi bir dejenerasyona uğramadan matriksin kolayca yenilenmesine izin vermek,
- Kromatografi süreci boyunca sabit hacimli (küçülme ya da büyüme olmaksızın) dayanıklı bir yatak sağlamak (Kamihira, Kaul ve Mattiasson, 1992).

Gıdalardaki melamin miktarının tayini ulusal ve uluslararası boyutta önem taşıması nedeniyle bu çalışmada, melaminin sıvı kromatografisi ile tayini öncesi ekstraksiyonunda kullanılmak amacıyla yapılan çalışmalara literatürde rastlanmamış, ucuz, çevre dostu ve seçiciliği yüksek hidrojel yapılı bir İMAK temelli afinite sorbentinin geliştirilmesi ve adsorpsiyon yoluyla melaminin ekstraksiyonunda kullanılması hedeflenmiştir.

#### 1.4 Literatür Özeti

Xia ve diğerleri, yumurta örneklerinden melaminin tayini için gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) ve ultra-performans sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometresi (UPLC-MS/MS) temelli yöntem geliştirilerek validasyonu yapılmıştır. Yumurta örneklerindeki proteinlerin çöktürülmesi ve ekstraksiyon amacıyla trikloroasetik asit çözeltisi kullanılmıştır. Sulu ekstraktlar (süpernatant), karışık-mod mekanizmalı ters faz/güçlü katyon değiştirici ticari kartuşa (Oasis MCX) yüklenmiştir. Bu kartuştan melamin %5 amonyum içeren metanol çözeltisiyle elüsyonu yapılmıştır. Örneklerden melamin ortalama geri kazanım oranı % 85,2 ile % 103,2 arasında değişmektedir. Tayin limitleri GC-MS için 10 µg/kg, UPLC-MS/MS için 5 µg/kg'dır (Xia ve diğer., 2009).

Braekevelt ve diğerleri, Kanada'da satılan bebek maması örneklerinden melamin ve analoglarının tayini amacıyla sıvı kromatografi-kütle spektrometri (LC-MS) temelli izotop seyreltme yöntemi geliştirmişlerdir. Bebek maması örnekleri önce asetonitril-su (1:1) çözeltisi ile ekstrakte edilmiş daha sonra karışık-mod mekanizmalı iyon değişimli/ters faz katı faz ekstraksiyon kartuşları (Oasis MAX ve Oasis MCX) ile saflaştırılmıştır. Bebek mamalarının tamamına yakınında melamin tespit edilmiş olup bulunduğu en yüksek konsantrasyon değeri 0,32 mg/kg'dır (Braekevelt ve diğer., 2011).

Zhao ve diğerleri, gıda maddelerinde melamin ve siyanürik asidin eşzamanlı tayini için katı faz ekstraksiyonu-sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS) temelli bir yöntem geliştirmişlerdir. Melamin ve siyanürik asit kalıntıları, asetonitril ve su ile ekstre edilmiş ve hekzan ile yağdan arındırılmıştır. Ekstraktlar, hidrofilik fonksiyonel silika jel sorbent ve katyon değiştirici reçineye sahip bir karışık-modlu bir katı faz ekstraksiyon kolonu (MCT) temizlenmiştir. Melamin ve siyanürik asit için doğrusallık 10-2500 µg/L aralığında ve korelasyon katsayısı 0,99'dan büyüktür. Melamin ve siyanürik asidin hayvansal kaynaklı gıdalar, bitkisel kaynaklı gıdalar, süt ve süt ürünlerine eklenmesiyle elde edilen geri

kazanım oranları melamin için %70,0-129,6, siyanürik asit için %70,0-128,6 aralığındadır (Zhao, Deng, Yi ve Wu, 2012).

Pan ve diğerleri, süt ve süt ürünlerinden melamin ve analogu olan siyanürik asitin eşzamanlı tayinini gerçekleştirmişlerdir. Örnekler asetonitril/su karışımı kullanılarak ekstrakte edilmiş ve grafit karbon/karışık-mod mekanizmalı güçlü katyon değiştirici kartuş (CARB/SCX) ile saflaştırılmıştır. Örneklerin geri kazanım oranları %80,8 ile %101,5 aralığında değişmektedir. Tayin limitleri siyanürik asit için 0,025 mg/kg, melamin için 0,01 mg/kg'dır. Sonuçlar, numunenin ön-hazırlanması için CARB/SCX karışık katı faz ekstraksiyon kartuşlarının kullanılabileceğini göstermektedir (Pan ve diğer., 2013).

Ge ve diğerleri, ot ve yenilebilir bitkilerde melamin ve analogu olan siromazin tayini amacıyla ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC-DAD) kullanılmıştır. Üç farklı konsantrasyon değeri için geri kazanım değerleri %96,2 ile %107,1 aralığındadır. Örnekler pH:3 olan su (trifloroasetik asit kullanılarak) ile ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon sonrası örnekler, ProElut™ PXC SPE kartuştan 1 ml/dk akış hızıyla geçirilmiştir. Kartuş 0,1 mol/L hidroklorik asit (HCl) ile yıkandıktan sonra %25'lik amonyak-methanol (1:20, v/v) ile analitler elüe edilmiştir. Tespit limiti siromazin için 2,15 µg/kg, melamin için 2,51 µg/kg'dır (Ge, Wu, Liang ve Sun, 2014).

Sun ve diğerleri, sütteki melaminin tayini için yeni bir katı faz ekstraksiyon-kapiler elektroforez (SPE-CE) yöntemi geliştirilmiştir. Proteinlerin çöktürülmesi ve analitin ekstraksiyonu amacıyla %1'lik trifloroasetik asit ve %2,2'lik kurşun asetat çözeltileri kullanılmıştır. Örnekler, Cleanert PCX SPE kartuş kolondan geçirilerek temizlenmiştir. Doğrusallık 0,8-100 µg/mL aralığındadır ve korelasyon katsayısı 0,9988'dir. Optimum koşullar altında, metodun tespit limiti ve tayin limiti sırasıyla 0,12 ve 0,37 mg/kg olarak bulunmuştur. Farklı süt örneklerindeki melaminin geri kazanım oranı %89,5-98,5 aralığındadır. (Sun, Liu, Wang ve He, 2010b)



Li ve diğerleri, süt ve bebek mamalarından melaminin tayini için HPLC-UV sisteminde mevcut C<sub>18</sub> kolonla birlikte Acclaim® karışık mod mekanızmalı WCX-1 kolon kullanarak yöntem geliştirmişlerdir. Örneklerin bir kısmı %1'lik trikloroasetik asit/asetonitril kalanı %3'lük asetik asit ilave edilerek ekstrakte edilmiştir. HPLC'deki analiz öncesinde aktive edilmiş güçlü katyon değiştirici kartuş (SCX SPE) ile saflaştırılmıştır (Li, Luo, Xu ve Lefferts, 2009).

Cheng ve diğerleri, melaminin tayini için silika jel moleküler baskılanmış polimer için destek görevi görmüştür ve melamin için yüksek seçicilik gösteren moleküler baskılanmış silika jel (MIP @ SiO<sub>2</sub>) hazırlanmıştır. Karşılaştırma yapmak amacıyla aynı zamanda moleküler baskılanmamış polimer (NIP) de hazırlanmıştır. Elde edilen polimerlerin karakterizasyon ve performans testleri sonrasında MIP @ SiO<sub>2</sub> polimerinin sadece NIP @ SiO<sub>2</sub> polimeri ile karşılaştırıldığında melamin kalıp molekülüne yüksek seçicilik göstermekle kalmadığı, aynı zamanda silika jelin yüzeyindeki moleküler tanıma bölgeleri nedeniyle MIP'in üstün emme kapasitesi gösterdiği belirlenmiştir. Süt örneklerinden melaminin tayinine yönelik katı faz sorbenti olarak MIP @ SiO<sub>2</sub> kullanıldığında, melamin ilave edilmiş örneklerden geri kazanım oranı %75,6-96,8 aralığındadır (Cheng, Liu ve Wang, 2013).

Qi ve diğerleri, süttten melaminin tayininde sorbent olarak kullanılmak amacıyla manyetik moleküler baskılanmış polimer (MMIP) geliştirmişlerdir. MMIP sentezinde, kalıp molekül olarak melamin (MEL), fonksiyonel monomer olarak metakrilik asit (MAA) ve manyetik destek olarak Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> @ SiO<sub>2</sub> mikroküreleri kullanılmıştır. Polimerin karakterizasyonu sonrası, moleküler baskılanmış polimerin yüzeyinin modifiye edilen Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanomateryal ile başarılı bir şekilde kaplandığı gözlenmiştir. Melamin için dedeksiyon limitleri 0,15-3,00 µg/mL aralığında olup, sütteki eser miktardaki melaminin analizini karşılayabilecek düzeydedir. Gerçek örneklerden melamin ekstraksiyonu sonucunda geri kazanım oranları %85,6-104,2 aralığındadır (Qi, Li, Wei, Zhao ve Gong, 2016).

Wang ve diğerleri, bebek maması örneklerinden melaminin tayini için aktive edilmiş atapulgitin sorbent olarak kullanılması ile katı faz ekstraksiyon (SPE)

yaklaşımı başarıyla gerçekleştirilmiştir. Örnek çözücüsü, elüsyon çözücüsü, örnek yükleme hacmi gibi ekstraksiyon verimliliğini etkileyen bazı parametreler araştırılmıştır. Optimum ekstraksiyon koşulları altında, örnek yükleme hacmi 200 mL'ye çıkarılmıştır ve melamin adsorpsiyon kapasitesi 1154 µg/g'ye yükselmiştir. Tespit limiti ve tayin limiti sırasıyla 0,15 ve 0,50 ng/mL olarak bulunmuştur. Dört farklı çeşit bebek mamasına üç farklı konsantrasyon seviyesinde eklenen melaminin geri kazanım oranı %83,5 ile %111,0 aralığında değişmektedir (Wang ve diğer., 2016).

Liang ve diğerleri, süt örneklerinden melaminin tayininde kullanılmak üzere kalıp molekül olarak melamin (MEL), fonksiyonel monomer olarak metakrilik asit (MAA) ve çarpaz bağlayıcı olarak etilenglikol dimetakrilat (EGDMA) kullanarak moleküler baskılanmaya dayalı potansiyometrik sensör için polimerik membran iyon seçici elektrot hazırlanmıştır. Membran elektrotu  $5,0 \times 10^{-6}$  ila  $1,0 \times 10^{-2}$  mol/L konsantrasyon aralığında protonlanmış melamine yanıt göstermiştir. Ayrıca, membran elektrot ~16 s'lik kısa bir yanıt süresi sergilemekte ve 2 aydan daha uzun süre stabil olabilmektedir. Akış analiz sistemi ile birlikte, potansiyometrik sensör, süt örneklerinde melamin tayini için başarıyla uygulanmıştır (Liang, Zhang ve Qin, 2009).

Zhang ve diğerleri, süt örneklerinden melamin ve kromazinin tayini amacıyla yüzey başlatıcılı atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP) yoluyla kuvvetli kation-değiştirici sınırlı erişim materyali sentezlemişlerdir. Sentezde önce silika üzerine yüzey başlatıcılı ATRP yöntemiyle poli (3-sülfopropil metakrilat-co-etilen dimetakrilat) [p(SPM/EDMA)] graft edilmiştir. Daha sonra, dış yüzeyine poli(gliserol mono-metakrilat) [pGMMA] immobilize edilerek Sil-g-p(SPM/EDMA)-g-pGMMA hazırlanmıştır. Hazırlanan Sil-g-p(SPM/EDMA)-g-pGMMA, online katı faz ekstraksiyonu (SPE) /HPLC metodu kullanılarak sığır sütünde melamin ve kromazin tayini ile incelenmiştir. Yapılan çalışmada, sığır sütü örnekleri Sil-g-p(SPM/EDMA)-g-pGMMA ile ön muamele yapılmış ve analitik kolon olarak bir HILIC kolonu çalışılmıştır. Kullanılan yöntem iyi doğruluk, hassasiyet ve düşük tayin limitleri göstermiştir. Sonuç olarak, doğrudan HPLC

enjeksiyonu ile biyolojik numunelerden katyon ekstraksiyonu için Sil-g-p (SPM / EDMA)-g-pGMA'nın kullanılabileceğini göstermiştir (Zhang ve diğer., 2014).

Peng ve diğerleri, süt ürünlerinde ve yumurtada melaminin saflaştırılması ve zenginleştirilmesi amacıyla poli (2-akrilamido-2-metil-1-propansülfonikasit-co-etilen dimetakrilat) monolit sorbent kullanılmıştır. Optimum koşullar altında, süt ürünlerine ve yumurtaya eklenen farklı melamin konsantrasyon seviyesinde eklenen melaminin geri kazanım oranı %87-95,5 arasında değişmektedir ve RSD değerleri ise, %6,4'ün altındadır. Dedeksiyon limitleri süt ürünlerinde ve yumurtada sırasıyla 0,024 ve 0,018 mg/kg'dır (Peng, Shi ve Feng, 2011).

Huang ve diğerleri, eser miktarda bulunan melamin ve yan ürünlerinin tayini için (ammelid, ammelid ve siyanürik asit) kapiler elektrokromatografi (CEC-UV ve CEC-MS) yöntemi geliştirmiştir. Divinilbenzen (DVB), vinilbenzil trimetilamonyum klorür (VBTA) ve farklı alken monomerler (örneğin 1-okten, 1-dodesen veya 1-oktadesen) ile basit in situ polimerizasyon ile hazırlanan bir dizi poli (divinil benzen-alken-vinilbenzil trimetilamonyum klorür) monolitik kolonlar kullanılmıştır; ancak ayrılmanın en iyi olduğu poli (DVB-1-dodecene-VBTA) monolit ayırma kolonu ile çalışılmıştır. Dört farklı melamin türevi için CEC-UV yöntemiyle süt tozu örnekleri için dedeksiyon limitlerinin 0,6-2,18 µg/L aralığında olduğu belirlenmiştir. CEC-MS yönteminde ise, dedeksiyon limitleri 2,2-19,4 µg/L'dir (Huang ve diğer., 2012).

He ve diğerleri, sütlerdeki melamini tayini için sorbent olarak manyetik moleküler baskılanmış polimer (MMIP) polimer geliştirmiştir. MMIP sorbenti, kalıp molekül olarak melamin (MEL), fonksiyonel monomer olarak metakrilik asit (MAA), etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) ve manyetik bileşen olarak Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> manyetit kullanılarak hazırlanmıştır. Deneysel sonuçlar, MMIP'nin melamine karşı yüksek afinite ve seçiciliğe sahip olduğunu göstermiştir. Melamin için tespit limiti 2,6 ng/mL'dir. Gün içi ve günler arası bağıl standart sapma değerleri % 4,3-7,2 aralığında değişmektedir (He ve diğer., 2014).

Hu ve diğerleri, sütlerdeki melaminin beirlenmesi için moleküler baskılanmış polimer ve yüzey arttırılmış Raman spektroskopisini (MIPs-SERS) birleştiren yeni bir biyosensör tasarlamışlardır. MIP'ler, melamin (kalıp), metakrilik asit (fonksiyonel monomer), etilen glikol dimetakrilat (çapraz bağlayıcı ajan) ve 2,2'-azobisisobütironitril (başlatıcı) yığınlı polimerizasyonu ile sentezlenmiştir. Statik ve kinetik adsorpsiyon testleri, süttten melaminin verimli bir şekilde ayrılması ve zenginleştirilmesi için MIP'lerin geçerliliğini doğrulamıştır. Tespit limiti ve tayin limiti sırasıyla 0.012 ve 0.039 mmol/L olarak bulunmuştur (Hu ve diğer., 2015).

### 1.5 Çalışmanın Amacı

Bu çalışma ile analitlerin metal iyonlarına karşı ilgilerinden yararlanılarak seçici adsorpsiyon sağlayan immobilize metal şelat afinite kromatografisi (İMAK) esaslı yeni nesil afinite sorbenti geliştirilecektir. Bu hedef doğrultusunda çalışmanın kapsamı aşağıdaki işlem basamaklarında verilmiştir:

1. Melaminin uzaklaştırılması ve tayini amacıyla kullanılmak üzere kitosan (CTS), 2-hidroksietil metakrilat p(HEMA) ve çapraz bağlayıcı olarak etilenglikol dimetakrilat (EGDMA) kullanılarak CTS-p(HEMA) katı faz sorbenti radikalik polimerizasyon yoluyla sentezlenmiştir. Daha sonra  $\text{Cu}^{2+}$  iyonları CTS-p(HEMA) sorbenti üzerine şelatlanarak CTS-p(HEMA)- $\text{Cu}^{2+}$  yapısındaki İMAK sorbenti hazırlanmıştır.
2. Hazırlanan CTS-p(HEMA)- $\text{Cu}^{2+}$  İMAK sorbenti, fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (FTIR), atomik absorpsiyon spektroskopisi (AAS), taramalı elektron mikroskobu (SEM), termogravimetrik analiz (TGA) ve şişme testi ile karakterize edilmiştir.
3. CTS-p(HEMA)- $\text{Cu}^{2+}$  İMAK sorbenti üzerine melaminin adsorpsiyon koşullarının optimizasyonu amacıyla sorbent miktarı, başlangıç melamin derişimi, süre, pH, sıcaklık gibi melamin adsorpsiyonunu etkileyebilecek parametrelerin adsorpsiyona etkisi incelenmiştir.

4. Adsorplanan melaminin desorpsiyon işlemi için uygun desorpsiyon ajanı belirlenmiş ve sorbentin tekrar kullanılabilirliği incelenmiştir.
5. Hazırlanan CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> İMAK sorbentinin, süt ve bebek maması gibi süt ürünlerinden melaminin HPLC ile analizi öncesi ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir.



## **BÖLÜM İKİ**

### **MATERYAL VE METOT**

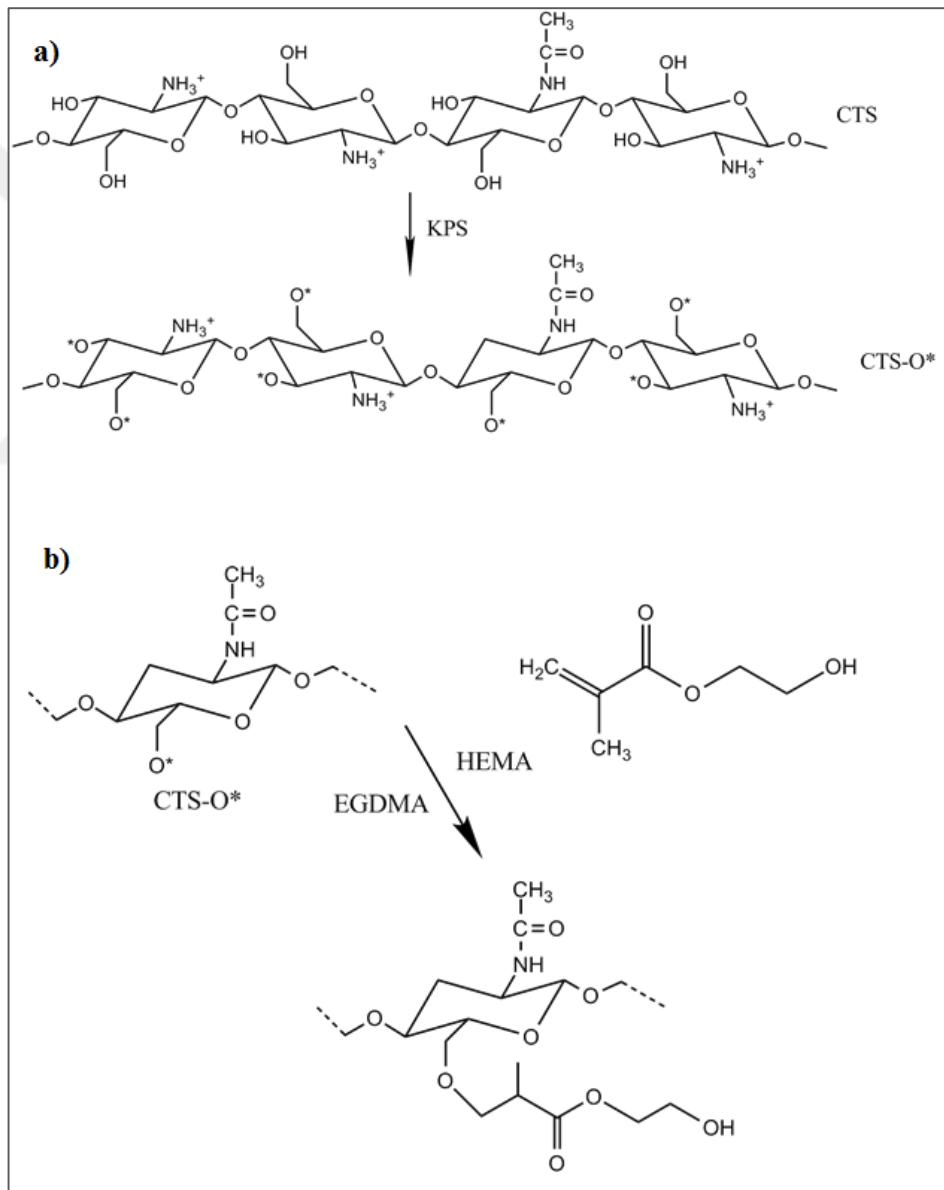
#### **2.1 Reaktifler**

Melamin (MEL, %99 saflıkta) ve amonyum klorür (%99,5 saflıkta) Alfa Aesar (Karlsruhe, Almanya) firmasından temin edilmiştir. Kitosan (CTS, orta molekül ağırlıklı, %75-85 deasetilasyon derecesine sahip), etilenglikol dimetakrilat (EGDMA, %98 saflıkta), asetronitril (ACN, HPLC saflıkta) sodyum hidroksit (pellet, %99 analik saflıkta) Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. 2-hidroksietil metakrilat (HEMA, %97 saflıkta) Fluka firmasından temin edilmiştir. Potasyum peroksidisülfat (KPS) ve bakır (II) nitrat trihidrat ( $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) analitik saflıkta olup Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir. Kullanılan diğer tüm kimyasallar analitik saflıktadır. Denemelerde kullanılan su, Millipore ultra saf su cihazı [Millipore Corporation (France) Elix 5 ® Reverse Osmos ünitesi, elektroiyonizasyon (E.D.I) modülü Elix 5 ® Water Purification System), organik/kolloid uzaklaştırıcı iyon değişim sistemi] ile üretilmiştir.

#### **2.2 Kitosan-Poli(2-hidroksietilmetakrilat) [CTS-p(HEMA)] Sorbentinin Sentezi**

1 g kitosan (CTS) 100 mL'lik iki boyunlu balonda 60°C'de 30 mL %1'lik asetik asit çözeltisi ile yaklaşık 6 saat magnetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Daha sonra 60°C'de 30 dakika boyunca reflux sistemi altında azot geçirilerek karıştırılmaya devam edilmiş ve bu sürenin sonunda 0,1 g potasyum peroksidisülfat (KPS) ilave edilerek 15 dakika boyunca karıştırılarak kitosan radikalik hale gelmesi sağlanmıştır. Başka bir yerde, 0,05 mL EGDMA ve 5 mL HEMA çözeltisi 30 mL'ye su ile tamamlanarak 30 dakika boyunca magnetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Bu karışım 15 dakika süre ile degaze edilerek kitosan karışımına eklenmiş ve oluşan karışım reflux altında azot gazı geçirilerek 6 saat boyunca magnetik karıştırıcı ile şiddetli karıştırılarak polimerizasyona bırakılmıştır. Polimerizasyon sonunda karışım

soğumaya bırakılmış, soğuyan karışıma 1M NaOH eklenerek pH 8'e ayarlanmış ve oluşan polimerin çökmesi sağlanmıştır. Karışım su ile 3 kez yıkanarak safsızlıklar ve tepkimeye girmeyen monomer kalıntıları uzaklaştırılmıştır. Çöken polimer bir gün boyunca metanolde bekletilerek suyu uçurulmuş, 50°C'lik etüvde polimerin kuruması sağlanmış ve kuruyan polimer daha sonra öğütülerek toz haline getirilmiştir. Kurutulan sorbent öğütüldükten sonra CTS-p(HEMA) sorbentine bakır immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.1 CTS-p(HEMA) sorbentinin olası yapısı a) Kitosan radikalinin oluşumu b) Radikalik kitosana HEMA bağlanması

### 2.3 CTS-p(HEMA) Sorbentine Bakır İmmobilizasyonu

CTS-p(HEMA) sorbentinden 3 gr alınarak 100 µg/mL 50 mL Cu<sup>2+</sup> çözeltisi ile 1 saat 25°C’de ve düşük rpmde magnetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Daha sonra karışım 6000 rpm’de 15 dakika boyunca santrifüjlenip üst faz alınarak bağlanan Cu<sup>2+</sup> iyonlarının miktarı atomik adsorpsiyon spektrometrisi (AAS) ile belirlenmiştir.

Atomik absorpsiyon spektroskopisi (AAS), gaz halindeki ve temel enerji düzeyinde bulunan atomların, UV ve görünür bölgedeki ışığı absorblamasının ölçülmesi ilkesine dayanmaktadır. Ortamdaki ışığın şiddetindeki azalmaya bağlı olarak adsorpsiyon yapan elementin derişimi de doğru orantılı olarak değişeceğinden bu değişimden yararlanarak metallerin çoğu ve az sayıda ametalin analizi atomik adsorpsiyon spektroskopisi (AAS) ile gerçekleştirilmektedir (Yıldız ve Genç, 1993).

Yapılan çalışmada da, ortamdaki ışığın şiddetindeki değişimine bağlı olarak adsorpsiyon ortamındaki Cu<sup>2+</sup> iyonlarının konsantrasyonu atomik absorpsiyon spektroskopisi ile belirlenmiştir. Atomik absorpsiyon spektroskopisi ile yapılan ölçümlerle ilgili parametreler Tablo 2.1’de sunulmuştur.

Tablo 2.1 Atomik absorpsiyon spektroskopisindeki ölçümlerle ilgili parametreler

| Ölçümlerle İlgili Parametreler |               |
|--------------------------------|---------------|
| Element                        | Cu            |
| Dalga Boyu                     | 249,2 nm      |
| Slit Aralığı                   | 0,7 nm        |
| Alev tipi                      | Hava-Asetilen |

Öncelikle atomik adsorpsiyon spektrometrisiyle 10-100 µg/mL aralığında kalibrasyon doğrusu hazırlanmıştır. Daha sonra



$$C_{\text{sorbent}} = (C_{\text{başlangıç}} - C_{\text{son}})$$

eşitliğinden yararlanarak bağlanan  $\text{Cu}^{2+}$  miktarı belirlenmiştir. Bu eşitlikte,  $C_{\text{Sorbent}}$ : Sorbent tarafından adsorplanan  $\text{Cu}^{2+}$  konsantrasyonunu ( $\mu\text{g/mL}$ );  $C_{\text{başlangıç}}$ : Başlangıç  $\text{Cu}^{2+}$  konsantrasyonunu ( $\mu\text{g/mL}$ );  $C_{\text{son}}$ : adsorpsiyon sonrası belirlenen  $\text{Cu}^{2+}$  konsantrasyonunu ( $\mu\text{g/mL}$ ) ifade eder.

Bağlanan  $\text{Cu}^{2+}$  iyonlarının CTS-p(HEMA) sorbentinden ortama salınıp salınmadığını kontrol etmek amacıyla hazırlanan polimer pH 4, 5, 6, 7 ve 8 ortamlarında karıştırılmaya bırakılmıştır. Daha sonra karışım 6000 rpm’de 15 dakika boyunca santrifüjlenip üst faz alınarak ortama salınan  $\text{Cu}^{2+}$  iyonlarının miktarı atomik adsorpsiyon spektrometrisi (AAS) ile belirlenmiştir.

#### 2.4 CTS-p(HEMA)- $\text{Cu}^{2+}$ Sorbentinin Karakterizasyonu

Sentezlenen CTS-p(HEMA)- $\text{Cu}^{2+}$  sorbenti, Fourier Dönüşümlü IR spektroskopisi (FTIR), termal gravimetrik analiz (TGA-DTA), taramalı elektron mikroskopu (SEM) ve şişme testi analizleri ile karakterize edilerek fonksiyonel grupları, termal kararlılığı ile yüzey morfolojisi belirlenmiştir.

CTS-p(HEMA) sorbentinin FTIR spektrumu, ATR örnekleme probuna sahip FTIR spektrofotometresi (Perkin Elmer spectrum 100 FT-IR spectrometer) ile gerçekleştirilmiştir. Kurutulmuş ve öğütülmüş olan polimerden 1 mg alınarak 100 mg KBr ile karıştırılmış ve preslenerek pellet haline getirip  $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$  dalga sayısı aralığında IR spektrumu alınmıştır.

TGA analizi, numunede sıcaklığa bağlı olarak meydana gelebilecek ağırlık değişimlerini tanımlamaya yarayan termal analiz yöntemlerinden biridir. CTS-

p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> sorbentinin termal kararlılığının incelenmesi amacıyla da termal analiz (Perkin Elmer STA 6000) cihazı kullanılmıştır.

CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> sorbentinin SEM görüntülerinin alınması için İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsünde bulunan SEM cihazı (Quanta 250 FEG) kullanılmıştır. Polimerin iletkenliğini arttırmak amacıyla yüzeye altın kaplama yapılarak görüntüler alınmış olup elde edilen görüntüler ile polimerin yüzeyinin morfolojik özellikleri incelenmiştir.

CTS- p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> sorbentinin şişme kapasitesinin belirlenmesi amacıyla kuru olan kitosan- p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> sorbentinden  $\pm 0,00001$  duyarlılıkta 0,1 g alınarak 20 mL suda 15, 30, 45 dk süre boyunca bırakılmış ve şişme kapasitesi

$$\% S = \frac{W_{\text{ıslak}} - W_{\text{kuru}}}{W_{\text{kuru}}} \times 100$$

eşitliğinden yararlanılarak belirlenmiştir. Bu eşitlikte, %S, sorbentin şişme yüzdesini; W<sub>ıslak</sub>: ıslak olan sorbentin ağırlığını (g); W<sub>kuru</sub>: kuru olan sorbentin ağırlığını (g) ifade eder.

## 2.5 Melaminin CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> Sorbenti Üzerine Adsorpsiyon Koşullarının Optimizasyonu

CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> sorbentine melaminin adsorpsiyon koşullarının optimizasyonu amacıyla sorbent miktarı, başlangıç melamin derişimi, süre, pH, sıcaklık gibi melamin adsorpsiyonunu etkileyebilecek parametrelerin adsorpsiyon üzerine etkisi incelenmiştir.

### **2.5.1 CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> Üzerine Melamin Adsorpsiyonuna pH Etkisi**

pH'ın CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> polimerine melamin adsorpsiyonuna etkisini belirlemek için pH: 4-9 aralığında farklı pH'larda çözeltiler hazırlanmıştır. Son hacmi 5 mL, melamin konsantrasyonu 0,5 µg/mL olan bu farklı pH'daki çözeltiler 0,05 g sorbent ile 150 rpm'de karıştırıcıda 1 saat boyunca 25°C'de adsorpsiyona bırakılmıştır. Adsorpsiyondan sonra örnekler 6000 rpm'de 15 dk santrifüj edilip üst fazlarında melamin analizi yapılmıştır. İçerisinde sorbent bulunmayan farklı pH'daki kör örnekler de her konsantrasyon değeri için başlangıç derişimini belirlemede kullanılmıştır.

### **2.5.2 CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> Üzerine Melamin Adsorpsiyonuna Sorbent Miktarının Etkisi**

Melamin adsorpsiyonuna sorbent miktarının etkisini incelemek için başlangıç melamin konsantrasyonu 0,5 µg/mL olan çözelti (5 mL) 0,05 g, 0,1 g ve 0,15 g sorbent ile 150 rpm'de karıştırıcıda 1 saat boyunca 25°C'de adsorpsiyona bırakılmıştır. Adsorpsiyondan sonra örnekler 6000 rpm'de 15 dk santrifüjlenip üst fazlarında melamin analizi yapılmıştır.

### **2.5.3 CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> Üzerine Melamin Adsorpsiyonuna Sürenin Etkisi**

Melamin adsorpsiyonuna sürenin etkisini belirlemek için son hacmi 5 mL, melamin konsantrasyonu 0,5 µg/mL olan çözelti hazırlanarak 0,05 g sorbent ile 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 dakika boyunca 150 rpm'de karıştırıcıda 25°C'de adsorpsiyona bırakılmıştır. Belirtilen süreler sonunda örnekler 6000 rpm'de 15 dk santrifüj edilip üst fazlarında melamin analizi yapılmıştır.

#### **2.5.4 CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> Üzerine Melamin Adsorpsiyonuna Melaminin Başlangıç Konsantrasyonunun Etkisi**

Melamin adsorpsiyonuna melamin başlangıç konsantrasyonunun etkisini incelemek için adsorpsiyon ortamındaki başlangıç melamin konsantrasyonu 0,5-10 µg/mL aralığında çözeltiler hazırlanarak 0,05 g sorbent ile 150 rpm'de karıştırıcıda 1 saat boyunca 25°C'de adsorpsiyona bırakılmıştır. Adsorpsiyon hacmi 5 mL'dir. Adsorpsiyondan sonra örnekler 6000 rpm'de 15 dk santrifüjlenip üst fazlarında melamin analizi yapılmıştır. İçerisinde sorbent bulunmayan kör örnekler de her konsantrasyon değeri için başlangıç derişimini belirlemede kullanılmıştır.

#### **2.5.5 CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> Üzerine Melamin Adsorpsiyonuna Sıcaklığın Etkisi**

Melamin adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisini incelemek için 15°C, 25°C ve 45°C değerlerinde çalışılmıştır. Son hacmi 5 mL, başlangıç melamin konsantrasyonu 0,5 µg/mL olan çözelti, 0,05 g sorbent ile belirtilen sıcaklıklarda 150 rpm'de karıştırıcıda 1 saat boyunca adsorpsiyona bırakılmıştır. Adsorpsiyondan sonra örnekler 6000 rpm'de 15 dk santrifüj edilip üst fazlarında melamin analizi yapılmıştır. İçerisinde sorbent bulunmayan kör örnekler de her bir sıcaklık değeri için başlangıç derişimini belirlemede kullanılmıştır.

#### **2.6 CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> Sorbentinden Melaminin Desorpsiyonu**

Adsorpsiyon sonrasında CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> sorbenti üzerinde adsorplanmış olan melaminin desorpsiyonu amacıyla Tablo 2.2'de verilen desorpsiyon ajanlarıyla farklı oranlarda çalışılmıştır.

Tablo 2.2 Melamin desorpsiyonu amacıyla çalışılan bazı desorpsiyon ajanları

| <b>Desorpsiyon Ajanları</b>                  |           |                                       |                |
|----------------------------------------------|-----------|---------------------------------------|----------------|
| <b>Organik Çözücüler</b>                     |           | <b>Tuzlar</b>                         |                |
| ACN:MeOH                                     | (1:9)     | NaCl                                  | (0,5 M)        |
| ACN:MeOH                                     | (2:8)     | NaSCN                                 | (0,5 M)        |
| ACN:MeOH                                     | (3:7)     | NH <sub>4</sub> Cl                    | (0,5 M)        |
| NH <sub>4</sub> Cl:MeOH                      | (1:9)     | NH <sub>4</sub> Cl                    | (0,02 M)       |
| ACN:MeOH:NH <sub>4</sub> OH                  | (2:7:1)   | NH <sub>4</sub> Cl                    | (0,01 M)       |
| ACN:MeOH:H <sub>2</sub> O:NH <sub>4</sub> OH | (2:5:2:1) | NH <sub>4</sub> Cl                    | (0,01 M, pH:8) |
| ACN:NH <sub>4</sub> Cl                       | (1:1)     | NH <sub>4</sub> Cl:NH <sub>4</sub> OH | (9:1)          |

CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> sorbenti üzerine adsorplanan melaminin desorpsiyonu 5 mL desorpsiyon çözeltisi ilave edilerek gerçekleştirilmiştir. 0,05 g melamin adsorplanmış sorbent desorpsiyon çözeltisi ile 150 rpm’de karıştırıcıda 2 saat boyunca 25°C’de desorpsiyona bırakılmıştır. 2 saat sonunda sorbent 6000 rpm’de çöktürülmüştür. Çöktürülen sorbent, ultra saf su ile 3 kere yıkama yapılarak desorpsiyon işlemine hazır hale getirilmiştir ve üzerine 5 mL taze desorpsiyon çözeltisi eklenerek 2 saat daha desorpsiyon işlemine devam edilmiştir. Desorpsiyon oranı

$$\text{Desorpsiyon oranı (\%)} = \frac{\text{desorpsiyon ortamına salınan melamin miktarı}}{\text{adsorplanan melamin miktarı}} \times 100$$

eşitliği kullanılarak hesaplanmıştır.

## 2.7 CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> Sorbentinin Tekrar Kullanılabilirlik Denemeleri

CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> sorbentinin tekrar kullanılabilirlik denemeleri için başlangıç melamin konsantrasyonu 0,5 µg/mL olan çözelti hazırlanarak son hacmi 5 mL olacak şekilde 0,05 g sorbent ile 25°C’de 1 saat adsorpsiyona bırakıldıktan sonra 6000 rpm’de 15 dk santrifüjlenip sorbent çöktürülerek üst fazda melamin analizi yapılmıştır. Çöktürülen sorbent üzerine 5 mL desorpsiyon çözeltisi eklenerek karıştırıcıda 2 saat desorpsiyona bırakılmıştır. 2 saat sonunda sorbent 6000 rpm’de

çöktürölüp üzerine 5 mL taze desorpsiyon çözeltisi eklenerek 2 saat daha desorpsiyon işlemine devam edilmiştir. Çöktürülen sorbent her bir adsorpsiyon-desorpsiyon işlemi sonrasında ultra saf su ile 3 kere yıkama yapılarak diğer bir döngü işlemine sorbent hazır hale getirilmiştir. Bu şekilde sentezlenen sorbentin tekrar kullanılabilirliğinin belirlenmesi için aynı sorbentle adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü 5 kere tekrar edilmiştir.

## **2.8 CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> Sorbenti ile Süt Ürünlerinden Melaminin Ekstraksiyonu**

Çeşitli markalarda alınan süt ve bebek maması örnekleri, İzmir'deki farklı marketlerden temin edilmiş ve örnek hazırlama öncesi tüm çalışılacak örnekler +4°C'de muhafaza edilmiştir.

### **2.8.1 Süt**

15 mL'lik santrifüj tüpüne 7 mL süt örneği konularak üzerine 3 mL su ve 500 µL 0,5 M HCl ilave edilir. Karışım 3 dk kadar vorteklenir ve daha sonra 5000 rpm'de 15 dk santrifüjlenir. Santrifüjlenen karışımdan üst faz alınarak 0,22 µm'lik membran filtreden geçirilir. Daha sonra, bu filtre edilen örnek CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> sorbenti ile ekstraksiyon öncesinde ve sonrasında melamin analizi için kullanıldı.

### **2.8.2 Bebek Maması**

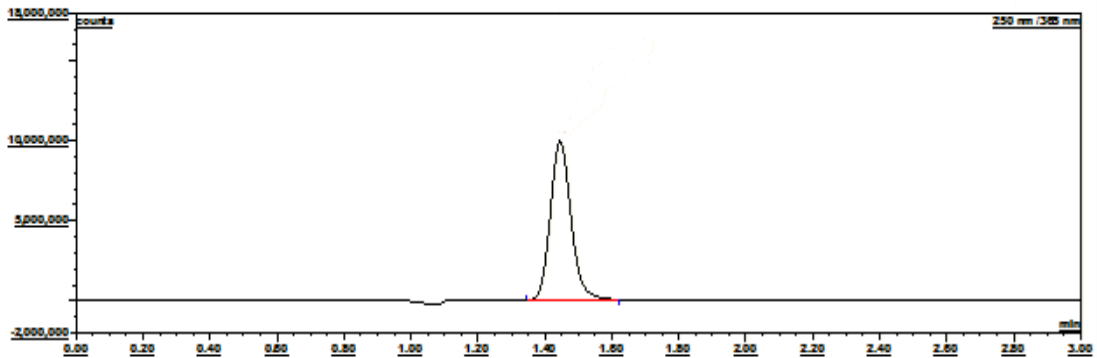
15 mL'lik santrifüj tüpüne 2 g bebek maması örneği konularak üzerine 8 mL su ve 500 µL 0,5 M HCl ilave edilir. Karışım 3 dk kadar vorteklenir ve daha sonra 5000 rpm'de 15 dk santrifüjlenir. Santrifüjlenen karışımdan üst faz alınarak 0,22 µm'lik membran filtreden geçirilir. Daha sonra, bu filtre edilen örnek CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> sorbenti ile ekstraksiyon öncesinde ve sonrasında melamin analizi için kullanıldı.

Hazırlanan bu örnek karışımlarından 5 mL alınarak her birine 0,05 g CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> sorbentinden eklenerek 25°C’de 1 saat adsorpsiyona bırakıldıktan sonra 6000 rpm’de 15 dk santrifüjlenip sorbent çöktürülerek HPLC ile üst fazdaki melamin miktarı belirlenmiştir.

## 2.9 Melaminin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) İle Analizi

Adsorpsiyon-desorpsiyon denemeleri sonrasında melamin miktarları Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile belirlenmiştir. Melamin analizleri Thermo Ultimate 3000 HPLC sisteminde, gerçekleştirilmiş olup HPLC analizinde Finete ve diğer. kullandıkları yöntemden yararlanılmıştır (Finete, Gouvêa, Marques ve Netto, 2014). Melaminin HPLC ile analizine ilişkin kromatografik koşullar aşağıdaki Tablo 2.3’de verilmiştir.

Thermo Ultimate 3000 HPLC sisteminde gerçekleştirilen melamin analizleri için 1-800 µg/L aralığındaki standart melamin çözeltileri ile kalibrasyon doğrusu oluşturulmuştur. Şekil 2.2’de 1 µg/mL melamin standart çözeltisine ilişkin kromatogram verilmiştir. Melaminin alıkonma zamanı (R<sub>t</sub>) 1,45 dakika olarak belirlenmiştir.



Şekil 2.2 1 µg/mL melamin standart çözeltisinin kromatogramı (R<sub>t</sub>: 1,45 dakika)

Adsorplanan melamin miktarı

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

eşitliği kullanılarak hesaplanmıştır. Bu eşitlikte, Q, gram sorbent başına adsorplanan melamin miktarı (µg/g);  $C_{\text{başlangıç}}$ , başlangıç melamin konsantrasyonunu (µg/mL);  $C_{\text{son}}$ , adsorpsiyon sonrası belirlenen melamin konsantrasyonu (µg/mL); m, kuru sorbent ağırlığı (g); V ise adsorpsiyon hacmini (mL) ifade eder.

Tablo 2.3 Melaminin HPLC ile analizine ilişkin kromatografik koşullar

| <b>Kromatografik Analiz Koşulları</b> |                                                  |
|---------------------------------------|--------------------------------------------------|
| <b>Kolon:</b>                         | Thermo ODS-2 HYPERSIL (50 x 4,6 x 3µm)           |
| <b>Mobil Faz:</b>                     | Asetonitril : Amonyum Klorür (10 mM)<br>(2:98)   |
| <b>Akış:</b>                          | 0,8 mL/dk                                        |
| <b>Enjeksiyon Hacmi:</b>              | 20 µL                                            |
| <b>Analiz Süresi:</b>                 | 3 dk                                             |
| <b>Çalışma Şekli:</b>                 | İzokritik                                        |
| <b>Sıcaklık:</b>                      | 30°C                                             |
| <b>Dedektör:</b>                      | Floresans Dedektör<br>(Eks:250 nm, Emis: 365 nm) |



### 2.9.1 Yöntemin Analitik Performans Parametrelerinin Belirlenmesi

Melamin tayininde kullanılmak üzere geliştirilen yöntemin analitik performans parametreleri [doğruluk, kesinlik, tespit limiti (LOD) ve tayin limiti (LOQ)] optimize edilen koşullar altında süt ve bebek maması örneklerine uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

Doğruluk, analiz sonucunda elde edilen sonuçların gerçek değere olan yakınlığını ifade eder (Taverniers, De Loose ve Bockstaele, 2004). Doğruluk parametresinin değerlendirilmesi, süt ve bebek maması örneklerine belirli konsantrasyonlarda (0,6, 0,8, 1 µg/mL) standart melamin çözeltileri ile zenginleştirilerek yapılan geri kazanım sonucunda elde edilmiştir. Doğruluk, yüzde geri kazanım cinsinden

$$\% \text{ Geri Kazanım} = \frac{\text{Zenginleştirilmiş örneğin cihazda belirlenen konsantrasyonu}}{\text{Zenginleştirme konsantrasyonu}} \times 100$$

eşitliği kullanılarak hesaplanmıştır.

Kesinlik, analiz sonucunda aynı örnekten elde sonuçların birbirine yakınlığını ifade etmektedir. Bir yöntemin kesinliği, geri kazanımlar sonucu elde edilen değerlerin yüzde bağıl standart sapma (% RSD) değeri ile belirlenmektedir (Taverniers, De Loose ve Bockstaele, 2004). Kesinlik,

$$\% \text{ RSD} = \frac{\text{standart sapma}}{\text{ortalama geri kazanım}} \times 100$$

eşitliği kullanılarak hesaplanmıştır.

Tespit limiti (LOD), zemin gürültüsünden farklı olarak tespit edilebilen fakat değeri tam olarak ölçülemeyen en düşük analit konsantrasyonu olarak tanımlanır (Peters, Drummer ve Musshoff, 2007). LOD'nin belirlenmesi için süt ve bebek maması örneklerinin körü üzerine standart melamin çözeltisinden cihazda okunabilen ve tekrarlanabilirliğinin yapılabildiği en düşük konsantrasyonda melamin ilave edilerek analiz yapılmıştır. Yapılan analizler sonucunda kalibrasyon grafiği oluşturulmuş ve elde edilen değerlerin standart sapması hesaplanmıştır ve aşağıda yer alan eşitliğe göre LOD değeri belirlenmiştir.

$$LOD = (Standart Sapma/Kalibrasyon doğrusunun eğimi) \times 3,3$$

Tayin limiti (LOQ) ise, kabul edilebilir doğrulukta ve kesinlikte ölçülebilen en düşük analit konsantrasyonu olarak tanımlanır (Peters, Drummer ve Musshoff, 2007). LOQ değeri,

$$LOQ = (Standart Sapma/Kalibrasyon doğrusunun eğimi) \times 10$$

eşitliği kullanılarak belirlenmiştir.

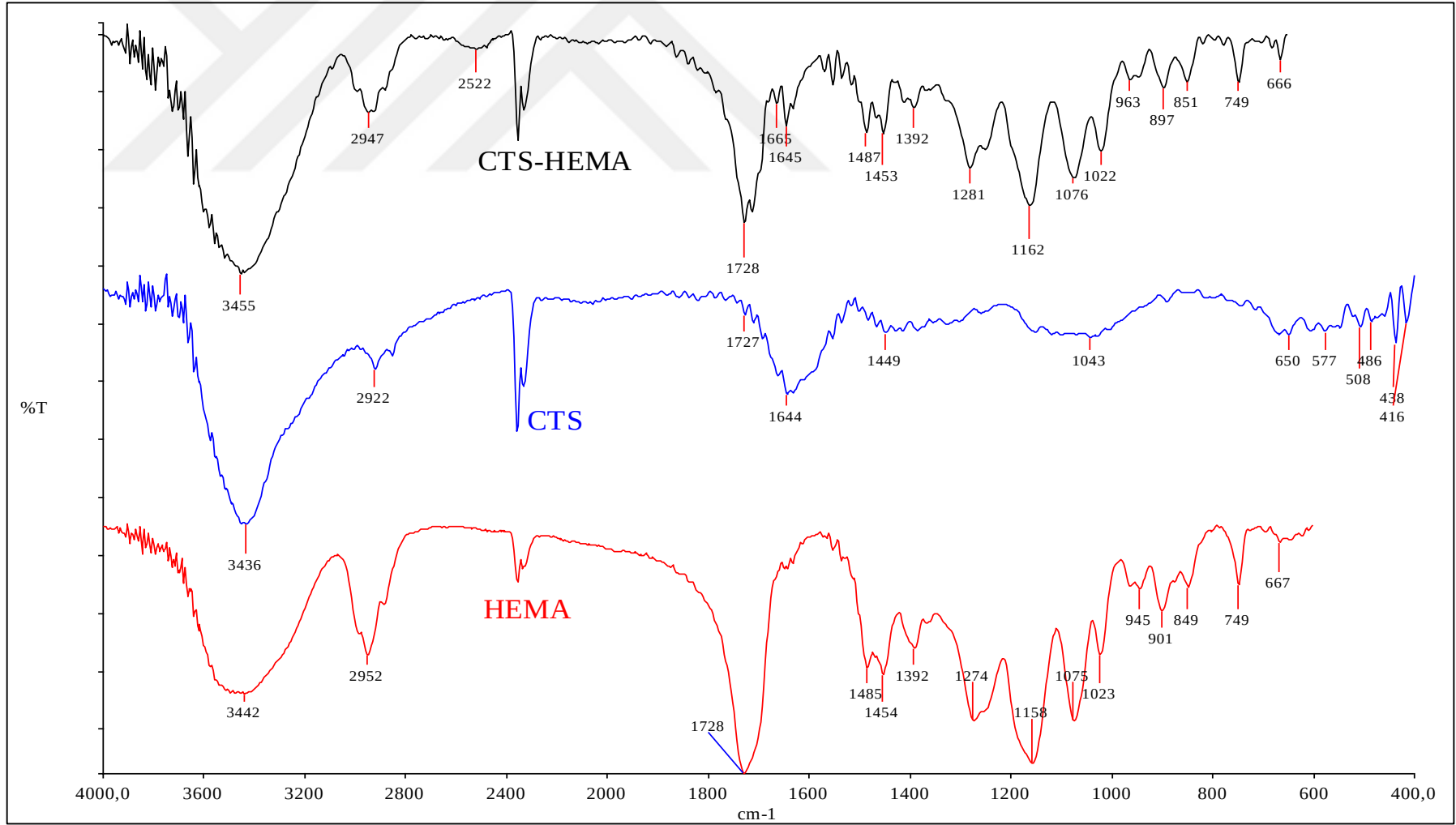
## BÖLÜM ÜÇ

### BULGULAR VE TARTIŞMALAR

#### 3.1 CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> Sorbentinin Karakterizasyonu

##### 3.1.1 CTS-p(HEMA) Sorbentinin FTIR Spektrumu

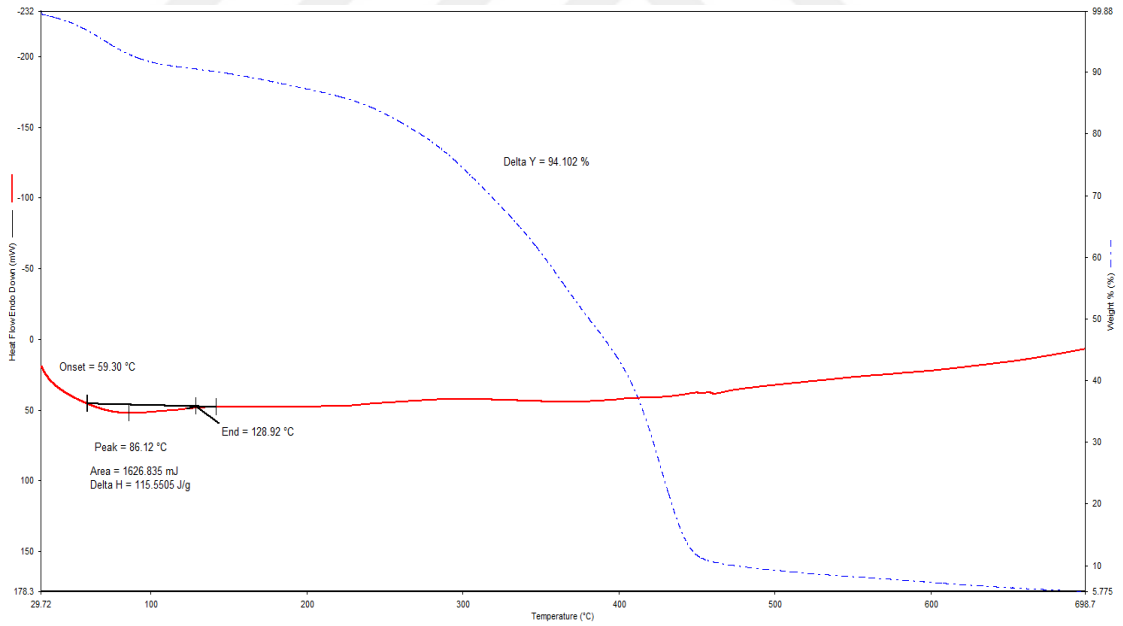
HEMA polimerinin, kitosan (CTS) monomerinin yapısına katılıp katılmadığını belirlemek için alınan FTIR spektrumu Şekil 3.1’de gösterilmektedir. p(HEMA) ve kitosan yapıları sırasıyla 3442 cm<sup>-1</sup> ve 3436 cm<sup>-1</sup>’de karakteristik hidrojen bağlı alkol, -OH, gerilme bandına sahiptir. p(HEMA)’nın kitosanın yapısına katılmasıyla –OH gerilme bandının şiddeti artarak 3455 cm<sup>-1</sup>’e kaymıştır. CTS-p(HEMA)’nın FTIR spektrumunda p(HEMA)’nın karbonil (-C=O) grubuna ait karakteristik adsorpsiyon bandı 1728 cm<sup>-1</sup>’de görülmektedir. Kitosanın amid grubuna ait karakteristik olan gerilme bandı 1644 cm<sup>-1</sup>’de görülmektedir ve CTS-p(HEMA)’nın FTIR spektrumuna bakıldığında, bu bandın şiddetinde azalma gerçekleşmiştir. Ek olarak, p(HEMA)’nın 600-1400 cm<sup>-1</sup> aralığında gözlenen karakteristik gerilme bandları CTS-p(HEMA) yapısında da yer almaktadır. Bu durum, CTS-p(HEMA) yapısının oluştuğunun bir göstergesidir.



Şekil 3.1 CTS-p(HEMA) sorbentine ilişkin FTIR Spektrumu

### 3.1.2 CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> Sorbentinin Termal Analizi

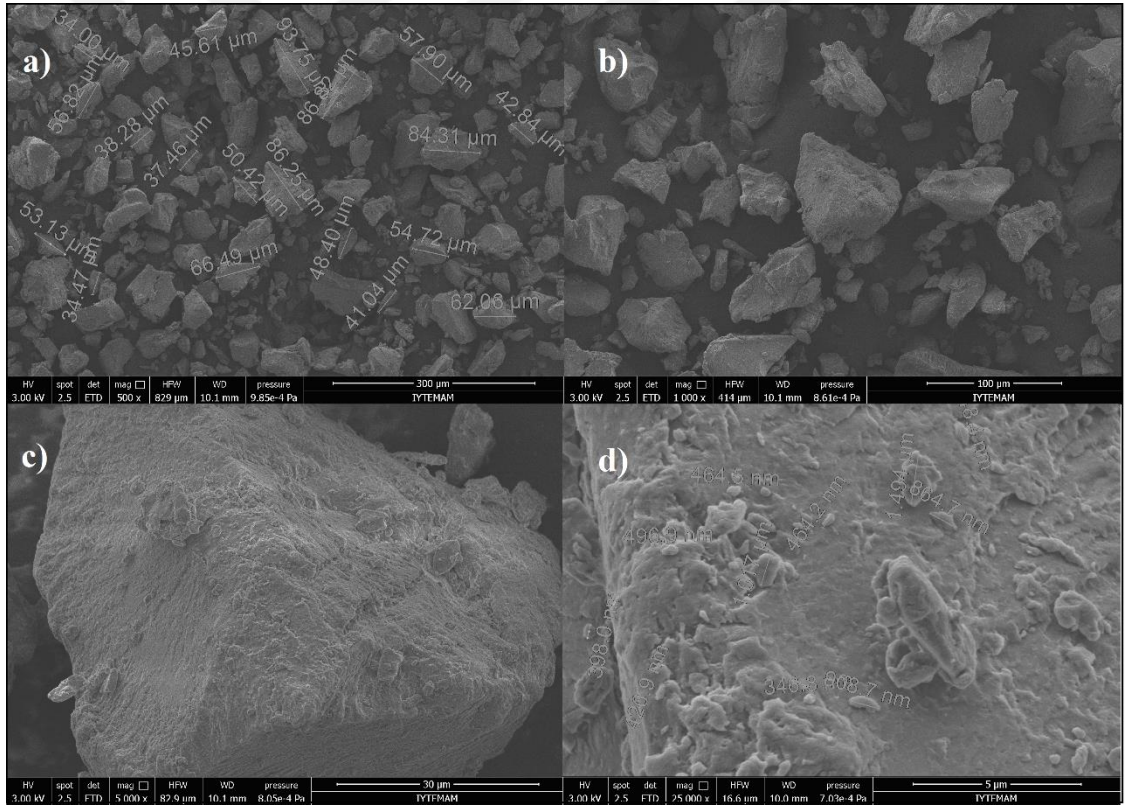
Sentezlenen CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> sorbentinin termal kararlılığının incelenmesi amacıyla azot atmosferi altında 30-700°C aralığında ısıtılması sonucu elde edilen termogramı Şekil 3.2’de verilmiştir. Şekil 3.2’den görüleceği üzere, sentezlenen sorbentin termal bozunmasının iki kademeli olarak gerçekleştiği görülmüştür. İlk kütle kaybının yaklaşık olarak 50°C’de olduğu ve bu bozunma sonucu oluşan kütle kaybının sorbentin içindeki nemden kaynaklanabileceği düşünülmüştür. CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> sorbenti, sıcaklığın 100-200°C olduğu aralıkta yapısını yarı kararlı olarak korumuştur. Sonrasında artan sıcaklık artışıyla birlikte, 300-500°C aralığında yapısının yavaş yavaş bozunmaya başladığı görülmüştür. İkinci bozunmanın 455°C civarında olduğu, sorbentin bu sıcaklığa kadar kararlılığını büyük ölçüde koruduğu ve burdaki kaybın yaklaşık olarak %89 olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.2 CTS-p(HEMA) sorbentine ilişkin TGA termogramı

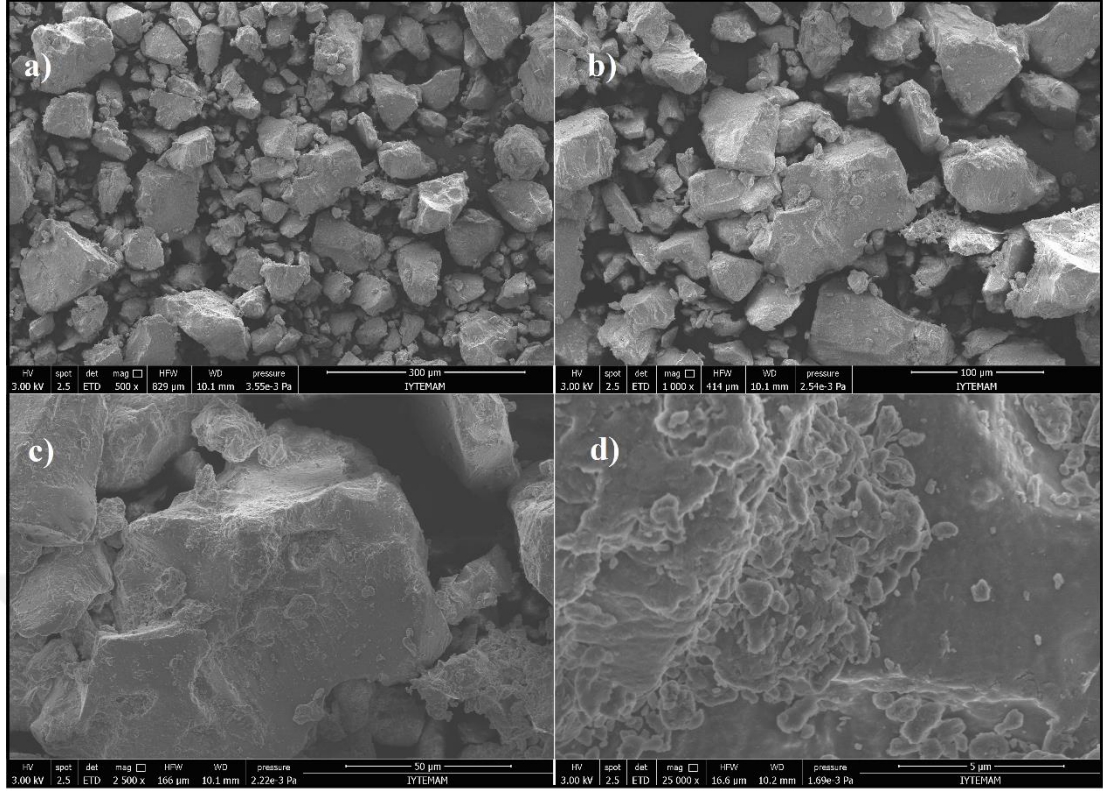
### 3.1.3 CTS-p(HEMA) ve CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> Sorbentlerinin SEM Görüntüleri

İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsündeki Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile alınan görüntülerde sentezlenen CTS-p(HEMA) ve CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> sorbentlerinin morfolojik yapısı belirlenmiştir. SEM görüntülerine bakıldığında radikalik polimerizasyon yoluyla sentezlenen CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> polimerinin yaklaşık olarak boyutu 42  $\mu\text{m}$  olarak gözlenmiştir. Şekil 3.3.1'e bakıldığında sentezlenen sorbentin adsorpsiyona etki edebilecek pürüzlü yapısının olduğu ve Şekil 3.3.2'de yapıya Cu<sup>2+</sup> iyonlarının bağlanması sonucunda bu pürüzlü yapısının az da olsa artırılarak korunduğu gözlenmiştir.



Şekil 3.3.1 CTS-p(HEMA) sorbentine ilişkin SEM görüntüsü

a) 300 $\mu\text{m}$  b) 100 $\mu\text{m}$  c) 30 $\mu\text{m}$  d) 5 $\mu\text{m}$



Şekil 3.3.2 CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> sorbentine ilişkin SEM görüntüsü

a) 300µm b) 100µm c) 50µm d) 5µm

#### 3.1.4 CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> Sorbentinin Şişme Kapasitesinin Belirlenmesi

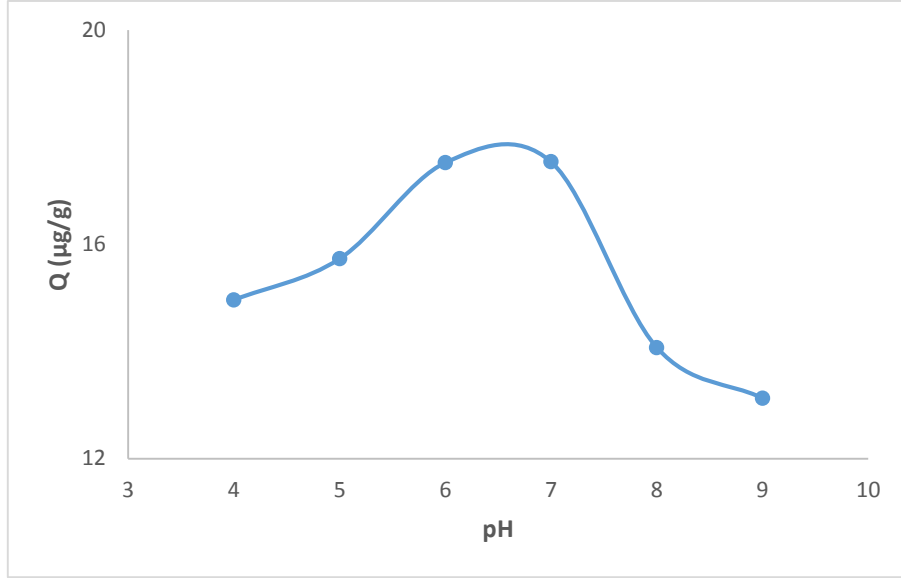
CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> sorbentinin şişme kapasitesinin belirlenmesi amacıyla kuru olan CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> sorbentinden  $\pm 0,00001$  duyarlılıkta 0,1 g alınarak 20 mL su içeren kaba 15, 30, 45 dk süre boyunca bırakılmıştır. Bu süreler sonunda sorbent sudan alınmış, süzgeç kağıdı yardımı ile yüzeyindeki su uzaklaştırılarak tartılmıştır. Kuru ve ıslak ağırlıklar kaydedilerek yüzde şişme eşitliğinde (%S) yerine konmuş ve sorbentin şişme yüzdesinin %140 olduğu belirlenmiştir. Bu sonuca göre, sentezlenen CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> sorbentinin hidrojel yapılı olduğu söylenebilir.

### 3.2 Melaminin CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> Sorbentin Üzerine Adsorpsiyon Koşullarının Optimizasyonu

#### 3.2.1 CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> Üzerine Melamin Adsorpsiyonuna pH Etkisi

pH'ın CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> polimerine melamin adsorpsiyonuna etkisini belirlemek için pH 4-9 aralığında farklı pH'larda çözeltiler hazırlanmıştır. CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> sorbentinin melamin adsorpsiyonuna ortam pH'nın etkisi Şekil 3.4'de sunulmuştur. Şekil 3.4'e bakıldığında, asidik ve bazik ortamlarda adsorpsiyon kapasitesinde düşüş olduğu ve maksimum adsorpsiyon kapasitesinin pH 6-7 aralığında olduğu gözlenmiştir. Melaminin pK<sub>a</sub> değeri 5,6'dır ve düşük pH değerlerinde melamin pozitif yüklüdür. Asidik ortamdaki adsorpsiyon kapasitesinin düşük olması, melaminin CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> sorbenti ile etkileşime girememesi, sonuç olarak da adsorpsiyon kapasitesinin düşmesiyle açıklanabilir (Kokotou ve Thomaidis, 2012). Hidrojen ve hidroksil (-OH) iyonları güçlü bağlanma yeteneklerine sahiptirler. Ortamın nötral olduğu pH değerinde, ortamda bu iyonlar bulunmadığı için melamin ile sorbentin yüzeyine bağlanma yarışına girmediklerinden adsorpsiyon kapasitesinde herhangi bir düşüş gerçekleşmemiştir. pH değerlerinin artırılmasıyla birlikte, bazik ortamdaki hidroksil (-OH) iyonlarının derişimi artar ve yüzeydeki melaminin bağlanacağı yerlere hidroksil (-OH) iyonları bağlanarak melaminin adsorpsiyon kapasitesini düşürür (Wang ve Li, 2007).

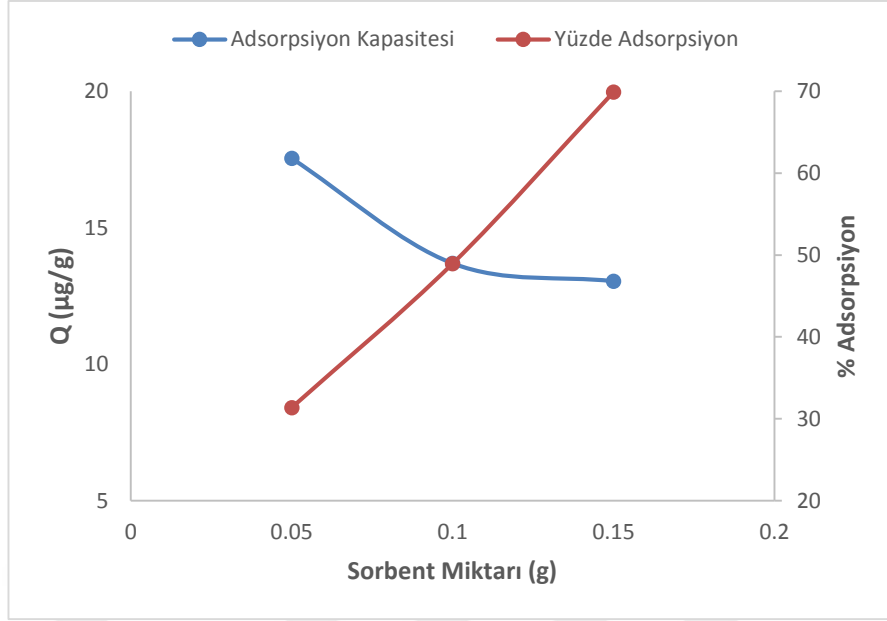




Şekil 3.4 CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> üzerine melamin adsorpsiyonuna pH etkisi (DeneySEL Koşullar: 0,05 g sorbent, 0,5 µg/mL MEL, 25°C, 60 dk)

### 3.2.2 CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> Üzerine Melamin Adsorpsiyonuna Sorbent Miktarının Etkisi

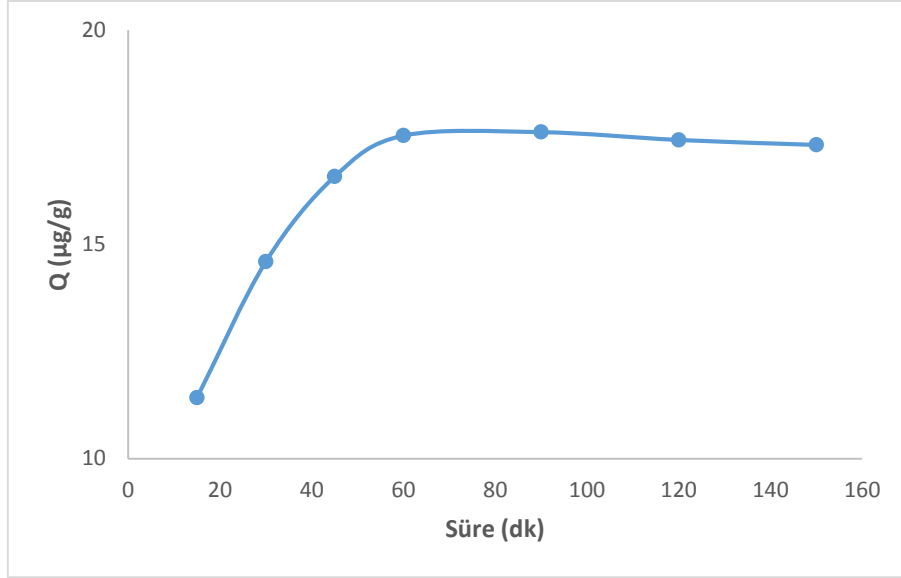
Melamin adsorpsiyonu üzerine sorbent miktarının etkisini incelemek için CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> sorbentinden 0,05 g, 0,1 g ve 0,15 g kullanılarak adsorpsiyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> sorbentine melamin adsorpsiyona, sorbent miktarının etkisi Şekil 3.5’de gösterilmektedir. Şekil 3.5’e bakıldığında, sorbent miktarı 0,05 g’dan 0,15 g’a arttırıldığında adsorpsiyon kapasitesinde %25,7 oranında düşüş gözlenmiştir. Düşük sorbent miktarlarında ortamda yeterince sorbent bulunmadığından, birim sorbent başına adsorplanan melamin miktarı yükselmiştir. Yüksek sorbent miktarlarında ise, ortamdaki sabit melamin konsantrasyonunda sorbent miktarının arttırılmasıyla CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> sorbentinin açık uçlarının melamin ile tam olarak doyurulamadan kalması sonucunda adsorpsiyon kapasite değerinde düşüş yaşanmıştır (Vadivelan ve Vasanth Kumar, 2005). 0,05 g sorbentle yapılan adsorpsiyon çalışmasında yüksek adsorpsiyon kapasitesinin elde edilmesi nedeniyle çalışmalara 0,05 g sorbent ile devam edilmiştir.



Şekil 3.5 CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> üzerine melamin adsorpsiyonuna sorbent miktarının etkisi (Deneysel Koşullar: 0,5 µg/mL MEL, 25°C, 60 dk)

### 3.2.3 CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> Üzerine Melamin Adsorpsiyonuna Sürenin Etkisi

Melamin adsorpsiyonu üzerine sürenin etkisi 15, 30, 45, 60, 90 120 ve 150. dakikalarda alınan örneklerle incelendi. Şekil 3.6'dan görüleceği üzere elde edilen adsorpsiyon kapasitesi (Q) değerlerinde 60. dakikaya kadar adsorplanan melamin miktarında artış meydana geldiği, 60. dakikada dengeye ulaştığı gözlenmiştir. CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> sorbentinin yüzeyindeki tüm bağlanma bölgelerinin dolması nedeniyle doygunluğa ulaştığı görülmüştür ve bu süre sonrasında adsorpsiyon kapasitesinde değişim gözlenmemiştir. Bu nedenle, adsorpsiyon çalışmaları için optimum süre 60 dakika olarak belirlenmiştir.

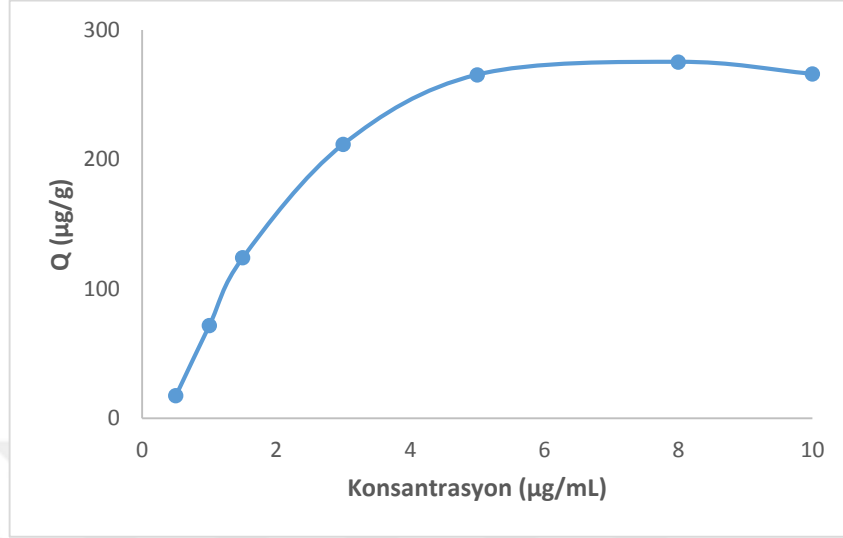


Şekil 3.6 CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> üzerine melamin adsorpsiyonuna sürenin etkisi (Deneysel Koşullar: 0,05 g sorbent, 0,5 µg/mL MEL, 25°C)

### 3.2.4 CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> Üzerine Melamin Adsorpsiyonuna Başlangıç Melamin Konsantrasyonunun Etkisi

Melamin adsorpsiyonu üzerine başlangıç konsantrasyonunun etkisini incelemek amacıyla adsorpsiyon çalışmaları 0,5-10 µg/mL aralığındaki melamin çözeltileri ile gerçekleştirilmiştir. CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> sorbentine melamin adsorpsiyonuna, melamin başlangıç konsantrasyonunun etkisi Şekil 3.7’de sunulmuştur. Sorbent tarafından adsorblanan madde miktarı, çözeltide bulunan melamin konsantrasyonuna bağlı olarak değişim gösterir. Farklı başlangıç melamin konsantrasyon değerlerinde, birim hacimdeki melamin miktarı değişeceğinden buna bağlı olarak, CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> sorbenti tarafından adsorblanan melamin miktarı da değişecektir. Adsorpsiyon boyunca, çözeltideki melamin miktarı zamanla azalacağından, adsorpsiyon kapasitesindeki değişimin yavaşlayarak bir süre sonra dengeye gelmesi beklenir (Erdem, Karapinar ve Donat, 2004). Şekil 3.7’den görüleceği gibi, çözeltideki başlangıç melamin derişiminin artmasıyla, sorbent tarafından birim kütle başına adsorplanan melamin miktarı artmış, 8 µg/mL melamin konsantrasyonunda dengeye

ulaşmıştır. CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> sorbentinin maksimum adsorpsiyon kapasitesinin 275,38 µg/g olduğu belirlenmiştir.

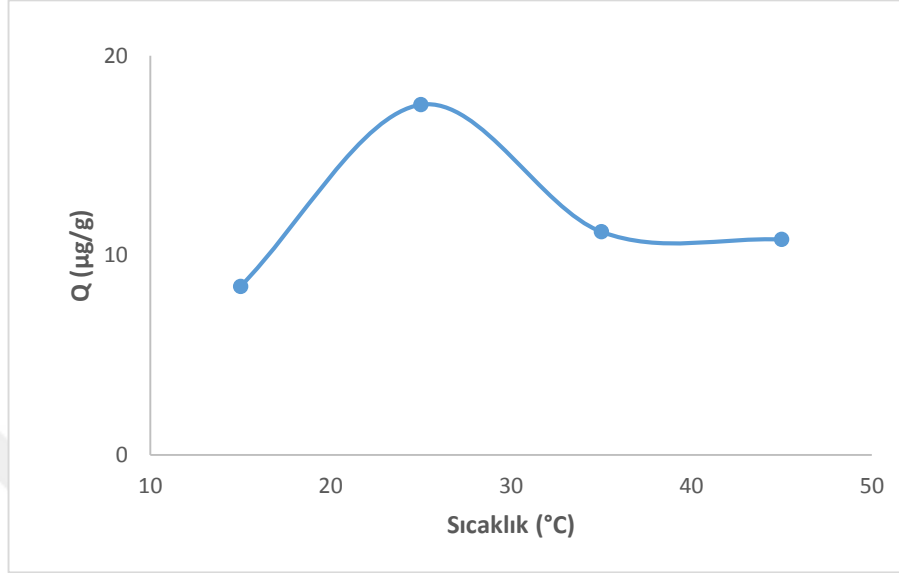


Şekil 3.7 CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> üzerine melamin adsorpsiyonuna başlangıç konsantrasyonunun etkisi (DeneySEL Koşullar: 0,05 g sorbent, 25°C, 60 dk)

### 3.2.5 CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> Üzerine Melamin Adsorpsiyonuna Sıcaklığın Etkisi

Melamin adsorpsiyonu üzerine sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla adsorpsiyon işlemi 15°C, 25°C ve 45°C değerlerinde gerçekleştirilmiş olup CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> sorbentinin melamin adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi Şekil 3.8’de sunulmuştur. Şekil 3.8’den görüleceği üzere, CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> sorbentine melaminin adsorpsiyonunda sıcaklığın 15°C’den 25°C’ye arttırılmasıyla adsorpsiyon kapasitesinde % 51,9 oranında artış meydana gelmiştir. Bu durum, sıcaklıkla artan van der Waals çekim kuvvetlerinde bir artış ile ilişkili olabilir. İMAK sorbentlerindeki adsorpsiyonun, elektrostatik (veya iyonik), hidrofobik veya verici-alıcı (koordinasyon) etkileşimlerinin toplam bir etkisi olduğu düşünülmektedir (Ueda, Gout ve Morganti, 2003). Daha sonra sıcaklığın arttırılarak 45°C’ye çıkarılmasıyla adsorpsiyon kapasitesi %38,5 oranında azalmıştır. Şekil 3.8’deki 25°C’nin üzerindeki sıcaklık değerlerinde adsorpsiyon kapasitesindeki (Q) gözlenen düşüş, melamin ve Cu<sup>2+</sup> iyonları arasındaki etkileşimlerin azalması ve adsorpsiyonun

ekzotermik doğasından kaynaklanıyor olabilir. Bu nedenle, adsorpsiyon çalışmaları için optimum sıcaklık değeri 25°C olarak belirlenmiştir.

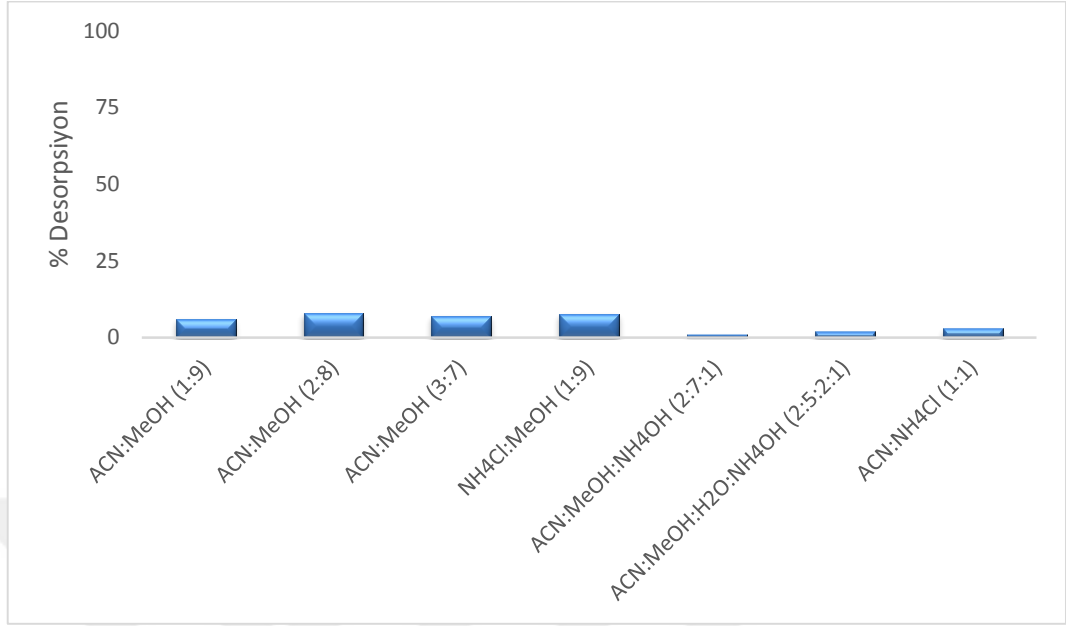


Şekil 3.8 CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> üzerine melaminin adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi (Deneysel Koşullar: 0,05 g sorbent, 0,5 µg/mL MEL, 60 dk)

### 3.3 CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> Sorbentinden Melamin Desorpsiyonu

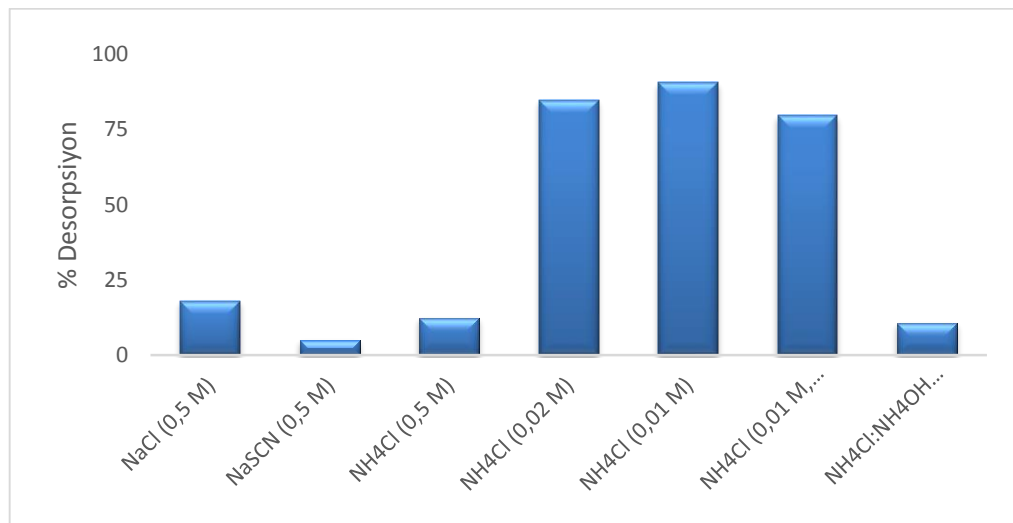
CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> sorbenti üzerine adsorplanan melaminin desorpsiyonu amacıyla farklı desorpsiyon ajanlarıyla çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.9 ve Şekil 3.10’de sunulmuştur.

CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> sorbentinden adsorplanan melaminin organik çözücüler kullanarak desorpsiyonuna ilişkin sonuçlar Şekil 3.9’da verilmiştir. Organik çözücülerle gerçekleştirilen deneylerin sonucunda desorpsiyon oranları %0-7,7 aralığında değişmektedir. Organik çözücülerle elde edilen desorpsiyon oranlarının oldukça düşük olması sebebiyle deneylerin bir sonraki aşamasında tuz çözeltileri kullanılmıştır.



Şekil 3.9 CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> sorbentinden organik çözücüler kullanarak melaminin desorpsiyonu (0,5 µg/mL MEL, 25°C, t<sub>adsorpsiyon</sub>:60 dk, t<sub>desorpsiyon</sub>: 240 dk)

CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> sorbentinden adsorplanan melaminin tuz çözeltileri kullanarak desorpsiyonuna ilişkin sonuçlar Şekil 3.10’da verilmiştir.

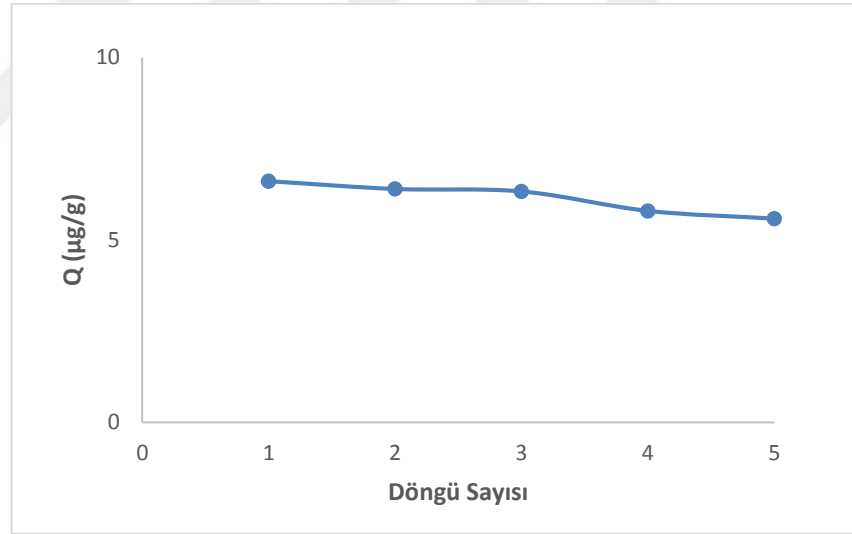


Şekil 3.10 CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> sorbentinden tuz çözeltileri kullanarak melaminin desorpsiyonu (0,5 µg/mL MEL, 25°C, t<sub>adsorpsiyon</sub>:60 dk, t<sub>desorpsiyon</sub>: 240 dk)

Şekil 3.10'deki sonuçlara bakıldığında, desorpsiyon oranları %5 ile %90,53 aralığında değişmektedir. Melamin için en yüksek desorpsiyon değeri, desorpsiyon ajanı olarak kullanılan 0,01 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  çözeltisi ile elde edilmiş olup desorpsiyon oranı % 90,53 olarak belirlenmiştir.

### 3.4 CTS-p(HEMA)- $\text{Cu}^{2+}$ Sorbentinin Tekrar Kullanılabilirlik Denemeleri

CTS-p(HEMA)- $\text{Cu}^{2+}$  sorbentinin tekrar kullanılabilirliğini belirlemek için adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü 5 kez tekrarlanmıştır. Her bir döngü sonrasında elde edilen adsorpsiyon kapasiteleri Şekil 3.11'de verilmiştir.



Şekil 3.11 CTS-p(HEMA)- $\text{Cu}^{2+}$  sorbentinin tekrar kullanılabilirliği

Şekil 3.11'den de görüldüğü üzere, 5 kez tekrarlanan adsorpsiyon-desorpsiyon işlemleri sonrasında CTS-p(HEMA)- $\text{Cu}^{2+}$  sorbentinin adsorpsiyon kapasitesinde ancak %15 oranında azalma meydana gelmiştir. Bu sonuca dayanarak sentezlenen CTS-p(HEMA)- $\text{Cu}^{2+}$  sorbentinin yüksek rejenerasyon yeteneği sayesinde melaminin adsorpsiyonunda defalarca etkin bir şekilde kullanılabileceğini söylenebilir.

### 3.5 Süt Ürünlerinde Melamin Tayini

Süt ve bebek maması örnekleri İzmir'deki yerel marketlerden satın alınıp adsorpsiyon işlemi için hazırlanmış ve optimize edilen yöntemle göre adsorpsiyonu sağlanarak, HPLC-FLD cihazında tayini gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.1 Süt ve bebek maması örneklerinden MEL adsorpsiyonu sonuçları

| Örnek | Süt                |                  | Bebek Maması       |                  |
|-------|--------------------|------------------|--------------------|------------------|
|       | Bulunan<br>(µg/mL) | %<br>Adsorpsiyon | Bulunan<br>(µg/mL) | %<br>Adsorpsiyon |
| 1     | 0,18               | 89               | 0,26               | 50               |
| 2     | 0,25               | 72               | 2,90               | 66               |
| 3     | 0,51               | 88               | 0,64               | 88               |
| 4     | 0,25               | 88               | 0,45               | 27               |
| 5     | 0,18               | 89               | N.D                | -                |
| 6     | 0,63               | 84               | N.D                | -                |

Süt ve bebek maması örneklerinden, sentezlenen CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> sorbenti üzerine melaminin adsorpsiyonuna ilişkin sonuçlar Tablo 3.1'de verilmiştir. UHT süt örneklerinden melaminin adsorpsiyonu %72-89 oranında başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Sade, hipoalerjenik, sütlü bisküvili, pirinçli sütlü gibi içeriğe sahip bebek mamalarından melamin adsorpsiyonu ise, %27-88 aralığında gerçekleştirilmiştir. Bu oranlar, süt örnekleri ile yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında bebek mamalarından melaminin adsorpsiyonun düşük olduğu gözlenmiştir. Çalışmalar sonucunda elde edilen verilere göre, sade bebek maması ile yapılan deneylerde melamin adsorpsiyon değerinin en yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bebek mamasının içerisine eklenen ilave besin maddeleri ile bebek maması matriksinin daha kompleks hale gelmesi nedeniyle melaminin adsorpsiyonunda düşüşler gözlenmiştir. Melaminin adsorpsiyonunda gerçekleşen bu düşüşlerin, matriks etkisinden dolayı melaminin CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> sorbenti ile tam olarak etkileşime girememesi sonucunda yaşandığı düşünülmektedir.



Ülkemizde Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği'ne göre melamin ve yapısal analoglarının maksimum kalıntı limitleri (MRL) gıdalar için 2,5 mg/kg, bebek formülleri ve devam formüllerinin toz halde olanları için 1,0 mg/kg olarak verilmiştir (Türk Gıda Kodeksi, 2012). Yapılan çalışmalar sonucunda, süt örneklerindeki melamin miktarının yasal limitler içerisinde olduğu belirlenmiştir. Bebek mamalarında ise, çalışılan altı bebek maması örneğinden bir tanesinde yasal limitleri aşan oranda melamin varlığı tespit edilmiştir.

### 3.6. Yöntemin Analitik Performans Parametrelerinin Belirlenmesi

Melamin tayininde kullanılmak üzere geliştirilen HPLC-FLD yönteminin analitik performans parametreleri optimize edilen koşullar altında süt ve bebek maması örnekleri için belirlenmiş ve sonuçlar Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2 HPLC-FLD yönteminin süt ve bebek maması kullanarak elde edilen analitik performans parametreleri

| Parametreler                             | Süt                     | Bebek Maması           |
|------------------------------------------|-------------------------|------------------------|
| Kalibrasyon Eşitliği                     | $y = 749,17 x + 1379,6$ | $y = 876,63 x - 50875$ |
| Korelasyon Katsayısı ( $R^2$ )           | 0,999                   | 0,998                  |
| Kalibrasyon Aralığı ( $\mu\text{g/mL}$ ) | 0,025-0,2               | 0,125-1                |
| LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )                 | 0,0049                  | 0,0416                 |
| LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )                 | 0,0150                  | 0,1261                 |

Melamin tayininde kullanılmak üzere geliştirilen yöntem ile süt ve bebek maması örneklerinden geri kazanım sonuçları Tablo 3.3'de verilmiştir. Buna göre, süt örnekleri için geri kazanım oranlarının %92,06-103,02 arasında değiştiği bebek maması örnekleri için ise, bu oranların %78,40-93,03 arasında değiştiği belirlenmiştir.

Tablo 3.3 Süt ve bebek maması örneklerinden geri kazanım sonuçları

| Örnek           | Eklenen<br>(µg/mL) | Bulunan<br>(µg/mL) | Geri kazanım<br>(%) | RSD<br>(%) |
|-----------------|--------------------|--------------------|---------------------|------------|
| Süt             | 0,6                | 0,71               | 92,06               | 0,10       |
|                 | 0,8                | 0,97               | 99,50               | 0,09       |
|                 | 1                  | 1,21               | 103,02              | 0,34       |
| Bebek<br>Maması | 0,6                | 0,68               | 78,40               | 0,16       |
|                 | 0,8                | 0,90               | 84,18               | 1,21       |
|                 | 1                  | 1,18               | 93,03               | 0,10       |

Süt ve bebek maması örneklerinden melamin tayini için optimize edilen yöntemden elde edilen tespit limiti (LOD), tayin limiti (LOQ) ve geri kazanım değerlerinin rapor edilen diğer kromatografik yöntemlerle karşılaştırılması Tablo 3.4’de verilmiştir.

Süt ve süt ürünlerinden melaminin tayininde literatürde yer alan diğer kromatografik yöntemlerle geliştirilen yöntem karşılaştırıldığında, bu yöntemin duyarlılığının ve kesinliğinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Buna ek olarak, süt ve bebek maması örneklerine belirli konsantrasyonlarda (0,6, 0,8, 1 µg/mL) eklenen standart melamin çözeltileri ile elde edilen geri kazanım oranları süt ve bebek maması için sırasıyla %92,06-103,02 ve %78,40-93,03 aralığındadır. Elde edilen bu geri kazanım değerlerinin yüzde bağıl standart sapma (% RSD) değeri geliştirilen yöntemin kesinliğini vermektedir ve süt ve bebek maması için % RSD değeri sırasıyla % 0,1-0,34 ve %0,1-1,21 aralığındadır. Bu sonuçlar, geliştirilen yöntemin süt ve bebek maması örneklerindeki melamin tayini için tekrarlanabilirliğinin oldukça yeterli olduğunu göstermektedir.

Tablo 3.4 Süt ve bebek mamasından melamin tayini için literatürde yer alan bazı kromatografik yöntemler

| Analitik Metod          | Matrix              | LOD<br>(µg/mL) | LOQ<br>(µg/mL) | Geri Kazanım<br>(%) | RSD<br>(%)       | Referans                      |
|-------------------------|---------------------|----------------|----------------|---------------------|------------------|-------------------------------|
| <b>HPLC-FLD</b>         | <b>Süt</b>          | <b>0,005</b>   | <b>0,015</b>   | <b>92-103</b>       | <b>0,09-0,34</b> | <b>Bu çalışmada</b>           |
|                         | <b>Bebek Maması</b> | <b>0,042</b>   | <b>0,126</b>   | <b>78-93</b>        | <b>0,10-1,21</b> |                               |
| HPLC-DAD/SPE            | Süt                 | 18,00          | 60,00          | 85-99               | 2,30-3,70        | Sun ve diğer., 2010c          |
| CE-DAD                  | Süt                 | 0,047          | 0,050          | 94-97               | 3,09-4,20        | Chen ve Yan, 2009             |
| CZE-DAD                 | Süt                 | 0,053          | 0,176          | 89-96               | 1,84-2,45        | Xia ve diğer., 2010           |
| CZE-UV                  | Süt                 | 0,250          | -              | 96-101              | 3,90-4,10        | Meng ve diğer., 2009          |
| DPP-CV                  | Süt                 | 0,037          | 0,126          | 95                  | 2,10             | Yilmaz ve Yazar, 2012         |
| GC-MS                   | Süt                 | 0,010          | 0,050          | 95-102              | 3,10-8,70        | Xu ve diğer., 2009            |
| GC-MS                   | Süt                 | 0,010          | -              | 85-99               | 4,70-5,50        | Pan ve diğer., 2013           |
| HILIC-ESI/MS            | Süt                 | 0,250          | 0,840          | 93-96               | 0,97-4,08        | Xia ve diğer., 2010b          |
| LC-ESI-MS/MS            | Süt                 | 0,025          | 0,050          | 102-107             | 3,00-6,10        | Desmarchelier ve diğer., 2009 |
| PMME-LC-UV              | Süt                 | 0,024          | 0,080          | 87-97               | 2,0-6,30         | Peng ve diğer., 2011          |
| UV-Vis Spektrofotometre | Süt                 | 0,040          | 0,120          | 92-99               | 5,26-8,18        | Kumar ve diğer., 2016         |
| HPLC-DAD                | Süt                 | 0,110          | 0,320          | 95-116              | 1,50             | Filazi ve diğer., 2012        |
|                         | Bebek Maması        | 0,090          | 0,280          | 97-122              | 1                |                               |
| HPLC-UV                 | Süt                 | 0,030          | 0,090          | 98-101              | 1,80-3,60        | Lutter ve diğer., 2011        |
|                         | Bebek Maması        | 0,060          | 0,180          | 89-92               | 1,20-2,70        |                               |
| HPLC-DAD                | Süt ve Bebek Maması | 0,200          | 1,000          | 81-83               | -                | He ve diğer., 2008            |
| HPLC-UV                 | Bebek Maması        | 0,100          | 0,200          | 97-101              | < 1,0            | Venkatasami ve Sowa, 2010     |
| LC-MS/MS                | Bebek Maması        | -              | 0,250          | 71-109              | 5,70-16,50       | Turnipseed ve diğer., 2008    |

HPLC-FLD: High-performance liquid chromatography with fluorescence detection, HPLC-DAD/SPE: High-performance liquid chromatography-diode array detection with solid-phase extraction, CE-DAD: Capillary electrophoresis with diode array detector, CZE-DAD: Capillary zone electrophoresis with diode array detector, DPP-CV: Differential pulse polarography with cyclic voltammetry GC-MS: Gas chromatography-mass spectrometry, HILIC-ESI/MS: Hydrophilic interaction liquid chromatography-electrospray mass spectrometry, LC-ESI-MS/MS: Liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry, PMME: On-line polymer monolith microextraction coupled to high-performance liquid chromatography, LC-MS/MS: Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry.

## BÖLÜM DÖRT

### SONUÇLAR

Bu çalışmada, kompleks matriksli gıdalardan toksik melaminin uzaklaştırılması ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile tayini öncesi ekstraksiyonunda kullanılmak üzere bir metal şelat etkileşimlerine dayalı yeni nesil immobilize metal şelat afinite sorbenti (İMAK) sentezlenmiştir.

Toksik melaminin uzaklaştırılması ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile tayini öncesi ekstraksiyonunda kullanılması amacıyla sentezlenen CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> İMAK sorbentinin karakterizasyonu fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (FTIR), taramalı elektron mikroskobu (SEM), termogravimetrik analiz (TGA) ve şişme testi ile gerçekleştirilmiştir. Karakterizasyonu yapılan CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> İMAK sorbenti üzerine melaminin adsorpsiyon koşullarının optimizasyonu amacıyla pH, sorbent miktarı, süre, başlangıç melamin derişimi, sıcaklık gibi melamin adsorpsiyonunu etkileyebilecek parametreler çalışılmıştır.

Gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda oldukça düşük miktarda CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> İMAK sorbenti ile (0,05 g sorbent) nötral pH aralığında 60 dakika gibi kısa bir sürede ve oda koşullarında (25°C) gram sorbent başına 275,38 µg melamin adsorplanabileceği belirlenmiştir. CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> İMAK sorbenti üzerine adsorplanan melaminin desorpsiyonu 0,01 M NH<sub>4</sub>Cl çözeltisi kullanılarak % 90,53 oranında gerçekleştirilmiş ve CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> İMAK sorbentinin melamin adsorsiyonunda defalarca etkin bir şekilde kullanılabileceği belirlenmiştir.

Çalışmanın bir sonraki aşamasında melamin için optimum adsorpsiyon koşulları sağlanarak geliştirilen yöntemin süt ve süt ürünlerinden (süt ve bebek maması) melaminin uzaklaştırılması ve tayini öncesi ekstraksiyonunda sentezlenen CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> sorbentinin uygulanabilirliği çalışılmıştır. Geliştirilen yöntemin süt

ve bebek maması gibi kompleks gıdalardaki melaminin MRL düzeyinde tayinine olanak sağladığı belirlenmiştir. Ayrıca sentezlenen CTS-p(HEMA)-Cu<sup>2+</sup> sorbenti ile süt örneklerindeki melaminin %70-90 oranında, mama örneklerindeki melaminin ise %25-90 oranında (matriks etkisi nedeniyle oran süte kıyasla düşük) uzaklaştırılabileceği görülmektedir.

Tablo 3.3'e bakıldığında, süt ve bebek maması örneklerinden HPLC-FLD yöntemiyle melamin tayininde geri kazanım oranları süt ve bebek maması için sırayla %92,06-103,02 ve %78,40-93,03 arasında değiştiği görülmektedir. Belirli koşullar altında elde edilen analiz sonuçlarının gerçek değere olan yakınlığı doğruluğu ifade eder ve bir analitik yöntemin doğruluğu geri kazanım çalışmaları ile belirlenir. Bu nedenle, süt ve bebek maması için geri kazanım oranları kabul edilebilir limitler (%80-110) içindedir.

Çalışılan koşullar altında analit için bulunan ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığı ise kesinlik olarak ifade edilmektedir ve geri kazanım değerlerinin %RSD'lerine bakıldığında ise süt ve bebek maması için sırasıyla <0,34 ve <1,21 olarak bulunmuştur.

Bir analitik yöntemin geçerli olabilmesi için geri kazanım oranları %80-110 arasında olması gerekmektedir (Wood, Nilsson, ve Wallin, 1998). Dolayısıyla bu çalışmayla geliştirilen yöntemin geri kazanım oranları kabul edilebilir limitler (%80-110) aralığındadır. Ayrıca, Tablo 3.4 incelendiğinde %RSD oranlarının literatürdeki birçok çalışmadan daha düşük olduğu görülmektedir. Dolayısıyla geliştirilen yöntemin kesinliğinin daha yüksek olduğu söylenebilir. Ayrıca bu çalışmayla geliştirilen yöntemin gerçek örneklerdeki LOD ve LOQ değerleri de literatürdeki birçok çalışmaya kıyasla daha düşüktür (Tablo 3.4). Bu durumda bu yöntemin süt ve bebek maması gibi kompleks gıda örneklerindeki melaminin yüksek doğruluk ve kesinlikte, tekrarlanabilir tayini amacıyla kullanılabileceği düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- Arnold, F. H. (1991). Metal-affinity separations: A new dimension in protein processing. *Nature Biotechnology*, 9, 151–156.
- Arslan, O. (2001). Inhibition of bovine carbonic anhydrase by new sulfonamide compounds. *Biochemistry (Moscow)*, 66 (9), 1206-1208.
- Belew, M. ve Porath, J. (1990). Immobilized metal-ion affinity chromatography. Effect of solute structure, ligand density and salt concentration on the retention of peptides. *Journal of Chromatography*, 516 (2), 333-354.
- Braekevelt, E., Lau, B. P.–Y., Feng, S., Ménard, C. ve Tittlemier, S. A. (2011). Determination of melamine, ammeline, ammelide and cyanuric acid in infant formula purchased in Canada by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 28 (6), 698–704.
- Brown, C. A., Jeong, K. S., Poppenga, R., Puschner, B., Miller, D., M., Ellis, A., Kang, K. I., Sum, S., Cistola, A. M. ve Brown, S. A. (2007). Outbreaks of renal failure associated with melamine and cyanuric acid in dogs and cats in 2004 and 2007. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 19 (5), 525–531.
- Camel, V. (2003). Solid phase extraction of trace elements. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 58 (7), 1177–1233.
- Cao, X., Shen, F., Zhang, M. ve Sun, C. (2014). Rapid and highly-sensitive melamine sensing based on the efficient inner filter effect of Ag nanoparticles on the fluorescence of eco-friendly ZnSe quantum dots. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 202, 1175-1182.

- Chaga, G. S. (2001). Twenty-five years of immobilized metal ion affinity chromatography: past, present and future. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 49 (1-3), 313-334.
- Chan, E. Y. Y., Griffiths, S. M. ve Chan, C. W. (2008). The public health risk of melamine in milk products. *Lancet*, 372 (9648), 1444-1445.
- Charcosset, C. (1998). Review: Purification of proteins by membrane chromatography. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 71 (2), 95-110.
- Chen, Z. ve Yan X. (2009). Simultaneous determination of melamine and 5-hydroxymethylfurfural in milk by capillary electrophoresis with diode array detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 8742-8747.
- Cheng, W., Liu, Z. ve Wang, Y. (2013). Preparation and application of surface molecularly imprinted silica gel for selective extraction of melamine from milk samples. *Talanta*, 116, 396-402.
- Codex Alimentarius Commission. (2010). *Codex Alimentarius Commission (CAC) Codex general standard for contaminants and toxins in food and feed (Codex Standard 193-1995)*. 7 mayıs 2011, [http://www.codexalimentarius.net/download/standards/17/CXS\\_193e.pdf](http://www.codexalimentarius.net/download/standards/17/CXS_193e.pdf).
- Comiskey, B., Albert, J. D., Yoshizawa, H. ve Jacobson, J., (1998). An electrophoretic ink for all-printed reflective electronic displays. *Nature*, 394, 253-255.
- Deng, X., Guo, D., Zhao, S., Han, L., Sheng, Y., Yi, X., Zhou, Y. ve Peng, T. (2010). A novel mixed-mode solid phase extraction for simultaneous determination of melamine and cyanuric acid in food by hydrophilic interaction chromatography

coupled to tandem mass chromatography. *Journal of Chromatography B*, 878, 2839–2844.

Desmarchelier, A., Cuadra, M. G., Delatour, T. ve Mottier, P. (2009). Simultaneous quantitative determination of melamine and cyanuric acid in cow's milk and milk-based infant formula by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (16), 7186–7193.

Dobson, R. L. M., Motlagh, S., Quijano, M., Cambron, R. T., Baker, T. R., Pullen, A. M., Regg, B.T., Bigalow-Kern, A. S., Vennard, T., Fix, A., Reimschuessel, R., Overmann, G., Shan, Y. ve Daston, G. P. (2008). Identification and characterization of toxicity of contaminants in pet food leading to an outbreak of renal toxicity in cats and dogs . *Toxicological Sciences*, 106 (1), 251–262.

EFSA (European Food Safety Authority) (2008). Risks for public health due to the presences of melamine in infant milk and other milk products in China. *EFSA Journal*, 807, 1–10.

Erdem, E., Karapinar, N. ve Donat, R. (2004). The removal of heavy metal cations by natural zeolites. *Journal of Colloid and Interface Science*, 280, 309-314.

Erkmen, O. (2010). Gıda kaynaklı tehlikeler ve güvenli gıda üretimi. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 53, 220-235.

FDA (Food and Drug Administration of USA) (2008). *Melamine pet food recall of 2007*. 22 temmuz 2016, <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/SafetyHealth/RecallsWithdrawals/ucm129575.htm>.



- Filazi, A., Sireli, U. T., Ekici, H., Can, H. Y. ve Karagoz, A. (2012). Determination of melamine in milk and dairy products by high performance liquid chromatography. *Journal of Dairy Science*, 95 (2), 602-608.
- Finete, V. L., Gouvêa, M. M., Marques, F. F. C. ve Netto, A. D. P. (2014). Characterization of newfound natural luminescent properties of melamine, and development and validation of a method of high performance liquid chromatography with fluorescence detection for its determination in kitchen plastic ware. *Talanta*, 123, 128-34.
- Gaberc-Porekar, V. ve Menart, V. (2001). Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 49 (1-3), 335-360.
- Ge, X., Wu, X., Liang, S. ve Sun, H. (2014). A sensitive and validated HPLC method for the determination of cyromazine and melamine in herbal and edible plants using accelerated solvent extraction and cleanup with SPE. *Journal of Chromatographic Science*, 52, 751-757.
- Goldstein, G. (1967). Ligand exchange chromatography of nucleotides, nucleosides and nucleic acid bases, *Analytical Biochemistry*, 20 (3), 477-483.
- Gossner, C. M.-E., Schlundt, J., Embarek, P. B., Hird S., Lo-Fo-Wong, D., Beltran J. J. O., Teoh K. N. ve Tritscher A. (2009). The melamine incident: implications for international food and feed safety. *Environmental Health Perspectives*, 117 (12), 1803-1808.
- Hage, D. S. (1999). Affinity chromatography: A review of clinical applications. *Clinical Chemistry*, 45 (5), 593-615.
- Hage, D. S. (2006). Introduction and Basic Concepts. D.S. Hage ve J. Cazes (Ed.), *Handbook of Affinity Chromatography* içinde (1-101). Boca Raton: CRC Pres.

- Hage, D. S. ve Clarke, W. (2004). Affinity Chromatography: An Overview. J. Cazes (Ed.), *Encyclopedia of Chromatography* içinde (40-43). New York: Marcel Dekker.
- Hau, A. K., Kwan, T. H. ve Li, P. K., (2009). Melamine toxicity and the kidney. *Journal of The American Society Of Nephrology*, 20, 245–250.
- He, D., Zhang, X., Gao, B., Wang, L., Zhao, Q., Chen, H., Wang, H. ve Zhao, C. (2014). Preparation of magnetic molecularly imprinted polymer for the extraction of melamine from milk followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Control*, 36, 36-41.
- He, L., Su, Y., Zheng, Y., Huang, X., Wu, L., Liu, Y., Zeng, Z. ve Chen, Z. (2009). Novel cyromazine imprinted polymer applied to the solid-phase extraction of melamine from feed and milk samples. *Journal of Chromatography A*, 1216, 6196–6203.
- He, Q. S., Liu, M. F., Huang, L. Y., Yang, Y. Y. ve Liao, S. F. (2008). Determination of melamine in milk powder and milk by high performance liquid chromatography. *Chinese Journal of Chromatography*, 26, 752-754.
- Hu, Y., Feng, S., Gao F., Li-Chan, E. C. Y., Grant, E. ve Lu, X. (2015). Detection of melamine in milk using molecularly imprinted polymers–surface enhanced Raman spectroscopy. *Food Chemistry*, 176, 123-129.
- Huang, H-Y., Lin, C-L., Jiang, S-H., Singco, B. ve Cheng, Y-J. (2012). Capillary electrochromatography–mass spectrometry determination of melamine and related triazine by-products using poly(divinyl benzene-alkene-vinylbenzyl trimethylammonium chloride) monolithic stationary phases. *Analytica Chimica Acta*, 719, 96–103.

- Kagedal, L. (2011). Immobilized metal ion affinity chromatography. J. C. Janson ve L. Ryden (Ed.), *Protein purification: principles, high-resolution methods and applications* (3. Baskı) içinde (183-201). Wiley, New York.
- Kamihira, M., Kaul, R. ve Mattiasson, B. (1992). Purification of recombinant protein A by aqueous two-phase extraction integrated with affinity precipitation. *Biotechnology and Bioengineering*, 40 (11), 1381-1387.
- Khedr, A. (2013). Optimized extraction method for LC–MS determination of bisphenol A, melamine and di (2-ethylhexyl) phthalate in selected soft drinks, syringes and milk powder. *Journal of Chromatography B*, 930, 98–103.
- Klein, E. (1991). *Affinity membranes: their chemistry and performance in adsorptive separation processes*. Newyork: John Wiley and Sons Interscience.
- Kokotou, M. G. ve Thomaidis, N. S. (2012). Behavior and retention models of melamine and its hydrolysis products. *Chromatographia*, 75 (9), 457-465.
- Kráčalíková, K., Tishchenko, G. ve Bleha, M. (2006). Effect of the matrix structure and concentration of polymer-immobilized Ni<sup>2+</sup>–iminodiacetic acid complexes on retention of IgG 1. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 67 (1), 7-25.
- Kumar, N., Kumar, H., Mann, B. ve Seth, R. (2016). Colorimetric determination of melamine in milk using unmodified silver nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 156, 89–97.
- Kumpalume, P. ve Ghose, S. (2003). Chromatography: The High-Resolution Technique for Protein Separation. R. Hatti-Kaul ve B. Mattiasson (Ed.), *Isolation and Purification of Proteins* içinde (29-56), New York: Marcel Dekker.
- Li, L., Luo, J., Xu, Q. ve Lefferts S. (2009). A fast method for determination of melamine in liquid milk and milk powder by HPLC with UV detection. *American laboratory*, 41 (11), 38-41.

- Liang, R., Zhang, R. ve Qin, W. (2009). Potentiometric sensor based on molecularly imprinted polymer for determination of melamine in milk. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 141, 544-550.
- Lowe, C. R. ve Pearson, J. C. (1984). Affinity chromatography on immobilized dyes. *Methods in Enzymology*, 104, 97-113.
- Lutter, P., Savoy-Perroud, M-C., Campos-Gimenez, E., Meyer, L., Goldmann, T., Bertholet, M-C., Mottier, P., Desmarchelier, A., Monard, F., Perrin, C., Robert, F., ve Delatour, T. (2009). Screening and confirmatory methods for the determination of melamine in cow's milk and milk-based powdered infant formula: Validation and proficiency-tests of ELISA, HPLC-UV, GC-MS and LC-MS/MS. *Food Control*, 22 (6), 903-913.
- Magdeldin, S. ve Moser, A. (2012). Affinity chromatography: principles and applications. Dr. S. Magdeldin (Ed.), *Affinity Chromatography* içinde (1-24) Croatia: InTech.
- Melnick, R. L., Boorman, G. A., Haseman, J. K., Montali, R. J. ve Huff, J. (1984). Urolithiasis and bladder carcinogenicity of melamine in rodents. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 72 (2), 292-303.
- Meng, L., Shen, G., Hou, X. ve Wang, L. (2009). Determination of melamine in food by SPE and CZE with UV detection. *Chromatographia*, 70, 991-994.
- Ming, F. ve Howell, J. A. (1991). Resolution and productivity of conalbumin and lysozyme from fresh egg-white loaded at very high flow rate on a 250-mm length CM-HVFM column. *Bioseparation*, 2 (5), 289-295.
- Muniz-Valencia, R., Ceballos-Magana, S. G., Rosales Martinez, D., Gonzalo Lumbreras, R., Santos- Montes, A., Cubedo-Fernandez-Trapiella, A. ve

- Izquierdo-Hornillos, R. C. (2008). Method development and validation for melamine and its derivatives in rice concentrates by liquid chromatography. Application to animal feed samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392 (3), 523-531.
- Ocarra, P., Barry S. ve Griffin T. (1974). Spacer arms in affinity chromatography: use of hydrophilic arms to control or eliminate nonbiospecific adsorption effects. *Febs Letters*, 43 (2), 169-175.
- Pan, X.-D., Wu, P.-G., Yang, D.-J., Wang, L.-Y., Shen X.-H. ve Zhu, C.-Y. (2013). Simultaneous determination of melamine and cyanuric acid in dairy products by mixed-mode solid phase extraction and GC–MS. *Food Control*, 30 (2), 545-548.
- Pearson, R. G. (1968). Hard and soft acids and bases, HSAB, part 1: Fundamental principles. *Journal of Chemical Education*, 45 (9), 581.
- Peng, X.-T., Shi, Z.-G. ve Feng, Y.-Q. (2011). Rapid and high-throughput determination of melamine in milk products and eggs by full automatic on-line polymer monolith microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. *Food Analytical Methods*, 4 (3), 381-388.
- Peters, F. T., Drummer, O. H. ve Musshoff, F. (2007). Validation of new methods. *Forensic Science International*, 165, 216-224.
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. ve Belfrage, B. (1975). Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fraction, *Nature*, 258, 598–599, 6896–6905.
- Prasanna, R. R. ve Vijayalakshmi, M. A. (2010). Immobilized metal-ion affinity systems for recovery and structure–function studies of proteins at molecular, supramolecular, and cellular levels. *Pure and Applied Chemistry*, 82 (1), 39-55.

- Qi, Y., Li, G., Wei, C., Zhao, L. ve Gong, B. (2016). Preparation of Magnetic Molecularly Imprinted Polymer for Melamine and its Application in Milk Sample Analysis by HPLC. *Journal of Biomedical Sciences*, 5, 2-16.
- Rosenfeld, J. M. (1999). Solid-phase analytical derivatization: Enhancement of sensitivity and selectivity of analysis. *Journal of Chromatography A*, 843 (1-2), 19–27.
- Sulkowski, E. (1989). The saga of IMAC and MIT. *Bioessays*, 10 (5), 170–175.
- Sun, F., Ma, W., Xu, L., Zhu, Y., Liu, L., Peng, C., Wang, L., Kuang, H. ve Xu, C., (2010a). Analytical methods and recent developments in the detection of melamine. *Trends in Analytical Chemistry*, 29 (11), 1239–1249.
- Sun, H., Liu, N., Wang, L. ve He, P. (2010b). Determination of melamine residue in liquid milk by capillary electrophoresis with solid-phase extraction. *Journal of Chromatographic Science*, 48 (10), 848-53.
- Sun, H., Wang, L., Ai, L., Liang, S. ve Wu, H. (2010c). A sensitive and validated method for determination of melamine residue in liquid milk by reversed phase high-performance liquid chromatography with solid-phase extraction. *Food Control*, 21 (5), 686-691.
- Taverniers, I., De Loose, M. ve Bockstaele, E. V. (2004). Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends in Analytical Chemistry*, 23, 535-552.
- Tran, B. N., Okoniewski, R., Storm, R., Jansing, R. ve Aldous, K. M. (2010). Use of methanol for the efficient extraction and analysis of melamine and cyanuric acid residues in dairy products and pet foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 101–107.

Turkova, J. (2002). Affinity chromatography. V. A. Vijayalakshmi, (Ed.), *Biochromatography- theory and practice* içinde (142-224). London: Taylor and Francis.

Turnipseed, S. B., Casey, C., Nochetto, C. ve Heller, D. N. (2008). Determination of melamine and cyanuric acid residues in infant formula using LC-MS/MS. *Laboratory Information Bulletin*, 24, 1–13.

Türk Gıda Kodeksi, (2012).  
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2012/12/20121219-10.html>

Tyan, Y-C, Yang, M-H, Jong, S-B, Wang, C-K ve Shiea, J. (2009). Melamine contamination. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395 (3), 729–735.

Ueda E. K. M, Gout P. W. ve Morganti L. (2003). Current and prospective applications of metal ion–protein binding. *Journal of Chromatography A*, 988, 1–23.

Vadivelan, V. ve Vasanth Kumar, K. (2005). Equilibrium, kinetics, mechanism, and process design for the sorption of methylene blue onto rice husk. *Journal of Colloid and Interface Science*, 286, 90–100.

Vasimalai, N. ve John, S. A. (2013). Picomolar melamine enhanced the fluorescence of gold nanoparticles: Spectrofluorimetric determination of melamine in milk and infant formulas using functionalized triazole capped gold nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*, 42, 267–272.

Venkatasami, G. ve Sowa, J. R. (2010). A rapid, acetonitrile-free, HPLC method for determination of melamine in infant formula. *Analytica Chimica Acta*, 665, 227–230.

- Wagers, K., Chui, T. ve Adem, S. (2014). Effect of pH on the stability of gold nanoparticles and their application for melamine detection in infant formula. *IOSR Journal of Applied Chemistry (IOSR-JAC)*, 7, 2278-5736.
- Wang, M., She, Y., Du, X., Huang, Y., Shi, X., Jin, M., Jin, M., Shao, H. ve Wang, J. (2013). Determination of melamine using magnetic molecular imprinted polymers and high performance liquid chromatography. *Analytical Letters*, 46, 120–130.
- Wang, S. ve Li, H. (2007). Kinetic modelling and mechanism of dye adsorption on unburned carbon. *Dyes and Pigments*, 72, 308-314.
- Wang, T., Xuan, R., Ma, J., Tan, Y., Jin, Z., Chen, Y., Zhang, L. ve Zhang, Y. (2016). Using activated attapulgite as sorbent for solid-phase extraction of melamine in milk formula samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408, 6671–6677.
- Wang, T., Zhu, Y., Ma, J., Xuan, R., Gao, H., Liang, Z., Zhang, L. ve Zhang, Y. (2015). Hydrophilic solid-phase extraction of melamine with ampholine-modified hybrid organic-inorganic silica material. *Journal of Separation Science*, 38 (1), 87-92.
- Wang, Z., Ma, X., Zhang, L., Yang, W., Gong, W., Gong, L., He P. ve Li, Z. (2010). Screening and determination of melamine residues in tissue and body fluid samples. *Analytica Chimica Acta*, 662 (1), 69-75.
- WHO (World Health Organization). (2009). *Toxicological and health aspects of melamine and cyanuric acid. Report of a WHO Expert Meeting In collaboration with FAO Supported by Health Canada, Geneva.* 1-4 aralık 2008, [www.who.int/foodsafety/publications/chem/Melamine\\_report09.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/chem/Melamine_report09.pdf).
- Wilchek, M. ve Chaiken, I., (2000). An Overview of Affinity Chromatography. P. Bailon, G.K. Ehrlich, Wen-Jian Fung ve W. Berthold (Ed.), *Affinity*



- Chromatography-Methods and Protocols* içinde (1-6). New Jersey: Humana Press.
- Wood, R., Nilsson, A. ve Wallin, H. (1998). *Quality in the Food Analysis Laboratory*. Londra: Royal Society of Chemistry (RSC) Publishing.
- Wu, F., Zhu, Y. ve Jia, Z. (2006). Preparation of dye–ligand affinity chromatographic packings based on monodisperse poly(glycidylmethacrylate-co-ethylenedimethacrylate) beads and their chromatographic properties. *Journal of Chromatography A*, 1134, 45.
- Xia, J., Zhou, N., Liu, Y., Chen, B., Wu, Y. ve Yao, S. (2010). Simultaneous determination of melamine and related compounds by capillary zone electrophoresis. *Food Control*, 21, 912–918.
- Xia, J., Zhou, N., Zhou, C., Chen, B., Wu, Y. ve Yao, S. (2010b). Simultaneous determination of melamine and related compounds by hydrophilic interaction liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 33, 2688–2697.
- Xia, X., Ding, S., Li, X., Gong, X., Zhang, S., Jiang, H., Li, J. ve Shen, J. (2009). Validation of a confirmatory method for the determination of melamine in egg by gas chromatography–mass spectrometry and ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 651, 196–200.
- Xu, X-M., Ren, Y-P., Zhu, Y., Cai, Z-X., Han, J-I., Huang, B-F. ve Zhu, Y. (2009). Direct determination of melamine in dairy products by gas chromatography/mass spectrometry with coupled column separation. *Analytica Chimica Acta*, 650, 39–43.

- Yang, H., Zhou, W., Guo, X., Chen, F., Zhao, H., Lin, L. ve Wang, X. (2009). Molecularly imprinted polymer as SPE sorbent for selective extraction of melamine in dairy products. *Talanta*, 80, 821–825.
- Yilmaz, Ü. T. ve Yazar, Z. (2012). Determination of melamine by differential pulse polarography/application to milk and milk powder. *Food Analytical Methods*, 5 (1), 119-125.
- Yuan, Y., Xu, C. L., ve Peng, C. F. (2008). Analytical methods for the detection of corticosteroids-residues in animal-derived foodstuffs. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 38 (4), 227–241.
- Zeng, X. ve Ruckenstein, E. (1999). Membrane chromatography: preparation and applications to protein separation. *Biotechnology Progress*, 15 (6), 1003-1019.
- Zhang, Y., Lin, S., Jiang P., Zhu, X., Ling, J., Zhang, W. ve Dong, X. (2014). Determination of melamine and cyromazine in milk by high performance liquid chromatography coupled with online solid-phase extraction using a novel cation-exchange restricted access material synthesized by surface initiated atom transfer radical polymerization. *Journal of Chromatography A*, 1337, 17-21.
- Zhao, S., Deng, X., Yi, X. ve Wu, Q. (2012). Simultaneous determination of melamine and cyanuric acid in UFFS by solid phase extraction-hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry. *Chinese journal of chromatography*, 30 (7), 677-83.
- Zhu, Y., Zhang, Y., Li, J., Han, Y., Dong, G. ve Zhang, H. (2011). Determination of melamine in fresh milk by electrochemistry with solid phase microextraction at bismuthyl chloride modified graphite epoxy composite electrode. *American Journal of Analytical Chemistry*, 2, 612-618.

Zief, M. ve Kiser, R. (2005). *Solid Phase Extraction for Sample Preparation*.  
Phillipsburg: J.T. Baker.

Zou, H., Luo, Q. ve Zhou, D. (2001). Affinity membrane chromatography for the  
analysis and purification of proteins. *Journal of Biochemical and Biophysical  
Methods*, 49 (1-3), 199-240.

