



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



DOKTORA

**FENOLİK BİLEŞİKLERİN SEÇİMLİ AYRIMI VE
TAYİNİNDE YENİ MALZEMELERDEN
YARARLANILMASI**

Şeyda KARAMAN ERSOY

Kimya Anabilim Dalı

Analitik Kimya Programı

Danışman

Prof. Dr. Esmâ TÜTEM

II. Danışman

Prof. Dr. Cevdet NERGİZ

Haziran, 2014

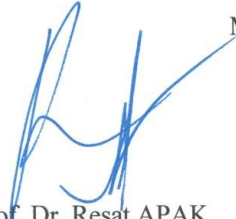
İSTANBUL

Bu çalışma 25/06/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Analitik Kimya programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi:



Prof. Dr. Esmâ TÜTEM (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



Prof. Dr. Reşat APAK
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



Prof. Dr. Ayhan BOZKURT
Fatih Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi



Doç. Dr. Kevser SÖZGEN BAŞKAN
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



Prof. Dr. Gülaçtı TOPÇU
Bezmîâlem Vakıf Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin
10974 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans ve doktora öğrenimim boyunca birikimlerini benimle paylaşan ve olumlu düşünceleriyle beni teşviklendiren, bilgi ve yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Esmâ Tütem'e, tez çalışmalarım boyunca gösterdiği her türlü imkan, destek ve yardımlarından dolayı Prof. Dr. Reşat Apak'a, en derin ve içten şükranlarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez dönemim boyunca imkan ve desteğinden dolayı Prof. Dr. Cevdet Nergiz'e ve tez izleme jürisinde yer alan sayın hocam Prof. Dr. Ayhan Bozkurt'a tez çalışmalarımın verdiği katkılardan dolayı teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince her zaman desteğini hissettiğim ve göstermiş olduğu hoşgörü ve yardımlarından dolayı Doç. Dr. Kevser Sözgen Başkan'a, aynı süre boyunca desteğini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Yüksek Kimyager Ayşe Demir Korkmaz, Seda Özen'e ve daha ismini sayamadığım sevgili hocalarıma, arkadaşlarıma en içten dileklerle teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca yanımda olup desteklerini benden esirgemeyen sevgili anneme, babama ve eşime yürekten teşekkür ederim.

Tezimle aynı adı taşıyan 10974 numaralı doktora tez projesine maddi destek sağlayan İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne ve P50021001_2 (1393) numaralı projeye maddi destek sağlayan Fatih Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

Haziran, 2014

Şeyda KARAMAN ERSOY

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

| | |
|--|----------|
| ÖNSÖZ..... | i |
| İÇİNDEKİLER | ii |
| ŞEKİL LİSTESİ..... | vi |
| TABLO LİSTESİ | x |
| SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ | xii |
| ÖZET..... | xiv |
| SUMMARY | xvi |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 2. GENEL KISIMLAR | 5 |
| 2.1. MOLEKÜLER BASKILI POLİMERLER (MOLECULARLY IMPRINTED POLYMERS, MIP) | 5 |
| 2.1.1. Kovalent Baskılama Yöntemi | 6 |
| 2.1.2. Non-Kovalent Baskılama | 7 |
| 2.1.3. Moleküler Baskılı Polimerlerin Temel Bileşenleri | 8 |
| 2.1.3.1. Kalıp Molekül (<i>Template, Target Molecule</i>) | 8 |
| 2.1.3.2. Fonksiyonel Monomer | 9 |
| 2.1.3.3. Çapraz Bağlayıcı | 10 |
| 2.1.3.4. Gözenek Oluşturucu (<i>Porojen</i>) Çözücü | 11 |
| 2.1.3.5. Başlatıcı | 12 |
| 2.1.4. MIP Oluşturma Yöntemleri..... | 13 |
| 2.1.4.1. Yığın (<i>Bulk</i>) Polimerizasyonu | 13 |
| 2.1.4.2. Çok Adımlı Şişme Polimerizasyonu | 14 |
| 2.1.4.3. Süspansiyon Polimerizasyonu..... | 15 |
| 2.1.4.4. Çöktürme Polimerizasyonu..... | 15 |
| 2.1.4.5. Yüzey Baskılama Polimerizasyonu | 15 |
| 2.1.4.6. Monolitik Baskıla(n)ma ile Polimerizasyon | 16 |
| 2.1.5. Moleküler Baskılı Polimerlerin Uygulama Alanları | 17 |
| 2.1.5.1. Ayırma Teknikleri | 17 |
| 2.1.5.2. Sensör Uygulamaları | 21 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 2.1.5.3. | <i>Kataliz Uygulamaları</i> | 22 |
| 2.1.5.4. | <i>İlaç Dağıtım Uygulamaları</i> | 22 |
| 2.1.6. | MIP Etkinliğinin Belirlenmesi | 22 |
| 2.1.6.1. | <i>Kesikli Temas (Batch) Testi</i> | 23 |
| 2.1.6.2. | <i>Kopma (Breakthrough) Eğrisi Tekniği</i> | 24 |
| 2.1.7. | MIP'lerin Adsorpsiyon Parametrelerinin Belirlenmesi | 24 |
| 2.1.7.1. | <i>Freundlich İzotermi</i> | 24 |
| 2.1.7.2. | <i>Langmuir İzotermi</i> | 25 |
| 2.2. | FENOLİK BİLEŞİKLER | 26 |
| 2.2.1. | Flavonoidler | 27 |
| 2.2.2. | Fenolik Asitler..... | 33 |
| 2.2.2.1. | <i>Hidroksisinnamik Asitler</i> | 33 |
| 2.2.2.2. | <i>Hidroksibenzoik Asitler</i> | 34 |
| 2.3. | KAFEİK ASİT VE KUERSETİNLE BASKILI POLİMERLERLE YAPILMIŞ ÇALIŞMALAR..... | 35 |
| 2.4. | ÇALIŞILAN DOĞAL ÖRNEKLER..... | 39 |
| 2.4.1. | Isırgan (<i>Urtica dioica</i>)..... | 39 |
| 2.4.2. | Yeşil Kahve Çekirdeği (<i>Coffea arabica</i>) | 39 |
| 2.4.3. | Siyah Çay (<i>Camellia sinensis</i>) | 40 |
| 2.4.4. | Kırmızı Soğan (<i>Allium cepa L.</i>) Kabuğu..... | 40 |
| 3. | MALZEME VE YÖNTEM | 41 |
| 3.1. | CİHAZ LİSTESİ | 41 |
| 3.2. | KİMYASAL MADDELER..... | 42 |
| 3.2.1. | Susuz THF Hazırlanması | 42 |
| 3.3. | UYGULANAN YÖNTEMLER..... | 42 |
| 3.3.1. | Fenolik Bileşiklerin Analizi için HPLC Yönteminin Geliştirilmesi | 42 |
| 3.3.2. | Moleküler Baskılı Polimer Sentezleri | 43 |
| 3.3.2.1. | <i>Uygun Monomerin Belirlenmesi</i> | 44 |
| 3.3.2.2. | <i>Uygun Gözenek Oluşturucu Çözücünün Belirlenmesi</i> | 45 |
| 3.3.2.3. | <i>Uygun Kalıp Molekül: Monomer: Çapraz Bağlayıcı Oranının Belirlenmesi</i> | 46 |
| 3.3.3. | Moleküler Baskılı Polimerlerde Kalıp Molekülün Geri Bağla(n)ma Büyüklüklerinin İncelenmesi | 46 |
| 3.3.3.1. | <i>Geri Bağla(n)maya Zaman Etkisi</i> | 46 |
| 3.3.3.2. | <i>Geri Bağla(n)maya Çözücü Etkisi</i> | 47 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 3.3.3.3. | <i>Geri Bağla(n)maya Kalıp Molekül Derişimi Etkisi</i> | 47 |
| 3.3.4. | Moleküler Baskılı Polimerlerin Adsorpsiyon Özelliklerinin Belirlenmesi | 48 |
| 3.3.4.1. | <i>Batch (Kesikli Temas) Adsorpsiyon Testi</i> | 48 |
| 3.3.4.2. | <i>Kolon denemeleri</i> | 48 |
| 3.3.4.3. | <i>Seçimlilik Denemeleri</i> | 50 |
| 3.3.5. | Moleküler Baskılı Polimerlerin Yapılarının İncelenmesi | 51 |
| 3.3.6. | Uygun Polimerlerin Morfolojilerinin İncelenmesi..... | 51 |
| 3.3.7. | Sentetik Karışımlarla Moleküler Baskılı Katı-Faz Ekstraksiyonu Uygulamaları..... | 51 |
| 3.3.7.1. | <i>Gallik asit, Kafeik asit, Kateşin, Rutin ve Kuersetin İçeren Sentetik Karışım için KUE-MISPE Uygulaması</i> | 51 |
| 3.3.7.2. | <i>Floridzin, Mirisetin ve Kuersetin İçeren Sentetik Karışım için KUE-MISPE Uygulaması</i> | 52 |
| 3.3.7.3. | <i>4-Hidroksi Benzoik Asit, Vanilik Asit, Kafeik Asit, p-Kumarik Asit ve Feruilk Asit İçeren Sentetik Karışım için KA-MISPE Uygulaması</i> | 53 |
| 3.3.8. | Doğal Örneklerle Moleküler Baskılı Katı-Faz Ekstraksiyonu Uygulamaları..... | 54 |
| 3.3.8.1. | <i>Isırgan Otu Ekstraktı Hidrolizatı için KUE-MISPE Uygulaması</i> | 55 |
| 3.3.8.2. | <i>Kırmızı Soğan Kabuğu Ekstraktı için KUE- MISPE Uygulaması</i> | 56 |
| 3.3.8.3. | <i>Kırmızı Soğan Kabuğu Ekstraktı Hidrolizatı için KUE-MISPE Uygulaması</i> | 56 |
| 3.3.8.4. | <i>Siyah Çay Ekstraktı Hidrolizatı için KUE-MISPE Uygulaması</i> | 57 |
| 3.3.8.5. | <i>Yeşil kahve Çekirdeği Ekstraktı için KUE- MISPE Uygulaması</i> | 57 |
| 3.3.8.6. | <i>Yeşil Kahve Çekirdeği Ekstraktı için KA- MISPE Uygulaması</i> | 58 |
| 4. | BULGULAR | 60 |
| 4.1. | FENOLİK BİLEŞİKLERİN HPLC KALİBRASYONLARININ SONUÇLARI..... | 60 |
| 4.2. | MIP SENTEZLERİ İÇİN OPTİMİZASYON ÇALIŞMALARI..... | 61 |
| 4.2.1. | Uygun Monomerin Belirlenmesi..... | 61 |
| 4.2.2. | Uygun Gözenek Oluşturucu Çözücünün Belirlenmesi | 62 |
| 4.2.3. | Uygun Kalıp Molekül:Monomer:Çapraz Bağlayıcı Mol Oranının Belirlenmesi | 63 |
| 4.3. | MOLEKÜLER BASKILI POLİMERLERDE KALIP MOLEKÜLÜN GERİ BAĞLA(N)MA BÜYÜKLÜKLERİNİN İNCELENMESİ | 65 |
| 4.3.1. | Geri Bağla(n)maya Zaman Etkisi..... | 65 |
| 4.3.2. | Geri Bağla(n)maya Çözücü Etkisi | 67 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 4.3.3. | Geri Bağla(n)maya Kalıp Molekül Derişimi Etkisi | 68 |
| 4.4. | MOLEKÜLER BASKILI POLİMERLERİN ADSORPSİYON ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ..... | 71 |
| 4.4.1. | Batch (Kesikli Temas) Adsorpsiyon Testi | 71 |
| 4.4.2. | Kolon Denemeleri | 80 |
| 4.4.3. | Seçimlilik Denemeleri..... | 83 |
| 4.5. | MOLEKÜLER BASKILI POLİMERLERİN YAPILARININ İNCELENMESİ..... | 85 |
| 4.6. | MOLEKÜLER BASKILI POLİMERLERİN MORFOLOJİLERİNİN İNCELENMESİ..... | 88 |
| 4.7. | SENTETİK KARIŞIMLARLA MOLEKÜLER BASKILI KATI-FAZ EKSTRAKSİYONU UYGULAMALARI | 89 |
| 4.7.1. | Gallik asit, Kafeik asit, Kateşin, Rutin ve Kuersetin İçeren Sentetik Karışım için KUE-MISPE Uygulaması | 89 |
| 4.7.2. | Floridzin, Mirisetin ve Kuersetin İçeren Sentetik Karışım için KUE-MISPE Uygulaması..... | 92 |
| 4.7.3. | 4-Hidroksibenzoik Asit, Vanilik asit, <i>p</i> -Kumarik Asit, Kafeik Asit ve Ferulik Asit İçeren Sentetik Karışım için KA-MISPE Uygulaması | 94 |
| 4.8. | DOĞAL ÖRNEKLERLE MOLEKÜLER BASKILI KATI-FAZ EKSTRAKSİYONU UYGULAMALARI | 97 |
| 4.8.1. | Isırgan Otu Ekstraktı Hidrolizatı için KUE-MISPE Uygulaması | 97 |
| 4.8.2. | Kırmızı Soğan Kabuğu Ekstraktı için KUE-MISPE Uygulaması..... | 99 |
| 4.8.3. | Kırmızı Soğan Kabuğu Ekstraktı Hidrolizatı için KUE-MISPE Uygulaması..... | 103 |
| 4.8.4. | Siyah Çay Ekstraktı Hidrolizatı için KUE-MISPE Uygulaması..... | 105 |
| 4.8.5. | Yeşil Kahve Çekirdeği Ekstraktı için KUE-MISPE Uygulaması | 107 |
| 4.8.6. | Yeşil Kahve Çekirdeği Ekstraktı için KA-MISPE Uygulaması | 110 |
| 5. | TARTIŞMA VE SONUÇ | 113 |
| 6. | KAYNAKLAR..... | 121 |
| 7. | ÖZGEÇMİŞ | 130 |

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

| | |
|---|----|
| Şekil 2.1: Moleküler baskılamanın genel şematik gösterimi. | 5 |
| Şekil 2.2: Kovalent baskılama yönteminin genel şematik gösterimi. | 6 |
| Şekil 2.3: Non-kovalent (kovalent olmayan) baskılama yönteminin şematik gösterimi. | 7 |
| Şekil 2.4: Moleküler baskılamada en çok kullanılan fonksiyonel monomerlere örnekler. | 10 |
| Şekil 2.5: Moleküler baskılamada en çok kullanılan çapraz bağlayıcılara örnekler. | 11 |
| Şekil 2.6: Moleküler baskılamada en çok kullanılan başlatıcılara örnekler. | 13 |
| Şekil 2.7: Yığın polimerizasyonunun genel şematik gösterimi. | 14 |
| Şekil 2.8: MIP sorbenti kullanılarak solid faz ekstraksiyon şeması. | 18 |
| Şekil 2.9: Kesikli temas (batch) testinin genel şematik gösterimi. | 23 |
| Şekil 2.10: Adsorpsiyon işleminde dinamik kolon kapasitesinin breakthrough (kopma) tekniğine göre bulunması. | 24 |
| Şekil 2.11: Flavonoidlerin genel yapısı. | 27 |
| Şekil 2.12: Flavonol, flavon, flavanon, flavanol, izoflavon ve antosiyanidin'in kimyasal yapıları. | 28 |
| Şekil 2.13: Başlıca flavonollerin kimyasal yapıları. | 29 |
| Şekil 2.14: Başlıca flavonların kimyasal yapıları. | 30 |
| Şekil 2.15: Başlıca flavanollerin ve gallik asit türevlerinin kimyasal yapıları. | 30 |
| Şekil 2.16: Başlıca flavanonların kimyasal yapıları. | 31 |
| Şekil 2.17: Başlıca izoflavonların kimyasal yapıları. | 31 |
| Şekil 2.18: Başlıca antosiyanin ve antosiyanidinlerin kimyasal yapıları. | 32 |
| Şekil 2.19: Floretin ve floridzin'in kimyasal yapıları. | 33 |
| Şekil 2.20: Hidroksisinnamik asitlerin genel kimyasal yapısı. | 33 |
| Şekil 2.21: Hidroksibenzoik asitlerin genel kimyasal yapısı. | 33 |
| Şekil 2.22: Başlıca hidroksisinnamik asitlerin kimyasal yapıları. | 34 |

| | |
|---|----|
| Şekil 2.23: Başlıca hidroksibenzoik asitlerin kimyasal yapıları. | 35 |
| Şekil 3.1: Moleküler baskılı polimerlerin genel sentez şeması. | 44 |
| Şekil 3.2: KUE baskılı polimerle kolon denemesinin şematik gösterimi. | 49 |
| Şekil 3.3: KA baskılı polimerle kolon denemesinin şematik gösterimi. | 50 |
| Şekil 4.1: 1:4:20 KUE-MIP'e ait adsorpsiyon-zaman grafiği. | 66 |
| Şekil 4.2: 1:4:16 KA-MIP'e ait adsorpsiyon-zaman grafiği. | 66 |
| Şekil 4.3: KUE-MIP ve NIP'e ait KUE derişimi-adsorplanan KUE miktarı grafiği. | 69 |
| Şekil 4.4: KA-MIP ve NIP'e ait KA derişimi-adsorplanan KA miktarı grafiği. | 71 |
| Şekil 4.5: 1:4:20 KUE-MIP ve NIP'e ait batch adsorpsiyon izotermi. | 72 |
| Şekil 4.6: KUE MIP ve NIP için Freundlich adsorpsiyon izotermi. | 73 |
| Şekil 4.7: KUE-MIP ve NIP için Langmuir adsorpsiyon izotermi. | 74 |
| Şekil 4.8: 1:4:16 KA-MIP ve NIP'e ait KA için batch adsorpsiyon izotermi. | 75 |
| Şekil 4.9: KA-MIP ve NIP'in KA için Freundlich adsorpsiyon izotermi. | 76 |
| Şekil 4.10: KA-MIP ve NIP'in KA için Langmuir adsorpsiyon izotermi. | 77 |
| Şekil 4.11: KA-MIP ve NIP'in KLA için batch adsorpsiyon izotermi. | 78 |
| Şekil 4.12: KA-MIP ve NIP'in KLA için Freundlich adsorpsiyon izotermi. | 79 |
| Şekil 4.13: KA-MIP ve NIP'in KLA için Langmuir adsorpsiyon izotermi. | 80 |
| Şekil 4.14: 1:4:20 KUE-MIP'in metanol çözücüsünde hazırlanmış KUE için kopma (breakthrough) eğrisi. | 81 |
| Şekil 4.15: 1:4:20 KUE-MIP'in ACN:DMSO (98:2, v/v) çözücü karışımında hazırlanmış KUE için kopma (breakthrough) eğrisi. | 81 |
| Şekil 4.16: 1:4:16 KA-MIP'in ACN çözücüsünde hazırlanmış KA için kopma eğrisi. | 82 |
| Şekil 4.17: 1:4:16 KA-MIP'in ACN çözücüsünde hazırlanmış KLA için kopma eğrisi. | 82 |
| Şekil 4.18: KUE-MIP ve NIP'de fenolik bileşiklerin adsorpsiyonunun karşılaştırılması. | 83 |
| Şekil 4.19: KA-MIP ve NIP'de fenolik bileşiklerin adsorpsiyonunun karşılaştırılması. | 84 |
| Şekil 4.20: KUE-MIP ve NIP'lerin FTIR-ATR spektrumları. | 86 |
| Şekil 4.21: KA-MIP ve NIP'lerin FTIR-ATR spektrumları. | 87 |
| Şekil 4.22: KUE-MIP ve NIP'e ait farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri. | 88 |
| Şekil 4.23: KA-MIP ve NIP'e ait farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri. | 89 |

| | |
|---|-----|
| Şekil 4.24: GA, KA, KAT, RT, KUE'den oluşan sentetik karışım çözeltisinin KUE-MISPE yükleme öncesi (a) ve sonrası (b) kromatogramları. | 90 |
| Şekil 4.25: GA, KA, KAT, RT, KUE'den oluşan sentetik karışım çözeltisinin KUE-MISPE yıkama kromatogramları..... | 90 |
| Şekil 4.26: GA, KA, KAT, RT, KUE'den oluşan sentetik karışım çözeltisinin KUE-MISPE elüsyon kromatogramı. | 91 |
| Şekil 4.27: FL, MR, KUE'den oluşan sentetik karışım çözeltisinin KUE-MISPE yükleme öncesi (a) ve sonrası (b) kromatogramları. | 92 |
| Şekil 4.28: FL, MR, KUE'den oluşan sentetik karışım çözeltisinin KUE-MISPE yıkama kromatogramları. | 93 |
| Şekil 4.29: FL, MR, KUE'den oluşan sentetik karışım çözeltisinin KUE-MISPE elüsyon kromatogramı..... | 93 |
| Şekil 4.30: 4-HBA, VA, KA, <i>p</i> -KUA ve FA'dan oluşan sentetik karışım çözeltisinin KA-MISPE yüklenme öncesi (a) ve sonrası (b) kromatogramları..... | 95 |
| Şekil 4.31: 4-HBA, VA, KA, <i>p</i> -KUA ve FA'dan oluşan sentetik karışım çözeltisinin KA-MISPE yıkama kromatogramları. | 95 |
| Şekil 4.32: 4-HBA, VA, KA, <i>p</i> -KUA ve FA'dan oluşan sentetik karışım çözeltisinin KA-MISPE elüsyon kromatogramı. | 96 |
| Şekil 4.33: Isırgan ekstraktı hidrolizatının 290 nm (a) ve 360 nm (b)'de kromatogramları..... | 97 |
| Şekil 4.34: Isırgan otu ekstraktı hidrolizatının KUE-MISPE kartuşa yükleme öncesi (a) ve sonrası (b) kromatogramları (290 nm)..... | 98 |
| Şekil 4.35: Isırgan otu ekstraktı hidrolizatının KUE-MISPE yıkama kromatogramları..... | 98 |
| Şekil 4.36: Isırgan otu ekstraktı hidrolizatının KUE-MISPE elüsyon kromatogramları. | 99 |
| Şekil 4.37: Kırmızı soğan kabuğu ekstraktının 290 nm (a) ve 360 nm (b) dalga boylarındaki kromatogramları. | 100 |
| Şekil 4.38: Kırmızı soğan kabuğu ekstraktının KUE-MISPE yükleme öncesi (a) ve sonrası (b) kromatogramları..... | 101 |
| Şekil 4.39: Kırmızı soğan kabuğu ekstraktının KUE-MISPE yıkama kromatogramları..... | 101 |
| Şekil 4.40: Kırmızı soğan kabuğu ekstraktının KUE-MISPE elüsyon kromatogramları. | 102 |
| Şekil 4.41: Kırmızı soğan kabuğu ekstraktı hidrolizatının 290 nm (a), 360 nm (b) ve 520 nm (c) 'de kromatogramları. | 103 |
| Şekil 4.42: Kırmızı soğan kabuğu ekstraktı hidrolizatının KUE-MISPE yüklenme öncesi (a) ve sonrası (b) kromatogramları..... | 104 |
| Şekil 4.43: Kırmızı soğan kabuğu ekstraktı hidrolizatının KUE-MISPE yıkama kromatogramları. | 104 |

| | |
|---|-----|
| Şekil 4.44: Kırmızı soğan kabuğu ekstraktı hidrolizatı KUE-MISPE elüsyon kromatogramı. . | 105 |
| Şekil 4.45: Siyah çay ekstraktı hidrolizatının KUE-MISPE yükleme öncesi (a) ve sonrası (b) kromatogramları. | 106 |
| Şekil 4.46: Siyah çay ekstraktı hidrolizatının KUE-MISPE yıkama kromatogramları. | 106 |
| Şekil 4.47: Siyah çay ekstraktı hidrolizatının KUE-MISPE elüsyon kromatogramları..... | 107 |
| Şekil 4.48: Yeşil kahve çekirdeği ekstraktının 320 nm (a), 290 nm (b), ve 360 nm (c) 'de kromatogramları. | 108 |
| Şekil 4.49: Yeşil kahve çekirdeği ekstraktının KUE-MISPE yükleme öncesi (a) ve sonrası (b) kromatogramları..... | 108 |
| Şekil 4.50: Yeşil kahve çekirdeği ekstraktı için KUE-MISPE yıkama kromatogramları..... | 109 |
| Şekil 4.51: Yeşil kahve çekirdeği ekstraktı için KUE-MISPE elüsyon kromatogramları..... | 109 |
| Şekil 4.52: Yeşil kahve çekirdeği ekstraktının KA-MISPE yükleme öncesi (a) ve sonrası (b) kromatogramları. | 110 |
| Şekil 4.53: Yeşil kahve çekirdeği ekstraktının KA-MISPE yıkama kromatogramları. | 111 |
| Şekil 4.54: Yeşil kahve çekirdeği ekstraktının KA-MISPE elüsyon kromatogramları. | 111 |

TABLO LİSTESİ

| | Sayfa No |
|--|-----------------|
| Tablo 2.1: Kuersetin ile ilgili çalışmalar..... | 36 |
| Tablo 2.2: Kafeik asit ile ilgili çalışmalar..... | 38 |
| Tablo 4.1: Çeşitli fenolik bileşiklerin HPLC verileri..... | 60 |
| Tablo 4.2: Farklı monomerlerle sentezlenen 1:4:20 oranındaki KUE-MIP ve NIP'lerin karşılaştırılması..... | 61 |
| Tablo 4.3: Farklı monomerlerle sentezlenen 1:4:16 oranındaki KA-MIP ve NIP'lerin karşılaştırılması..... | 62 |
| Tablo 4.4: Farklı gözenek oluşturucu çözücüler kullanılarak sentezlenen 1:4:20 oranındaki KUE-MIP ve NIP'lerin karşılaştırılması..... | 63 |
| Tablo 4.5: Farklı molar bileşim oranlarındaki KUE-MIP and NIP'lerin karşılaştırılması..... | 64 |
| Tablo 4.6: Farklı molar bileşim oranlarındaki KA-MIP and NIP'lerin karşılaştırılması..... | 65 |
| Tablo 4.7: Farklı çözücü ortamlarında KUE adsorpsiyonu..... | 67 |
| Tablo 4.8: Farklı çözücü ortamlarında KA adsorpsiyonu..... | 67 |
| Tablo 4.9: Farklı derişimlerde KUE çözeltilerinin MIP ve NIP'lerde adsorpsiyonu..... | 68 |
| Tablo 4.10: Farklı derişimlerde KA çözeltilerinin MIP ve NIP'lerde adsorpsiyonu..... | 70 |
| Tablo 4.11: KUE-MIP ve NIP için Freundlich adsorpsiyon izotermi değerleri..... | 73 |
| Tablo 4.12: MIP ve NIP için Langmuir adsorpsiyon izotermi değerleri..... | 74 |
| Tablo 4.13: MIP ve NIP'in KA için Freundlich adsorpsiyon izotermi değerleri..... | 76 |
| Tablo 4.14: KA-MIP ve NIP'in KA için Langmuir adsorpsiyon izotermi değerleri..... | 77 |
| Tablo 4.15: MIP ve NIP'in KLA için Freundlich adsorpsiyon izotermi değerleri..... | 79 |
| Tablo 4.16: MIP ve NIP'in KLA için Langmuir adsorpsiyon izoterm verileri..... | 80 |
| Tablo 4.17: GA, KA, KAT, RT ve KUE'den oluşan sentetik karışım çözeltisi için KUE-MISPE sonuçları..... | 91 |
| Tablo 4.18: FL, MR ve KUE'den oluşan sentetik karışım çözeltisi için KUE-MISPE sonuçları..... | 94 |

| | |
|--|-----|
| Tablo 4.19: 4-HBA, VA, KA, <i>p</i> -KUA ve FA'dan oluşan sentetik karışım çözeltisi için KA-MISPE sonuçları..... | 96 |
| Tablo 4.20: Isırgan otu ekstraktı hidrolizati için KUE-MISPE sonuçları..... | 99 |
| Tablo 4.21: Kırmızı soğan kabuğu ekstraktı için KUE-MISPE sonuçları..... | 103 |
| Tablo 4.22: Kırmızı soğan kabuğu ekstraktı hidrolizati için KUE-MISPE sonuçları..... | 105 |
| Tablo 4.23: Siyah çay ekstrakt hidrolizati için KUE-MISPE sonuçları..... | 107 |
| Tablo 4.24: Yeşil kahve çekirdeği ekstraktı için KUE-MISPE sonuçları..... | 110 |
| Tablo 4.25: Yeşil kahve çekirdeği ekstraktı için KA-MISPE sonuçları..... | 112 |
| Tablo 5.1: KUE-MIP ile ilgili literatür bilgileri ile çalışmamızın karşılaştırılması..... | 114 |

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

| Simgeler | Açıklama |
|------------|--|
| Q_{MIP} | : MIP'e bağlanan madde miktarı |
| Q_{NIP} | : NIP'e bağlanan madde miktarı |
| BF | : Baskılama faktörü |
| c_i | : Adsorplama öncesi çözeltideki madde derişimi |
| c_e | : Adsorplama sonrası çözeltide kalan maddenin derişimi |
| q_e | : Adsorbentin birim kütlesi başına adsorplanan madde miktarı |
| b | : Adsorpsiyon enerjisini ifade eden Langmuir sabiti |
| Q_{maks} | : Adsorpsiyon kapasitesini ifade eden Langmuir sabiti |
| V_e | : MISPE kolonundan ayrılan elüat hacmi |
| K_f | : Adsorpsiyon kapasitesini gösteren Freundlich sabiti |
| $1/n$ | : Adsorpsiyon şiddetini gösteren Freundlich sabiti |
| R_L | : Dağılma veya boyutsuz ayırma faktörü |

| Kisaltmalar | Açıklama |
|------------------|--|
| AA | : Akrilamit |
| ACN | : Asetonitril |
| ADV N | : 2,2'-azobis-(2,4-dimetilvaleronitril) |
| AIBN | : 2,2'-azobisisobutironitril |
| AKA | : Akrilik asit |
| ANT | : Antosiyanidin |
| ATR | : Zayıflatılmış toplam yansıma |
| BER | : Bergenin |
| BET | : Brunauer, Emmett and Teller analizi |
| BPO | : Benzoilperoksit |
| CEC | : Kapiler elektrokromatografi |
| C-fla | : 2-karbetoksi-5,7-dihidroksi-4-metoksiizoflavon |
| CPS | : Kiral sabit faz |
| DEGDA | : Dietilen glikol diakrilat |
| 3,4-diHBA | : 3,4-dihidroksibenzoik asit |
| DMAEMA | : 2-(dimetilamino)-etilmetakrilat |
| DMF | : Dimetil formamit |
| DMSO | : Dimetil sülfoksit |
| DSC | : Diferansiyel taramalı kalorimetri |
| DVB | : <i>p</i> -divinilbenzen |
| EDMA | : Etilen glikol dimetakrilat |
| EKAT | : Epikateşin |
| FA | : Ferulik asit |
| FR | : Formonetin |
| FS | : Fisetin |
| FTIR | : Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi |

| | |
|---------------------|---|
| GA | : Gallik asit |
| GHF | : 7- <i>o</i> -glukozil-3'-hidroksi-4'-metoksiizoflavon |
| HAc | : Asetik asit |
| 4-HBA | : 4-hidroksibenzoik asit |
| HPLC | : Yüksek performanslı sıvı kromatografisi |
| ITA | : İtakonik asit |
| İZORM | : İzoramnetin |
| KA | : Kafeik asit |
| KAM | : Kamferol |
| KAT | : Kateşin |
| KATŞ | : Kateşol |
| KLA | : Klorojenik asit |
| KRE | : Kresol |
| KUE | : Kuersetin |
| KR | : Krisin |
| MeOH | : Metanol |
| MAA | : Metakrilik asit |
| MIP | : Moleküler baskılı polimer |
| MISPE | : Moleküler baskılı katı-faz ekstraksiyonu |
| MMA | : Metakrilamit |
| MOR | : Morin |
| MR | : Mirisetin |
| MSPD | : Matriks katı-faz dispersiyon |
| NAR | : Naringenin |
| NIP | : Baskısız polimer |
| NMBA | : N,N-metilenbisakrilamit |
| NMR | : Nükleer manyetik rezonans |
| OHP | : 2-okso-4,5-dihidroksi-3-metilpiran |
| <i>p</i>-KUA | : <i>p</i> -kumarik asit |
| PETRA | : Pentaeritritol triakrilat |
| PiroKAT | : Pirokateşin |
| RA | : Rozmarinik asit |
| REZ | : Rezorsinol |
| RT | : Rutin |
| SA | : Sinapik asit |
| SEM | : Taramalı elektron mikroskopu |
| SPE | : Katı-faz ekstraksiyonu |
| TFM | : Triflorometakrilik asit |
| TGA | : Termogravimetrik analiz |
| THF | : Tetrahidrofuran |
| TLC | : İnce tabaka kromatografisi |
| TRIM | : Trimetilolpropan trimetakrilat |
| VA | : Vanilik asit |
| 1-VI | : 1-vinil imidazol |
| 4-VP | : 4-vinil piridin |
| 2-VP | : 2-vinil piridin |

ÖZET

DOKTORA

FENOLİK BİLEŞİKLERİN SEÇİMLİ AYRIMI VE TAYİNİNDE YENİ MALZEMELERDEN YARARLANILMASI

Şeyda KARAMAN ERSOY

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Esmâ TÜTEM

II. Danışman : Prof. Dr. Cevdet NERGİZ

Moleküler baskılı polimerler (Molecular imprinted polymers, MIPs), belirli molekülleri (veya türevlerini) kimyasal olarak tanıma özelliğine sahip kalıplar içeren polimerik katı malzemelerdir. MIP'ler doğal proteinli reseptörlere kıyasla hazırlama kolaylığı, düşük maliyet, uç sıcaklık ve kimyasal koşullara dayanım, uzun raf ömrü, deneysel tasarımda gelişmiş çok yönlülük gibi belirgin üstünlükler gösterir.

Kuersetin, pek çok bitkinin yaprak, meyve ve çiçeğinde yaygın olarak bulunan flavon ailesinin en aktif bileşenidir. Kuersetin antioksidan, antiviral, antiinflamatuvar ve antitümör özellikleri nedeniyle artan bir ilgi konusu olmuştur. Bu nedenle, kuersetinin çeşitli bitki matrikslerinden ayrımı önemli bir araştırma alanı olmaktadır. Ayrıca kuersetinin önderişiklendirmesi (zenginleştirilmesi) ve/veya ayrımı, biyolojik maddelerde olduğu gibi çok bileşenli karmaşık gıda ürünlerinde de kuersetin tayini için gerekli bir basamaktır. Kafeik asit birçok bitki ve içecekte bulunan bir hidroksisinnamik asit türevidir. Meyvelerdeki toplam hidroksisinnamik içeriğinin %70 ini oluşturmaktadır. Kafeik asit, iltihabı (inflamasyon) hafifleterek serbest radikallerin zararlı etkilerine ve endotelial hasar vb.'ne karşı koruma sağlar.

Bu çalışmada, yukarıda bahsedilen sebeplerden dolayı kafeik asit ve kuersetinin ayrımı ve önderişiklendirilmesi için ayrı ayrı baskılı polimerler sentezlendi. Kuersetin baskılı polimerler gözenek oluşturucu çözücü olan asetonun içinde kalıp molekül olarak

kuersetin, fonksiyonel monomerler olarak 4-vinil piridin (4-VP), metakrilik asit (MAA), akrilamid (AA), çapraz bağlayıcı olarak etilen glikol dimetakrilat (EDMA) ve başlatıcı olarak 3,3'-azobisisobutironitril kullanılmasıyla farklı mol oranlarında (kalıp:monomer:çapraz bağlayıcı: 1:4:20, 1:5:30, 1:8:40, 1:10:50) hazırlandı. Ayrıca baskısız polimerler (non-imprinted polymers, NIPs) kalıp molekül olmadan sentezlendi. Bunların tanıma ve seçicilik özellikleri, farklı oranlarda asetonitril (ACN)-dimetilsülfoksit (DMSO) karışımları ve metanoldeki kuersetin çözeltileri ile denge bağla(n)ma denemeleriyle 370 nm'de absorbanları izlenerek incelendi. Kuersetin:4-VP:EDMA'nın 1:4:20 mol oranındaki MIP'i, kuersetin tanıma için en uygun polimer olarak belirlendi. Bahsedilen bu polimerin yapısal olarak ilişkili diğer bileşiklere (rutin, kateşin, vb.) göre kuersetin için büyük ölçüde seçimli olduğu görüldü. MIP ve NIP'lerin adsorpsiyon özellikleri, ACN:DMSO (98:2, v/v) karışımında hazırlanan kuersetin çözeltileriyle Freundlich ve Langmuir adsorpsiyon izotermi kullanılarak hesaplandı. Bu çalışmada ayrıca, farklı mol oranlarında (1:4:12, 1:4:16, 1:4:20, 1:5:30, 1:6:30, 1:8:40) bir seri kafeik asit baskılı polimer, gözenek oluşturucu çözücü olarak THF'da hazırlandı. Kafeik asit-MIP'lerin hazırlanması için kalıp molekül olarak kafeik asit, monomer olarak 4-VP, MAA, AA ve 1-vinil imidazol (1-VI), çapraz bağlayıcı olarak EDMA ve başlatıcı olarak AIBN kullanıldı. Ayrıca baskısız polimerler (NIPs) kalıp molekül olmadan sentezlendi. Bunların tanıma ve seçicilik özellikleri denge bağla(n)ma denemeleri ile 320 nm'de absorbanları izlenerek incelendi. Kafeik asit:4-VP:EDMA'nın 1:4:16 mol oranındaki MIP'i, kafeik asit tanıma için en uygun polimer olarak belirlendi. Bahsedilen bu polimerin yapısal olarak ilişkili diğer bileşiklere (gallik asit, klorojenik asit, vb.) göre kafeik asit için büyük ölçüde seçimli olduğu görüldü. MIP ve NIP'lerin adsorpsiyon özellikleri ACN'deki kafeik asit çözeltileriyle Freundlich ve Langmuir izotermi kullanılarak hesaplandı.

Kafeik asit ve kuersetin baskılı polimerlerin yapı analizleri Fourier Dönüşümlü İnfrared Spektrokopisi (Fourier Transform Infrared, FTIR)-Zayıflatılmış Toplam Yansıma (Attenuated Total Reflection, ATR) spektrumları kullanılarak gerçekleştirildi. Polimer morfolojileri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelendi.

Hazırlanan moleküler baskılı polimerler kullanılarak moleküler baskılı katı faz ekstraksiyon (MISPE) uygulamaları yapıldı. Böylece sentetik karışımlar ve doğal ürünlerden (kuersetin için; ısırgan ekstraktı hidrolizati, kırmızı soğan kabuğu ekstraktı ve ekstrakt hidrolizati ve siyah çay ekstraktı hidrolizati, klorojenik asit ve kuersetinin her ikisi için de yeşil kahve çekirdeği ekstraktı) kafeik asit (ve/veya kafeik asit türevi klorojenik asit) ve kuersetin (ve/veya kuersetin türevi kamferol, mirisetin, rutin) geri kazanımı gerçekleştirildi.

Haziran 2014, 153 sayfa.

Anahtar kelimeler: moleküler baskılı polimer (MIP), moleküler baskılı katı faz ekstraksiyonu (MISPE), kafeik asit baskılı polimer, kuersetin baskılı polimer.

SUMMARY

Ph.D. THESIS

UTILIZATION OF NEW MATERIALS IN SPECIFIC SEPARATION AND DETERMINATION OF PHENOLIC COMPOUNDS

Şeyda KARAMAN ERSOY

İstanbul University

Graduate School of Science and Engineering

Department of Chemistry

Supervisor : Prof. Dr. Esmâ TÜTEM

Co-Supervisor : Prof. Dr. Cevdet NERGİZ

Molecular imprinted polymers (MIPs) are solid polymeric materials containing templates which have recognizing abilities chemically of specific molecules (or their derivatives). MIPs offer distinct advantages such as ease of preparation, low cost, tolerance to extreme thermal and chemical conditions, long shelf life, and enhanced versatility in experimental design compared to natural proteinaceous receptors.

Quercetin is the most active compound in flavone family, widely occurring in leaves, fruits, and flowers of many plants. Quercetin has become the topic of increasing interest based on its antioxidant, antiviral and antitumor properties. So, the isolation of quercetin from various plant matrices is becoming an important research area. Moreover, preconcentration and/or separation is a required stage for determining quercetin in complex multicomponent food products as well as in biological objects. Caffeic acid is a hydroxycinnamic acid derivative which is present in many plants and beverages. It accounts for up to 70% of the total hydroxycinnamic acid content in fruits. Caffeic acid can slow down the process of inflammation, thereby providing protection from the hazardous effects of free radicals and against endothelial damage, etc.

In this work, because of the above mentioned reasons, imprinted polymers for the isolation and preconcentration of quercetin and caffeic acid were synthesized separately. Quercetin imprinted polymers in different molar ratios (template:monomer:cross-linker: 1:4:20, 1:5:30, 1:8:40, 1:10:50) were prepared by using quercetin as the template molecule, 4-vinylpyridine (4VP), methacrylic acid (MAA), acrylamide (AA) as the functional monomers, ethylene glycol dimethacrylate (EDMA) as the cross-linker and 2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN) as initiator in the porogen of acetone. Non-imprinted polymers (NIPs) were also synthesized without template. Their recognition and selectivity properties were investigated by equilibrium binding experiments with QC solutions in different proportions of acetonitrile (ACN)-dimethylsulfoxide (DMSO) mixtures and methanol (MeOH) monitoring the absorbances at 370 nm. The MIP with 1:4:20 molar ratio of quercetin-4VP-EDMA was established as the most suitable for recognition of quercetin. The mentioned MIP was found to be highly selective for quercetin according to the other structurally related compounds (rutin, catechin, etc). Sorption parameters of the MIP and the NIP were calculated by using Freundlich and Langmuir isotherms with quercetin solutions in ACN: DMSO (98:2, v/v).

Also in this study, a series with different molar ratios of caffeic acid imprinted polymers (1:4:12, 1:4:16, 1:4:20, 1:5:30, 1:6:30, 1:8:40) were prepared in tetrahydrofuran as porogen. Caffeic acid as template molecule, 4-vinylpyridine (4VP), methacrylic acid (MAA), acrylamide (AA), 1-vinylimidazole as functional monomers, ethylene glycol dimethacrylate (EDMA) as cross-linking agent and 2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN) as initiator were used for the preparation of caffeic acid-MIPs. Non-imprinted polymers (NIPs) were also synthesized without template. Their recognition and selectivity properties were investigated by equilibrium binding experiments monitoring the absorbances at 320 nm. The MIP with 1:4:16 molar ratio of caffeic acid-4VP-EDMA was established as the most suitable for recognition of caffeic acid. The mentioned MIP was found to be highly selective for caffeic acid according to the other structurally related compounds (gallic acid, chlorogenic acid, etc). Sorption parameters of the MIPs and the NIPs were calculated by using Freundlich and Langmuir isotherms with caffeic acid solutions in ACN.

Structure analysis of caffeic acid and quercetin imprinted polymers was carried out by using fourier transform infrared (FTIR)- attenuated total reflection (ATR) spectrum. Morphologies of these polymers were investigated with scanning electron microscopy (SEM).

Molecularly imprinted solid phase extraction (MISPE) applications were performed by using prepared imprinted polymers. Thus, recoveries of caffeic acid (and/or caffeic acid derivative chlorogenic acid) and quercetin (and/or quercetin derivative kaempferol, miricetin, rutin) were carried out from synthetic mixtures and natural products (nettle extract hydrolyzate, red onion peel extract and extract hydrolyzate, and black tea extract hydrolyzate for quercetin; green coffee bean extract for both quercetin and chlorogenic acid).

June 2014, 153 pages.

Keywords: Molecularly imprinted polymer (MIP), molecularly imprinted solid phase extraction (MISPE), caffeic acid imprinted polymer, quercetin imprinted polymer.

1. GİRİŞ

Moleküler baskılı polimerler (MIP, molecularly imprinted polymer), belirli bir molekülü (veya onun bir türevini) kimyasal olarak tanıma özelliğine sahip kalıp içeren polimerik katı malzemelerdir (Haupt, 2003; Yan ve Ramström, 2005). Moleküler baskılı polimerler, düşük maliyetleri, yüksek mekanik dayanıklılıkları, ısıya ve basınca olan dirençleri, fiziksel sağlamlıkları, asitler, bazlar, metal iyonları ve organik çözücüler gibi ekstrem şartların varlığında kararlılıkları ve yüksek depolama dayanıklılıkları nedeniyle son yıllarda ilgi çeken çalışma alanları arasında yer almaktadır. (Yan ve Row, 2006; Mahony ve diğ., 2005; Ramström ve Ansell, 1998; Wei ve Mizaikoff, 2007; Cheong ve diğ., 2013; Theodoridis ve diğ., 2006).

Çevre, ilaç ve biyoteknoloji alanlarında hızlı ve verimli yeni yöntemlere sürekli ihtiyaç duyulması, araştırmacıları daha iyi, daha seçici ve duyarlı analitik çalışmaların yapılmasına yöneltmiştir (Mayes ve Mosbach, 1997). Şimdiye kadar MIP'ler sıvı kromatografisi (Ramström ve Ansell, 1998; Xie ve diğ., 2003) kapiler elektroforez ve kapiler elektrokromatografi (Scheweitz ve diğ., 1998) ve solid-faz ekstraksiyonu (Vlatakis ve diğ., 1993) gibi pek çok analitik çalışmada kullanılmıştır. Moleküler baskılama, ilaçların, herbisitlerin, aminoasitlerin ve türevlerinin, peptitlerin, proteinlerin vb. bileşiklerin seçici tanıma matrikslerinin hazırlanması için geliştirilmiş bir yöntem olmuştur (Li ve diğ., 2005) MIP adsorbentler, ilaçların katı faz ekstraksiyonunda, proteinlerin, aminoasitlerin, DNA ve RNA'nın, peptidlerin, hormonların ayrılması ve gıdalardan pek çok maddenin ayrımı ve saflaştırılmasında kullanılmaktadır (Lok ve Son, 2009; Xie ve diğ., 2003; Scheweitz ve diğ., 1998; Vlatakis ve diğ., 1993; Li ve diğ., 2005; Ramström ve diğ., 2001; Odabaşı ve Denizli, 2001).

İnsan sağlığı açısından büyük risk oluşturan pek çok hastalığın (başta kanser olmak üzere, kalp-damar hastalıkları, şeker hastalığı gibi) ortaya çıkmasını engelleyen ve birçok bitki türünde bol miktarda bulunan fenolik bileşikler (polifenoller) insan sağlığı üzerindeki etkileri nedeniyle biyolojik aktif maddeler olarak adlandırılmakta ve pek çok çalışmaya konu olmaktadır. Besinlerde bulunan fenolik bileşikler; flavonoidler, fenolik asitler, fenolik polimerler (tanenler) olmak üzere üç sınıfa ayrılır (Rice-Evans ve diğ.,

1996). Literatürde bitkisel fenolik bileşiklerin tayinine yönelik pek çok yöntem bulunmaktadır. Bunların büyük bir kısmı kromatografik yöntemlerden oluşmaktadır. Ancak doğal örneklerdeki fenolik bileşiklerin düşük derişimlerde olması ve örnek matrislerinin karmaşıklığı nedeniyle kromatografik analizden önce seçimli örnek hazırlama yöntemleri gereklidir. Bileşenlerin önderişiklendirmesi ve ayrılması çoğunlukla SPE (Solid-Phase Extraction, Katı-Faz ekstraksiyonu) kullanılarak yapılmaktadır. Bu amaçla kullanılan çok sayıda ticari malzeme olmakla birlikte, son yıllarda seçimliliklerinin yüksek, hazırlanışlarının kolay olması nedeniyle moleküler baskılama tekniği ile hazırlanmış polimer malzemelerin (Molecularly Imprinted Polymers, MIP) sentezi ve kullanımı, bitkisel fenolik bileşiklerin ayrımı ve derişiklendirilerek analizinde yoğun olarak çalışılmaktadır (Wulff, 1995; Mosbach ve Ramström, 1996; Lu ve diğ., 2002)

Kuersetin (KUE) de flavonoidlerin flavonol sınıfında yer alan, pek çok bitki ve meyvenin yaprak ve çiçek kısmında bulunan flavon sınıfının en aktif bileşenidir. Kuersetin; antioksidan, antiviral, antiinflamatuvar ve antitümör özellikleri gibi biyolojik aktivitesi sebebiyle pek çok biyolojik aktif takviyeler ve medikal preparatlarda kullanılan gittikçe ilgi çeken bir konu haline gelmiştir (Song ve diğ., 2009). Ayrıca biyolojik aktif maddelerin yanısıra çok bileşenli kompleks gıda maddelerinden kuersetinin zenginleştirilmesi ve/veya ayrılması gerekli bir aşamadır. Kuersetinin izolasyonu ve derişiklendirilmesi, kuersetinin kalıp olarak kullanılmasıyla hazırlanan moleküler baskılı polimerler (KUE-MIP) sayesinde gerçekleştirilmektedir (Xie ve diğ., 2001; Weiss ve diğ., 2002; Theodoridis ve diğ., 2006; Hong ve Chen, 2013; Song ve diğ., 2009; Pakade ve diğ., 2012; Pakade ve diğ., 2013; O'Mahony ve diğ., 2006; López ve diğ., 2012; Chen ve diğ., 2012; Kudrinskaya ve diğ., 2009; Curcio ve diğ., 2012; Xia ve diğ., 2006; Jin ve Row, 2007; Molinelli ve diğ., 2002). Kafeik asit (KA), iltihabı (inflamasyon) yavaşlatan böylece serbest radikallerin zararlı etkilerine ve endotelial hasara karşı koruma gibi biyolojik olarak önemli etkileri olan bir antioksidandır (Maurya ve Devasagayam, 2010). Bu sebeplerden dolayı kafeik asidin izolasyonu ve zenginleştirilmesi önemli bir araştırma konusu olmakta ve bu amacı gerçekleştirebilmek için kafeik asidin kalıp olarak kullanılmasıyla kafeik asit baskılı polimerler (KA-MIP) sentezlenmektedir (Li ve diğ., 2013; Li ve diğ., 2005; Zhu ve diğ., 2011; Valero-Navarro ve diğ., 2011; Michailof ve diğ., 2008).

Günümüzde gıda maddelerinin depolanma kararlılıklarını/sürelerini artırmak için çoğunlukla bütillenmiş hidroksi anizol (BHA), bütillenmiş hidroksi toluen (BHT), propil gallat (PG), tersiyer bütül hidrokinon (TBHQ) gibi sentetik antioksidanlar kullanılmaktadır. Ancak, antioksidan olarak kullanılan kimyasalların zararlı etkileri nedeniyle, son yıllarda ilgi doğal antioksidanlar üzerinde yoğunlaşmıştır. Bitkilerden ve bitkisel atıklardan doğal antioksidanların kazanılması için çeşitli ekstraksiyon yöntemleri kullanılmaktadır (Schieber ve diğ., 2001; Cheung ve diğ., 2003; Balasundram ve diğ., 2006; Makris ve diğ., 2007).

Bu tez çalışmasının amacı farklı fenolik bileşik sınıflarına yönelik ayrı MIP'lerin sentezlenerek bitkisel gıda örneklerinde ve bitkisel atıklarda varolan antioksidanların ayırma ve derişiklendirilmesinde uygulanabilirliklerini incelemektir. Yaptığımız çalışma, bitkilerden ve/veya bitkisel atıklardan doğal antioksidan elde edilmesi amacıyla hizmet etmektedir. Çalışmada öncelikle KUE ve KA baskılı MIP'ler sentezlendi. En uygun polimerleri belirlemek için polimer sentezi sırasında kullanılan kalıp molekül, çapraz bağlayıcı, başlatıcı ve gözenek oluşturucu (porojen) çözücü optimizasyon çalışmaları yapıldı ve bunların optimum oranları saptandı.

En uygun koşullarda sentezlenen KUE ve KA baskılı polimerlerin sorpsiyon özellikleri statik ve dinamik adsorpsiyon testleriyle belirlendi. Freunlich ve Langmuir adsorpsiyon izotermeleri çizilerek polimerlerin bu izotermelere uyumu araştırıldı. Breakthrough (kopma) eğrileri çizilerek adsorpsiyon kapasiteleri saptandı. Polimerlere kalıp molekül ile aynı fenolik bileşik sınıfında yer alan ve almayan bileşiklerle seçimlilik denemeleri yapılarak hangi bileşiğin MIP ve NIP'de ne kadar tutunduğu hesaplandı. Tutmanın (sorpsiyonun) kalıp moleküllere özgül olup olmadığı tartışıldı.

Polimerlerin yapı karakterizasyonu ve morfolojisinin belirlenmesi FTIR-ATR spektrumları ve SEM analizleri ile gerçekleştirildi.

Sentezlenen KUE-MIP ve KA-MIP'ler kullanılarak MIP'lerin en yaygın uygulama alanlarından biri olan MISPE (Moleküler Baskılı Katı Faz Ekstraksiyonu) denemeleri yapıldı. Bunun için polimerler SPE (Katı faz Ekstraksiyonu) kartuşlara belirlenen miktarlarda doldurularak öncelikle antioksidan standartlarından oluşan sentetik karışım çözeltileri ile MISPE uygulaması gerçekleştirildi. Bu şekilde MISPE'nin bütün adımları

(yükleme, yıkama, elüsyon) en yüksek verimde KUE ve KA geri kazanımı elde edilebilecek şekilde HPLC analiziyle optimize edildi. Daha sonra, uygun bir çözücü sistemiyle ekstrakte edilen doğal örneklerle MISPE uygulamaları yapıldı. KUE-MISPE uygulamasında doğal örnek olarak kırmızı soğan kabuğu ekstraktı ve hidrolizatı, siyah çay ekstraktı hidrolizatı, ısırgan ekstraktı hidrolizatı ve yeşil kahve çekirdeği ekstraktı kullanılarak KUE, KA-MISPE uygulamasında ise doğal örnek olarak yeşil kahve çekirdeği ekstraktı kullanılarak KLA geri kazanıldı.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. MOLEKÜLER BASKILI POLİMERLER (MOLECULARLY IMPRINTED POLYMERS, MIP)

MIP'ler, belirli bir molekülü (veya onun bir türevini) kimyasal olarak tanıma özelliğine sahip kalıp içeren polimerik katı malzemelerdir (Haupt, 2003; Yan ve Ramström, 2005).

Öncelikle monomerler, kovalent veya non-kovalent etkileşimlerle uygun bir gözenek oluşturuvcu çözücü içerisinde kalıp molekül ile kompleks oluştururlar. Daha sonra bu kompleks, uygun bir çapraz bağlayıcının da kullanılmasıyla monomerler aracılığı ile polimerleşir. Polimerizasyondan sonra kalıp molekül uzaklaştırılır ve bunun sonucunda polimerde boyut, şekil ve fonksiyonel grup bakımından kalıp moleküle özgü yüksek seçicilikte bağlanma bölgeleri oluşturmakta (Şekil 2.1) ve kalıp molekülü tamamlayan özellikte olmaktadır. Bu teknik özünde kalıp molekülü seçici bir şekilde geri bağlama yeteneğine sahip “moleküler hafıza” oluşturmaktadır (Haupt, 2003).



Şekil 2.1: Moleküler baskılamanın genel şematik gösterimi.

Moleküler baskılı polimerlerin özellikleri;

- Yüksek mekanik dayanıklılıkları, ısıya ve basınca olan dirençleri
- Fiziksel sağlamlılıkları
- Asitler, bazlar, metal iyonları ve organik çözücüler gibi uç şartların varlığında kararlılıkları

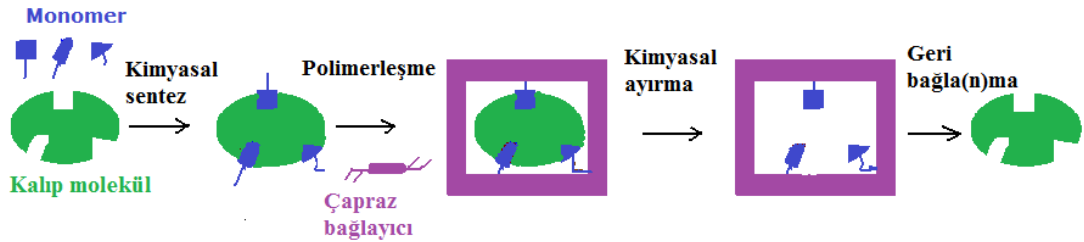
- Yüksek depolama dayanıklılıkları (polimer performansında azalma olmadan oda sıcaklığında birkaç yıl saklanabilme ve polimerlerin “hafıza etkisi”ni kaybetmeden 100 defadan fazla kullanılabilme özelliği şeklindedir (Yan ve Row, 2006; Mahony ve diğ., 2005; Ramström ve Ansell, 1998; Wei ve Mizaikoff, 2007; Cheong ve diğ., 2013; Theodoridis ve diğ., 2006).

Moleküler baskılama yöntemi, fonksiyonel monomer ile kalıp molekül arasında oluşan bağın çeşidine göre ikiye ayrılır:

- 1- Kovalent baskılama yöntemi
- 2- Non-kovalent (kovalent olmayan) baskılama yöntemi (Haupt, 2003; Spivak, 2005).

2.1.1. Kovalent Baskılama Yöntemi

Kovalent baskılama, ilk kez Wulf ve Sarhan (1972) öncülüğünde geliştirilmiştir (Wei ve Mizaikoff, 2007). Bu yöntemde, polimerizasyondan önce fonksiyonel monomer ve kalıp molekül kovalent bağ ile birbirine bağlanır. Oluşan kovalent bağlı konjugat aradaki bağ bozulmayacak şekilde polimerleştirilir. Polimerizasyondan sonra kovalent bağ kırılır ve kalıp molekül polimerden uzaklaştırılır (Şekil 2.2) (Yan ve Row, 2006; Komiyama ve diğ., 2003; Bergmann ve Peppas, 2008).



Şekil 2.2: Kovalent baskılama yönteminin genel şematik gösterimi.

Üstünlükleri

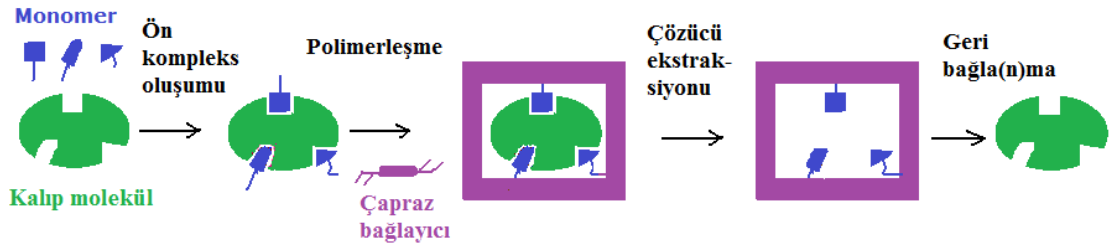
- Kararlılık ve bileşiminin kesinliği
- Konjugatlar kovalent bağlarla oluşturulduğundan ve yeterli derecede kararlı olduğundan farklı polimerizasyon koşullarından (örneğin, yüksek sıcaklık, düşük ve yüksek pH ve yüksek polaritedeki çözücü) etkilenmemesidir (Komiyama ve diğ., 2003).

Zayıflıkları

- Monomer-kalıp molekül konjugatlarının sentezinin genellikle zor ve pahalı olması
- Var olan tersinir kovalent bağ sayısının sınırlılığı
- Kovalent bağın kırılması esnasında baskılama etkisinin azalması
- Geri bağlama ve serbest bırakma işlemlerinin kovalent bağın oluşması ve kırılması gereksiniminden dolayı yavaşlığıdır (Komiya ve diğ., 2003).

2.1.2. Non-Kovalent Baskılama

Non-kovalent (kovalent olmayan) baskılamada monomer-kalıp molekül arasındaki bağlantı, kovalent olmayan etkileşimlerle (hidrojen bağı, elektrostatik etkileşim, koordinasyon bağı oluşumu gibi) sağlanır. Bu tür non-kovalent etkileşimler ayraçların tepkime karışımına eklenmesi yoluyla kolaylıkla sağlanır. Polimerizasyondan sonra, kalıp molekül uygun çözücüler kullanılarak polimerden uzaklaştırılır (Şekil 2.3) (Yan ve Row, 2006).



Şekil 2.3: Non-kovalent (kovalent olmayan) baskılama yönteminin şematik gösterimi.

Üstünlükleri

- Monomer-kalıp molekül konjugatı sentezinin gerekmemesi
- Hazırlanmasının kolaylığı, kimyasal ve fiziksel kararlılığı
- Kalıp molekülün polimerden basit bir çözücü ekstraksiyonu ile kolaylıkla ayrılması
- Geri bağlama ve serbest bırakma işlemlerinin hızlılığıdır (Spivak, 2005; Komiya ve diğ., 2003; Wulff ve Sarhan 1972; Mahony ve diğ. 2005).

Zayıflıkları

- Baskılama işlemi kesinliğinin düşüklüğü
- Polimerizasyon koşullarının seçiminin emek yoğun ve zaman alıcı olması

- Fonksiyonel monomer fazlalığının genellikle bağlanma seçimliliğini azaltmasıdır (Komiya ve diğ., 2003; Wulff ve Sarhan 1972; Mahony ve diğ. 2005).

MIP'ler, uygulama kolaylıkları nedeniyle daha çok non-kovalent baskılama yöntemi kullanılarak hazırlanmaktadır (Spivak, 2005; Yan ve Row, 2006).

Moleküler baskılama işleminde; (1) kalıp molekül (2) fonksiyonel monomer, (3) çapraz bağlayıcı, (4) çözücü ve (5) başlatıcı kullanılmaktadır (Cormack ve Elorza, 2004).

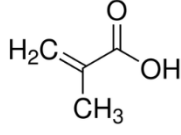
2.1.3. Moleküler Baskılı Polimerlerin Temel Bileşenleri

2.1.3.1. Kalıp Molekül (*Template, Target Molecule*)

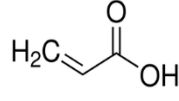
Fonksiyonel monomerler üzerindeki fonksiyonel gruplarla etkileşime giren kalıp moleküller tüm moleküler baskılama işlemlerinde çok önemli bir yere sahiptir. Ancak, çeşitli sebeplerden dolayı tüm kalıp moleküller doğrudan kalıp olmaya uygun değildir. Kalıp moleküllerin serbest radikal polimerizasyonuna uyumlu olabilmesi için polimerizasyon koşullarında kimyasal olarak inert (kararlı) olmaları gerekir. Kalıp molekül seçiminde sorulması gereken sorular şunlardır: (1) Kalıp molekül, polimerleşebilen gruplar taşıyor mu? (2) Kalıp molekül, serbest radikal polimerizasyonuna katılan veya bu polimerizasyonu inhibe eden fonksiyonel gruplar taşıyor mu? (örneğin, tiol ve hidrokinon grupları) (3) (Kimyasal başlatıcı olarak 2,2'-azobisisobutironitril (AIBN) kullanılıyorsa) kalıp molekül orta derecede yüksek sayılabilecek sıcaklıklarda (örneğin 60°C'de veya 60°C'ye yakın sıcaklıklarda) veya UV ışık altında kararlılığını koruyabilir mi? (Cormack ve Elorza, 2004). Çalışılan bazı kalıp moleküllere örnek olarak; aminoasitler, peptidler, steroidler, hormonlar, koenzimler, karbohidratlar, bazı ilaçlar, pestisitler, proteinler, fenolik bileşikler ve nükleik asitler sayılabilir (Ramström ve Ansell, 1998; Vasapollo ve diğ., 2011; Chen ve diğ., 2012; Chen ve diğ., 2013; Curcio ve diğ., 2012; Hong ve Chen, 2013; Kudrinskaya ve diğ., 2009; Li ve diğ., 2004; Li ve diğ., 2005; Li ve diğ., 2013; López ve diğ., 2012; Molinelli ve diğ., 2002; Pakade ve diğ., 2012; Pakade ve diğ., 2013; Song ve diğ., 2009; Xia ve diğ., 2006; Xie ve diğ., 2001; Zhu ve diğ., 2011).

2.1.3.2. *Fonksiyonel Monomer*

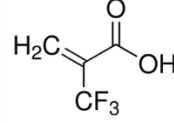
Fonksiyonel monomerler, baskılama bölgelerindeki bağlanma türlerinden sorumludurlar. Şekil 2.4' te MIP sentezinde en çok kullanılan bazı monomerlerin kimyasal yapısı görülmektedir. Non-kovalent bağlanma prosedürlerinde kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki etkileşimini arttırmak için polimerizasyon ortamında fonksiyonel monomerlerin kalıp moleküle göre aşırısı kullanılır (kalıp molekül: fonksiyonel monomer oranı bu tip etkileşimlerde 1: 4 veya daha fazla olabilir). Kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki etkileşimin uygun olması, yani kalıp molekülün sahip olduğu fonksiyonel gruplara göre monomer seçimi (örneğin, H-bağı vericisi, H-bağı alıcısı), kompleks oluşumu ve baskılamanın etkisini artıran önemli bir faktördür (Cormack ve Elorza, 2004; Vasapollo ve diğ., 2011). Genellikle asidik fonksiyonel grup içeren kalıp moleküller için bazik fonksiyonel grup taşıyan monomerler seçilir. Örneğin, karboksilik asit grubu taşıyan kalıp moleküllerin baskılanması için monomer olarak Brönsted bazik gruplar taşıyan vinilpiridinler {4-vinilpiridin (4-VP) veya 2-vinilpiridin (2-VP)} tercih edilir. Bazik fonksiyonel grup taşıyan kalıp moleküller için ise asidik fonksiyonel grup içeren, örneğin, metakrilik asit (MAA), triflorometakrilik asit (TFM), itakonik asit (ITA) gibi asidik monomerler kullanılır (Simon ve diğ., 2007; Tunc ve diğ., 2006). Birden fazla monomerin bir arada kullanıldığı “kokteyl” polimerizasyon sistemlerinde, monomerlerin reaktivite oranlarının kopolimerleşmeyi desteklediğinden emin olmak gerekir ve monomerlerin aynı reaktivitede kalıp moleküle tepkimeye girmelerine, birbirleri ile etkileşime girmemelerine (birbirlerini baskılamamalarına) dikkat edilmelidir (Cormack ve Elorza, 2004).

Asidik

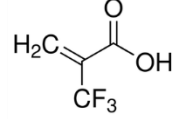
Metakrilik Asit



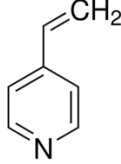
Akrilik Asit



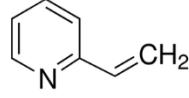
2-(triflorometil)-akrilik asit



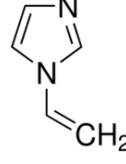
İtakonik asit

Bazik

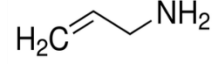
4-vinilpiridin



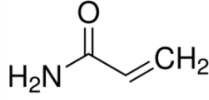
2-Vinilpiridin



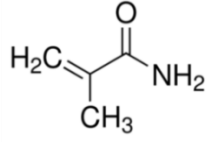
1-vinylimidazol



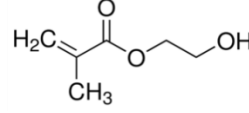
Alilamin

Nötral

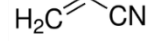
Akrilamid



Metakrilamid



2-hidroksietil metakrilat



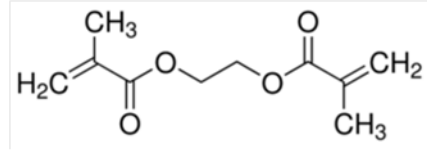
Akrilonitril

Şekil 2.4: Moleküler baskılamada en çok kullanılan fonksiyonel monomere örnekler.

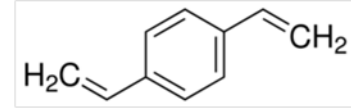
2.1.3.3. Çapraz Bağlayıcı

Moleküler baskılı polimerlerde çapraz bağlayıcıların üç temel işlevi bulunmaktadır. Bunlardan birincisi, polimer matriksin morfolojisinin (polimerin jel tipinde, makro gözenekli yapıda veya mikrojel toz halinde) belirlenmesinde önemli rol oynamasıdır. İkincisi, baskılanmış bağlanma merkezinin kararlılığını sağlamasıdır. Üçüncü olarak da polimerin mekanik kararlılığını sağlamaya yardımcı olur. Polimerizasyon açısından yüksek oranda çapraz bağlayıcı kullanmak makro gözenekli yapılara mekanik kararlılık kazandırır. Bundan dolayı moleküler baskılı polimerler, genellikle % 80'den fazla çapraz bağlayıcı içerirler (Cormack ve Elorza, 2004). Çapraz bağlayıcının fonksiyonel monomere olan mol yüzdesi düşükse, bağlama bölgeleri birbirinin çok yakınında olur ve bağımsız hareket edemezler. Çok yüksek oranlarda çapraz bağlayıcı ise çapraz bağlayıcının, monomer ve/veya kalıp molekülle kovalent olmayan etkileşime girmesi nedeniyle polimerizasyonun zarar görmesine yol açar (Chen ve diğ., 2012). Etilen glikol dimetakrilat (EDMA), *p*-divinilbenzen (DVB), pentaeritritol triakrilat (PETRA) ve trimetilolpropan trimetakrilat (TRIM) en çok kullanılan çapraz bağlayıcılardır (Vasapollo ve diğ., 2011). Şekil 2.5' te moleküler baskılamada en çok kullanılan çapraz

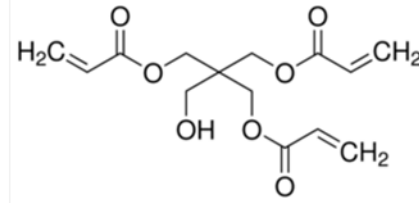
bağlayıcıların kimyasal yapıları görülmektedir. Bu ayıraçların baskılamadaki temel görevi, kalıp molekül çevresinde kararlı bir yapı oluşturmak ve baskılanmış polimerlerin çözünürlüğünü engellemektir (Chen ve diğ., 2012).



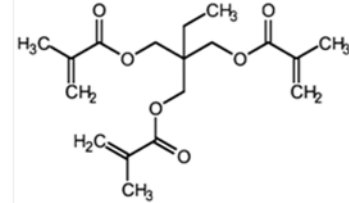
Etilen glikol dimetakrilat



p-divinilbenzen



Pentaeritritol triakrilat



Trimetilpropan trimetakrilat

Şekil 2.5: Moleküler baskılamada en çok kullanılan çapraz bağlayıcılara örnekler

2.1.3.4. Gözenek Oluşturucu (Porojen) Çözücü

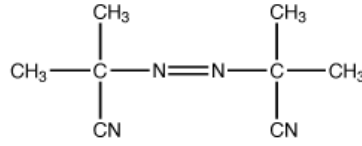
Çözücü; kalıp molekül, fonksiyonel monomer(ler), çapraz bağlayıcı, başlatıcı gibi tüm ayıraçların tek bir fazda bir araya gelmesini sağlar. Makro gözenekli yapılar olarak bilinen moleküler baskılı polimerlerin gözenek yapısının oluşumunda için önemli bir yere sahiptirler. Bu sebepten dolayı genellikle çözücü yerine “porojen (gözenek oluşturucu)” terimi kullanılır. Makro gözenekli polimerlerin hazırlanması sırasında porojen yapısı ve miktarı toplam gözenek (por) hacmi ve morfolojisini belirler. Çözücüler, polimerizasyondan önce ve sonra monomer ve kalıp molekül arasındaki kompleksleşmede etkilidir (Cormack ve Elorza, 2004; Spivak, 2005). Oluşan gözenekler, kalıp molekülün polimerden uzaklaştırılmasında ve tekrar geri bağlanmasında etkindirler. Kullanılan porojenin çözünürlüğü düşükse, erken faz ayrılması gerçekleşir ve düşük yüzey alanına sahip makro gözenekler oluşur. Tam tersi olarak kullanılan porojenin çözünürlüğü yüksek ise geç faz ayrılması olur ve geniş yüzey alanına sahip küçük gözenek yapıları polimerler oluşur (Spivak, 2005).

Termodinamik açılarından iyi bir çözücü kullanılıyorsa iyi oluşmuş gözenek yapıları ve yüksek seçimlilikte yüzey alanları oluşur. Kullanılan gözenek oluşturucu çözücü termodinamik olarak iyi değilse gözenek yapıları kötüleşir ve zayıf seçimlilikte yüzey alanları oluşur. Gözenek oluşturucu çözücü hacminin artmasıyla gözenek hacmi de artar. Polimerizasyon sırasında tepkime sıcaklığı artar ve istenmeyen ürünlerin oluşmasına sebep olur. Çözücülerin bir önemli özelliği de polimerizasyon sırasında tepkime ısısının eşit olarak yayılmasını sağlamaktır. Polimer sentezinde genellikle polar olmayan organik çözücüler kullanılır. (Cormack ve Elorza, 2004; Spivak, 2005; Vasapollo ve diğ., 2011; Yan ve Row 2006). Hidrojen bağı oluşumuna dayanan polimerizasyonlarda genelde tetrahidrofuran, asetonitril, kloroform, diklorometan, toluen seçilmektedir. Düşük polaritede çözücüler kullanıldığında kompleks oluşumu, hidrojen bağları ve iyonik tuz köprüleri gibi polar non-kovalent etkileşimlerin kolaylaşmasıyla Le Chatelier prensibine göre artar. Başka bir deyişle polar çözücüler kullanıldığında ise bu çözücülerin hidrojen bağlarını bozma etkisinden dolayı ön-polimerizasyon sırasında non-kovalent etkileşimi engellediği için kalıp molekülün monomer ile etkileşimi zayıflar ve böylelikle oluşan polimerin kalıp molekülü tanıma kapasitesi azalır. Hidrofobik etkileşimlere dayalı bir polimer sentezinde ise en uygun çözücü sudur (Spivak, 2005; Ansell ve Mosbach, 1997; Komiyama ve diğ., 2003).

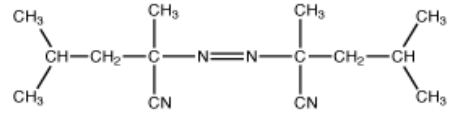
2.1.3.5. Başlatıcı

Farklı kimyasal özellikteki birçok kimyasal başlatıcı serbest radikal polimerizasyonunda radikal kaynağı olarak kullanılmaktadır. Şekil 2.6'da moleküler baskılamada en çok kullanılan başlatıcıların kimyasal yapıları görülmektedir. Genellikle başlatıcı olarak 2,2'-azobisisobutironitril (AIBN) ve 2,2'-azobis-(2,4-dimetilvaleronitril) (ADVN) kullanılır. Ayrıca benzoilperoksit (BPO), 4,4'-azo-(4-siyanovalerik asit) de yaygın kullanılan başlatıcılar arasındadır. Genellikle toplam polimerleşebilen çift bağ mol sayısının % 1'i oranında olan monomer miktarına göre çok düşük miktarda kullanılan bir bileşendir. Başlatıcıların radikal yapısına dönüşebilme hızı ve şekli kimyasal yapısına bağlı olarak ısı, ışık veya kimyasal/elektrokimyasal olaylardan etkilenir. Örneğin, azo başlatıcı olan 2,2'-azobisisobutironitril (AIBN), fotoliz (UV) veya termoliz yoluyla karbon merkezli radikallere dönüşerek birçok vinil monomerin bir araya geldiği polimerizasyonunu başlatır (Cormack ve Elorza, 2004; Yan ve Row, 2006).

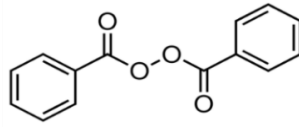
Oksijen gazı, serbest radikal polimerizasyonunu engeller. Bu nedenle, polimerizasyondan önce monomer çözeltisinden çözünmüş oksijenin giderilmesi gerekmektedir. Çözünmüş oksijenin uzaklaştırılması ultrasonikasyon yöntemiyle veya monomer çözeltisinden azot veya argon gibi inert bir gazın geçirilmesi ile sağlanabilmektedir (Yan ve Row, 2006).



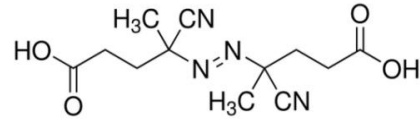
2,2'-azobisisobutyronitril



2,2'-azobis-2,4-dimetilvaleronitril



Benzoil peroksit



4,4'-azo(4-siyanovalerik asit)

Şekil 2.6: Moleküler baskılamada en çok kullanılan başlatıcılara örnekler.

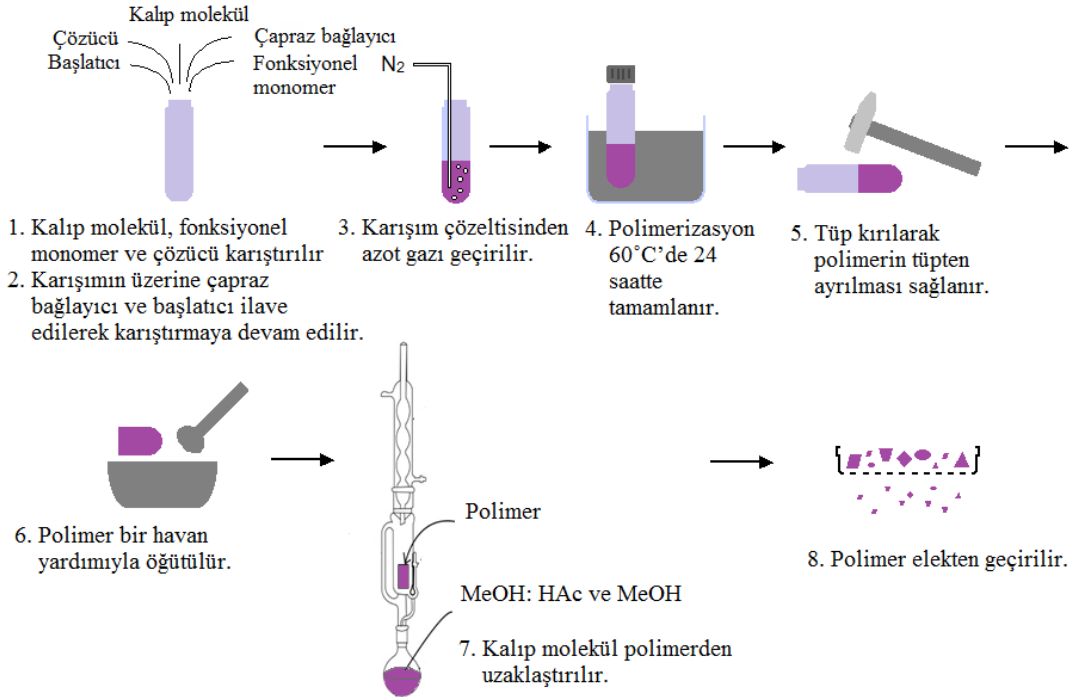
2.1.4. MIP Oluşturma Yöntemleri

2.1.4.1. Yığın (Bulk) Polimerizasyonu

Moleküler baskılı polimerler uygulama alanına göre çeşitli fiziksel formlarda hazırlanırlar. İlk olarak yığın polimerizasyon yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntemde (Şekil 2.7) polimerizasyon tüm reaktiflerin (kalıp molekül, fonksiyonel monomer, gözenek oluşturucu çözücü ve başlatıcı) karıştırılmasıyla UV ışık veya sıcaklık etkisiyle 16-24 saat gerçekleştirilir. Bunun sonucunda polimerik bloklar elde edilir. Elde edilen bu polimerik bloklar kırılır, öğütülür ve istenilen boyuta getirebilmek için mikrometre boyutunda eleme işlemine tabi tutulur. Karmaşık cihaz veya özel bir beceri gerektirmeyen, uygulama kolaylığı olan hızlı bir yöntemdir. Partikül büyüklüğü <25 µm olan polimerler genellikle kromatografik çalışmalarda kullanılmaktadır. Öğütülen ve elenen polimer partikülleri geleneksel HPLC kolonlarına doldurulabilirler, TLC (ince

tabaka kromatografisi) levhaları üzerinde immobilize edilebilirler ve akrilamid jel veya silikat matriksleri kullanılarak kapiler kolonlarda kullanılabilirler.

Yığın polimerizasyonunun basit ve baskılama koşulları optimizasyonunun nispeten kolay olmasına rağmen yöntemin bazı sakıncaları da vardır. Öncelikle en son öğütme adımında bazı etkileşim bölgeleri zarar görebilmektedir. Bu durum polimerin yüklenme (adsorplama) kapasitesinin ve kromatografik performansının azalmasına yol açmaktadır. Ayrıca öğütme ve eleme işlemleri sırasında başlangıç polimer miktarı azalmaktadır (Yan ve Row, 2006)



Şekil 2.7: Yığın polimerizasyonunun genel şematik gösterimi.

2.1.4.2. Çok Adımlı Şişme Polimerizasyonu

Son yıllarda, daha yüksek etkinlikte baskılı sabit fazların hazırlanmasına yönelik alternatif yöntemler geliştirilmektedir. Bu yöntemler kullanılarak mikrometre boyutunda küresel baskılı polimerler hazırlanmaktadır. Uniform küresel partiküller çok adımlı şişme metoduyla hazırlanmaktadır. Partiküller, kontrol edilebilir çapta küresel boncuklar biçiminde doğrudan hazırlanabilir. Bu şekilde sentezlenen boncuklar demir oksit içererek magnetik hale getirilir. Bu teknikle elde edilen partiküller düzgün şekil ve boyutta ve kromatografik uygulamalara uygun olmasına rağmen karmaşık prosedür ve

tepkime koşulları gerektirmekte ve baskılamaya etki eden ve seçimliliği azaltan sulu süspansiyonlar kullanılmaktadır (Sulu emülsiyonlar, baskılama işlemini interfere eder ve seçimlilik azalır.) (Yan ve Row, 2006).

2.1.4.3. Süspansiyon Polimerizasyonu

Mekanik öğütme gerektirmeyen küresel partikül elde edilmesini sağlayan basit bir yöntemdir. Bu yöntemde apolar karakteri fazla olan perflorokarbon çözücüler kullanılır. Elde edilen polimerler düzenlidir, kromatografik uygulamalarda iyi sonuç verir ve seçimliliği yüksektir. Ancak bu yöntemde kullanılan perflorokarbon çözücülerin pahalı olması ve özel perflorokarbon çözücülerini ve florlanmış yüzey aktif maddelerin kullanımı bu yöntemin uygulanabilirliğine ve pratikliğine sınırlamalar meydana getirmektedir (Yan ve Row, 2006).

2.1.4.4. Çöktürme Polimerizasyonu

Daha düzgün boyutlu MIP mikroküreler, daha yüksek aktiflikte yüzey alanı sağlayan çöktürme yöntemi ile elde edilebilir. Bu yöntemde, nano-jel boncukların pıhtılaşmasına ve etrafındaki çözeltilerden oligomerlerin tutulmasına dayanır. Bu şekilde monodispers küresel boncuklar hazırlanabilir ve boyut ve gözeneklilik polimerizasyon koşulları değiştirilerek ayarlanabilir (Theodoridis ve diğ., 2006). Bu yöntem monomer ve çapraz bağlayıcının uygun bir çözücü içinde ve seyreltik ortamda (< % 5 w/v) polimerleşerek bir ya da birkaç yüz nanometre çapında monodispers mikrokürecikler oluşturması esasına dayanır (Sambe ve diğ., 2006). Mikroküresel MIP sentezlerinde kullanılan metodlar içinde uygulaması en kolay olan yöntemdir ve tepkime ortamında emülgator veya süspand edici (suspending) ayıraç gerektirmez (Kan ve diğ., 2008; Li ve diğ., 2003). Bu tekniğin MIP-bazlı çalışmalarda ve kapiler elektrokromatografi alanlarında kullanıldığı bildirilmektedir. Ancak son zamanlarda kromatografik kalitede moleküler baskılı polimerlerin hazırlanması için çöktürme polimerizasyonunun oldukça verimli bir teknik olduğunu belirten yayınlar bulunmaktadır (Theodoridis ve diğ., 2006).

2.1.4.5. Yüzey Baskılama Polimerizasyonu

Moleküler baskılama tekniğinin bazı sakıncaları vardır: Bunlardan biri fonksiyonel monomer ve kalıp molekül arasındaki kompleksin, organik çözücüde veya sıvı çapraz bağlayıcı monomer karşımında çözünmesi gerekir, bu da suda çözünen biyolojik ve biyomedikal moleküllerin kullanımını sınırlamaktadır. Diğeri ise polimer içine baskılanmış kalıp molekülün yapısından dolayı geri bağla(n)ma kinetiği bazen çok

yavaş olmaktadır. Bu problemleri engellemek için altın veya karbon gibi bir substrat oluşturarak veya su-yağ (W/O) emülsiyonu kullanılarak “yüzey moleküler baskılama” tekniği uygulanmaktadır (Tsunemori ve diğ., 2002). Su-yağ (W/O) emülsiyonu yöntemi, baskılanmış katı polimerin suda çözünen bir kalıp molekül, kalıp molekül ile etkileşen fonksiyonel ev sahibi molekül, emülsiyon stabilizatörü ve çapraz bağlayıcıdan oluşan karışımın polimerizasyonu ile elde edilmesine dayanır. Yağ-su ara yüzeyinde sabitlenen fonksiyonel evsahibi molekülün yönelmesi sırasında kalıp molekül, fonksiyonel evsahibi molekül ile kompleks oluşturur. Polimerizasyondan sonra baskılanmış yığın polimerin iç kavite yüzeyinde tanıma bölgeleri oluşur. Fonksiyonel evsahibi molekül ve kalıp molekül arasındaki kompleks çok fazla hidrofilik ya da hidrofobik olamaz, çünkü aksi halde kompleks yağ-su ara yüzeyinde yer almaz. Sonuç olarak yüzey aktif molekül gibi ev sahibi fonksiyonel molekül, kalıp moleküle yüksek baskılama etkisi oluşturmak için amfifilik olmalıdır. Yığın polimer, çözeltideki kalıp molekül ile etkileşime girmek için küçük parçalara öğütülerek elde edilir. Bu teknik hızlıdır ve baskılanmış polimer ile kalıp molekül arasında tersinir kompleksleşme meydana getirir (Yoshida ve diğ., 2000). Bu yöntem özellikle ayırma, sensör ve medikal uygulamalarda kullanılmaktadır (Theodoridis ve diğ., 2006).

2.1.4.6. Monolitik Baskılama ile Polimerizasyon

Monolitik moleküler baskılama teknolojisi öğütme, eleme ve kolon doldurma işlemleri olmaksızın bir kromatografik kolon içinde doğrudan serbest radikal polimerizasyonu ile hazırlanan, monolitik kolon üstünlüğünü ve moleküler baskılama teknolojisini birleştiren basit, yerinde ve tek-adımlı bir yöntemdir. Monolitik MIP'lerin yerinde (in-situ) polimerizasyondan sonra, ayırmayı ve yüksek hız ve yüksek etkinlik ile doğrudan analizi daha etkin hale getirmesi beklenmektedir. Kalıp molekül, fonksiyonel monomer, çapraz bağlayıcı ve başlatıcı, gözenek oluşturucu çözücüler içinde çözünmekte ve karışımdan azot geçirilerek oksijeni giderilip paslanmaz çelik kolon içine dökülmektedir. Polimerizasyondan sonra kalıp molekül ve gözenek oluşturucu çözücü metanol-asetik asit karışımı ile yıkanarak uzaklaştırılır. Monolitik moleküler baskılama teknolojisi, hazırlama kolaylığı, yüksek seçicilik ve hassasiyete sahip olması ve hızlı kütle transferi sebebiyle önemli ilgi görmektedir. Ayrıca böyle bir MIP hazırlama tekniği, düşük maliyetlidir. Çünkü gereken kalıp molekül miktarı çok düşüktür. Diğer taraftan, yüksek gözenekliliğe ve bu nedenle iyi geçirgenliğe, küçük moleküller ve büyük biyopolimerlerin her ikisine de çok iyi uyum sağlayan yüksek yüzey alanına

sahiptir. Bu özellikler monolitik moleküler baskılı sabit fazların kromatografik sabit faz hazırlanmasında önemli yer edinmesini sağlamaktadır (Theodoridis ve diğ., 2006).

2.1.5. Moleküler Baskılı Polimerlerin Uygulama Alanları

2.1.5.1. Ayırma Teknikleri

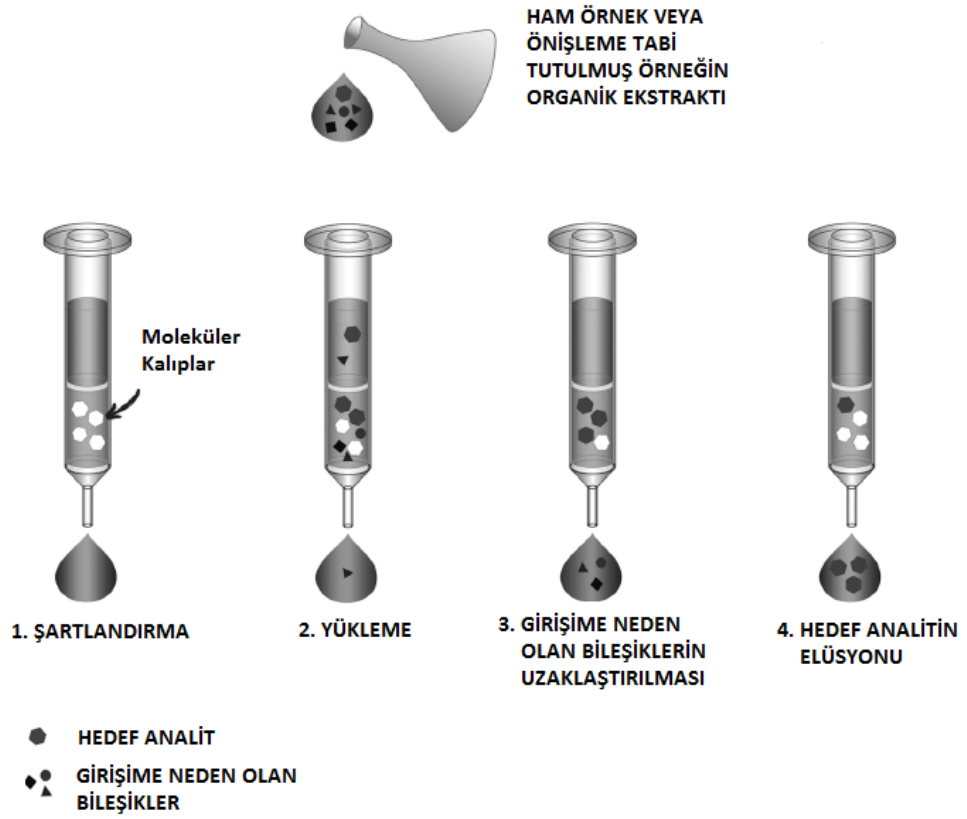
a) Katı faz ekstraksiyonu (solid phase extraction, SPE)

Moleküler baskılama teknikleri başlangıçta temel deneysel ve teorik araştırma ağırlıklı çalışmalara konu olurken pratik analitik uygulamalara geçişi zamanla hızla artmıştır (Mahony ve diğ., 2005). Katı faz ekstraksiyonu (SPE) tekniği, analitik kimyada MIP uygulamalarının önemli bir alanını oluşturmaktadır (Vasapollo ve diğ., 2011). Biyolojik, gıda ve çevre analizlerinde örnek önderişiklendirme ve arındırma teknikleri için etkili metotlara ihtiyaç duyulmaktadır. (Turiel ve Martín-Esteban, 2010; Haupt, 2001). SPE'nin sıvı-sıvı ekstraksiyonun (liquid-liquid extraction, LLE) göre daha hızlı ve yeniden geri kazanılabilir olması, daha temiz ekstraktların elde edilmesi, emülsiyon oluşmaması, çözücü tüketiminin az olması ve daha küçük örnek boyutlarına ihtiyaç duyması gibi üstünlükleri bulunmaktadır. Ayrıca (1) hızlı, basit ve herhangi bir örnek kaybı olmaksızın çok küçük boyutta (mikrolitre hacimde) doğrudan örnek uygulaması, (2) yüksek zenginleştirme faktörü, (3) hızlı faz ayrımı (4) adsorbanın yeniden kullanılabilirliği (5) çevreye zarar vermemesi ve (6) zaman ve maliyetten kazanç gibi üstünlükleri de vardır. Dahası, SPE otomatik analitik işlemlere içine kolayca dahil edilebilir. Bu bağlamda diğer ayırma tekniklerinden daha az sınırlamaları olan düşük maliyetli ve farklı ortam koşullarına karşı dayanıklı moleküler baskılama alanındaki araştırmalar SPE üzerinde yoğunlaşmıştır.

MIP' ler organik çözücülerle uyumlu olduğu için MIP-SPE (moleküler baskılı polimer katı faz ekstraksiyonu veya MISPE) ön çözücü ekstraksiyon adımından sonra doğrudan uygulanabilir. Ayrıca düşük çözünürlük faktörü MIP adsorpsiyon-desorpsiyon modunda çalışırken sorun değildir. Böylece SPE yöntemi günümüzde MIP'ler için en umut verici ve aynı zamanda ticarileştirilmeye en yakın uygulamalardan biridir. Bu ayrıca gerçek örneklerle ilgili pek çok çalışmaya yansımıştır. MISPE yöntemi, toprak ve su gibi çevre örneklerinde, kan plazması ve serum, idrar, karaciğer, safra, sakız, , bitki dokusu vb. matrikslerde hedef molekülü ekstrakte etmek için kullanılmıştır (Haupt, 2001).

MISPE tekniği klasik SPE'deki gibi dört temel adıma dayanmaktadır;

- Polimerin Őartlandırılması (polimerin çalışmaya uygun hale getirilmesi)
- Örneğin yüklenmesi
- Yıkama
- Hedef analitin elüsyonu (Laskov ve Jandera, 2009; Caro ve diğ., 2006; Martn-Esteban, 2001; Vasapollo ve diğ., 2011) (Şekil 2.8) (Laskov ve Jandera, 2009).



Şekil 2.8: MIP sorbenti kullanılarak solid faz ekstraksiyon Şeması.

- Polimerin Őartlandırılması

Polimerin Őartlandırılması adımında, örnek içindeki hedef molekül ile etkileŐimlerini en yüksek düzeye çıkarmak için MIP'teki kaviteler (bağlanma bölgeleri) uygun çözücülerle aktive edilir.

- Yükleme

Yükleme aşamasında, örnek ortamının baskılı polimerin tanıma özellikleri üzerinde doğrudan etkisi bulunmaktadır. Bu sebeple örnek düşük polaritede bir çözücü içinde

MIP'ten geçirilirse sadece hedef molekülün seçimli olarak MIP'te tutunduğu diğer moleküllerin ise tutunmadığı seçimli yükleme sağlanmış olur (Caro ve diğ., 2006). Sonuç olarak örnek yüklenmesi sırasında kullanılan çözücü polaritesi arttıkça hedef molekülün (analitin) MIP'te tutunması azalır. Örneğin, toluende hazırlanan polimerler yükleme çözeltisi olarak toluen kullanıldığında asetronitril kullanıldığından (daha polar) daha iyi tanıma kapasitesine sahiptir (Martín-Esteban, 2001), Örnek sulu ortamda hazırlanırsa yükleme sırasında hedef molekülün ve bunun yanında diğer girişim yapan moleküller polimer üzerinde spesifik olmayan bağlanmalara sebep olurlar. Örneğin sulu ortamda hazırlanması, yükleme sırasında hedef molekülün ve girişim yapan diğer moleküllerin polimer üzerinde spesifik olmayan bağlanmalarına sebep olur (Caro ve diğ., 2006).

- Yıkama

Seçimli ekstraksiyonun sağlanabilmesi için elüsyon aşamasından önce polimerin organik çözücü ile yıkanması gerekmektedir. Bu yıkama işlemi, MISPE prosedürlerinde klasik SPE'ye göre daha önemli rol oynamaktadır. MIP'in hedef molekülü seçimli olarak tanıma kabiliyetinden yararlanmak için kullanılacak çözücünün cinsi, pH'ı, kimyasal yapısı ve hacmi optimize edilmelidir. Sonuç olarak yıkama çözeltisi, hedef molekül ve MIP arasındaki seçimli etkileşimleri bozmaksızın spesifik olmayan etkileşimleri önlemelidir. Bu amaçla, en çok diklorometan, toluen veya kloroform gibi düşük polaritedeki organik çözücüler en yaygın olarak kullanılanlardır. Ancak, metanol ve asetronitril gibi polar çözücülerle de iyi sonuçlar alınmıştır. Bazı çalışmalarda ise yıkama çözücüsü olarak polimerizasyon sırasında kullanılan porojen çözücüler de kullanılmıştır (Lasáková ve Jandera, 2009; Caro ve diğ., 2006). Sonuç olarak genellikle örnek yüklenmesi sırasında kullanılan çözücüler yıkama çözücüsü olarak kullanılmaktadır. Ancak, spesifik olmayan etkileşimler önemli olduğunda, polimerik matriks ile spesifik olmayan etkileşimler ve önceden oluşturulmuş kaviteelerde analitlerin spesifik bağlanması arasında kesin ayrımı sağlamak için yıkama çözeltilerinin polaritelerinin artırılması gereklidir (Martín-Esteban, 2001).

- Elüsyon

Analitler, genellikle polar (metanol) ve protik (asetonitril) çözücüler ve bu çözücülerin düşük miktarda zayıf asit (asetik asit) ve bazıları içeren (trietilamin) karışımları kullanılarak elüe edilmektedir. Bu şekilde hidrojen bağına dayanan kalıp molekül-

monomer etkileşimleri bozulmakta ve analitler polimerden ayrılıp serbest hale geçmektedir. (Martín-Esteban, 2001; Caro ve diğ., 2006).

MISPE tekniği kesikli (off-line) ve kesiksiz (on-line) prosedürlerin her ikisinde de uygulanmaktadır. (Vasapollo ve diğ., 2011; Lasáková ve Jandera, 2009; Caro ve diğ., 2006; (Martín-Esteban, 2001).

✓ Kesikli (off-line) MISPE

Kesikli MISPE tekniğinin diğer SPE prosedürlerinden bir farkı yoktur. Az miktarda baskılı polimer (15-500 mg) polietilen kartuş içine doldurulur. Şartlandırma, yükleme ve yıkama adımlarından sonra analitler elüe edilir. Elde edilen elüatlar sıvı kromatografisi, gaz kromatografisi veya kapiler elektroforez teknikleri ile analiz edilir. Son yıllarda çevre örneklerinde (nehir suyu, yeraltı suyu, atık su, deniz suyu ve toprak ekstraktları), biyolojik sıvılarda (idrara, plazma, serum ve kan) ve gıda örneklerinde kesikli MISPE yöntemi konusunda büyük gelişmeler görülmektedir (Turiel ve Martín-Esteban, 2010; Caro ve diğ., 2006).

✓ Kesiksiz (on-line) MISPE

Kesiksiz MISPE tekniğinde, birkaç mg (örneğin 50 mg) polimer bir ön-kolon içine doldurularak LC sistemine bağlanır. Bu şekilde LC sisteminde kullanılan mobil faz, kolonda tutunan analitlerin desorbe olması ve analitik kolona sunulması için MISPE sisteminin elüsyon çözeltisi olmaktadır. Ancak mobil fazın MIP ve analit arasındaki spesifik etkileşimleri bozmak için yeterli güçte olmaması problem teşkil etmektedir. Bundan dolayı MIP ve analit arasındaki spesifik etkileşimleri bozmak için mobil faza modifiye edici bir kuvvetli asit ya da baz eklenir. Ancak kromatografik sistemde bu şekilde modifiye edici maddelerin kullanılması problem oluşturmaktadır. Bu uyumsuzluğun ortadan kalkması için kesikli (off-line) sistemlerde çalışılması gerekmektedir. Kesikli ve kesiksiz MISPE arasındaki bir diğer önemli fark ise yıkama adımından önce sorbentin kurutulmasının kesikli sistemlerde daha kolay olmasıdır. Bu sebeplerden dolayı kesiksiz MISPE yöntemiyle ilgili daha az çalışma bulunmaktadır (Turiel ve Martín-Esteban, 2010; Caro ve diğ., 2006).

b) Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

HPLC’de sabit faz olarak MIP’lerin kullanımı baskılı polimerlerin en iyi uygulamalarından biridir. Çünkü belirli prosedür ile üretilen baskılı polimerlerdeki baskı kalitesinin nicel değerlendirilmesine uygun bir metod sağlamaktadır (Mayes ve Mosbach, 1997). MIP’ler, aminoasit türevleri ve ilaçlar gibi farklı rasemik çözeltilerin enantiyomerik ayrımlarını elde etmek için HPLC’de kiral sabit faz olarak (MIP-CSPs) kullanılırlar (Vasapollo ve diğ., 2011). Bu nedenle çoğu çalışma, kiral bileşiklerin ayrımı üzerinde durmaktadır. Bu, yöntemin analitik ve sentetik kimyadaki önemini yansıtmakta ve ayrıca spesifik ve spesifik olmayan tanıma arasındaki farkın belirlenmesine olanak sağlamaktadır (Mayes ve Mosbach, 1997).

HPLC kolonlarında MIP’lerin kullanımının bazı dezavantajları vardır: Bunlardan biri ticari olarak kullanımlarının sınırlı olması bir diğeri ise pik genişlemesi ve kuyruklanmasına sebep olmasıdır (Vasapollo ve diğ., 2011).

c) Kapiler elektrokromatografi (capillary electrochromatography, CEC)

CEC için MIP’ler kullanılabilir. CEC, elektroforezin elektroosmotik mobil faz taşınımını ile LC sabit fazını birleştiren bir hibrit (melez) ayırma tekniğidir. CEC için MIP-bazlı-mikro-kolonlar son zamanlarda çeşitli bileşiklerin (kiral bileşikler, aromatik aminoasitler) ayrımında kullanılmaktadır (Vasapollo ve diğ., 2011).

d) Diğer ayırma teknikleri

İnce tabaka kromatografisi (thin layer chromatography, TLC), membran-bazlı ayırmalar, adsorpsiyona dayalı kabarcık yüzdürerek ayırma gibi tekniklerde MIP’ler kullanılmaktadır (Haupt, 2001).

2.1.5.2. Sensör Uygulamaları

MIP teknolojisi uzun süre kararlılığını koruması, kimyasal inertliği, suda ve pek çok organik çözücüde çözünmemesinden dolayı sensör uygulamalarında da kullanılmaktadır. MIP teknolojisi, yüksek seçicilik ve duyarlılıkta antikor benzeri materyaller veya biyolojik enzimler ile kimyasal sensör yapma yeteneğine sahiptir (Vasapollo ve diğ., 2011; Mayes ve Mosbach, 1997). “Yapay antikor” çalışması, metakrilat bazlı baskılı polimerlerin bir sensör cihazında tanıma elementi olarak yüksek afinite ve seçicilik gösterdiğini kanıtlamaktadır (Mayes ve Mosbach, 1997).

2.1.5.3. *Kataliz Uygulamaları*

MIP'ler, yüksek sıcaklık ve basınca dayanıklı olması, organik çözücülere, asidik ve bazik koşullara karşı kararlı olmasından dolayı enzimler ve doğal katalitik antikorlar gibi biyomoleküllerin yerine kullanılabilir. MIP'in katalitik uygulaması çok önemlidir. Çünkü MIP katalizatörler, çeşitli tepkimelerde katalizatör olarak kullanılan antikor ve enzimlerin bağlanma alanlarının seçiciliği ve stereospesifikliğini taklit etmektedir. Katalitik olarak aktif baskılı materyaller, substrat analogları veya baskılama protokolünde kalıp ürün kullanılarak elde edilmektedir. Polimer matrisi kullanılan kalıp molekül ile benzer kavite içererek şekilde elde edilir (Vasapollo ve diğ., 2011).

2.1.5.4. *İlaç Dağıtım Uygulamaları*

MIP'lerin biyolojik aktif moleküllere kuvvetli ve seçimli bir şekilde bağlanma yeteneğine sahip olması, bu biyolojik alanda uygulama alanı bulmasını sağlamaktadır. Son yıllarda ilaç dağıtım sistemlerini hazırlamak için sentetik polimerik taşıyıcı olarak kullanılan MIP teknolojisi, tedavi alanında kullanılan maddeler konusunda büyük gelişmeler göstermiştir.

Baskılı-ilaç dağıtım sistemlerinin henüz klinik uygulamaları bulunmamaktadır. Çünkü moleküler baskılama teknolojisinin ilaç dağıtımına adapte edilebilmesi için çok ciddi güvenlik ve toksikolojik önlemlerin alınması gerekmektedir. MIP'ler hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşimi arttırabilmek için organik çözücülerde sentezlenmektedir. Ancak, MIP sentezinde kullanılan organik çözücüler genellikle hücre hasarlarına sebep olmaktadır. Bu sebeple bu türlü medikal uygulamalarda biyolojik sistemler ile uyumlu hidrofilik polimerler kullanılır (Vasapollo ve diğ., 2011).

2.1.6. *MIP Etkinliğinin Belirlenmesi*

Moleküler baskılamanın etkinliğini belirlemek için yapılan deneyler, baskılanmışlarla (MIP) aynı şartlar altında, ancak kalıp molekül olmadan sentezlenen baskılanmamış polimerlerle (non-imprinted polymer, NIP) karşılaştırmalı olarak değerlendirilir (Komiya ve diğ., 2001). Bu değerlendirmede *baskılama faktörü (BF)* önemli bir parametredir. Baskılama faktörü (BF), MIP'e bağlanan madde miktarının NIP'e bağlanan madde miktarına oranıdır. Bu değer baskılamadaki etkinliği ve seçiciliği gösterir. Bu oran kıyaslanan türler arasında ne kadar fazla olursa polimerdeki kalıba ait

hafıza o kadar etkin demektir. Baskılama faktörü eşitlik 2.2' ten yararlanılarak tespit edilir.

$$\text{Baskılama Faktörü (BF): } q_{\text{MIP}} / q_{\text{NIP}} \quad (2.1)$$

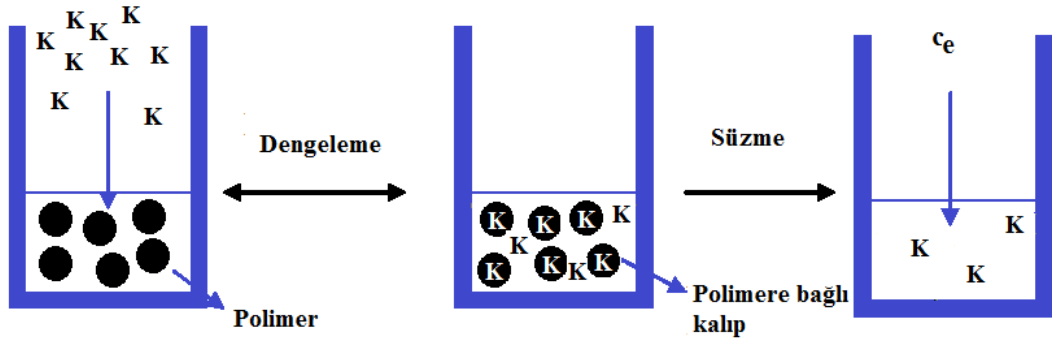
q_{MIP} : MIP'e bağlanan madde miktarı ($\mu\text{g g}^{-1}$)

q_{NIP} : NIP'e bağlanan madde miktarı ($\mu\text{g g}^{-1}$)

Polimerlerin adsorpsiyon (tutma) kapasitelerinin belirlenmesinde kesikli temas (batch) testi ve kopma (breakthrough) eğrisi yöntemi olmak üzere başlıca iki yöntemden faydalanılır.

2.1.6.1. Kesikli Temas (Batch) Testi

Kesikli temas (batch) testi yönteminde (Şekil 2.9), çalkalama banyoları veya manyetik karıştırıcılar kullanılarak belirli derişimdeki çözelti, içerisindeki adsorban ile belirli sürelerde çalkalanır. Denge sonrası adsorbanlar süzülerek çözelti fazından ayrılır. HPLC, UV veya diğer analitik yöntemlerle çözelti fazındaki ve adsorban üzerindeki madde derişimi ve yüzdesi eşitlik 2.1 ve 2.2' den yararlanılarak tespit edilir. (Komiya ve diğ., 2001).



Şekil 2.9: Kesikli temas (batch) testinin genel şematik gösterimi.

$$q = [(c_0 - c_e) \times V] / m \quad (2.2)$$

$$\% \text{ Adsorpsiyon} = [(c_0 - c_e) \times 100] / c_0 \quad (2.3)$$

q : Birim polimer başına adsorplanan madde miktarı ($\mu\text{g g}^{-1}$)

c_0 : Polimer tarafından adsorplanacak maddenin başlangıç derişimi (μM)

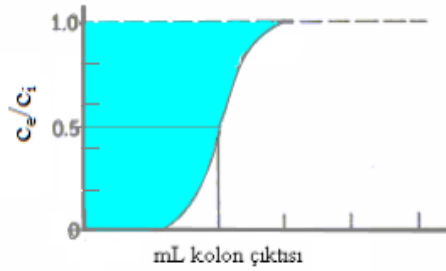
c_e : Denge de adsorplanmadan kalan madde derişimi (μM)

V : Çözelti hacmi (mL)

m : Polimer miktarı (g)

2.1.6.2. *Kopma (Breakthrough) Eğrisi Tekniği*

MISPE kolonundan (polimer üzerinden) bilinen derişimdeki çözeltili, kısımlar halinde geçirilir. Çalışılan çözeltili, belirlenen şartlar altında $c_e/c_i=1$ oluncaya kadar kolondan geçirilir. Etkin kapasite olarak da bilinen bu kapasite, kolonda bilinen miktardaki polimerin pratik kapasitesini verir. Breakthrough kapasitesi 1 g kuru adsorban veya 1 mL şişmiş adsorban birimine karşılık gelen milimol, miligram, mikrogram birimleri ile veya diğer uygun birimlerle ifade edilir. Böylece etkin kapasite, breakthrough (kopma noktası) eğrisi yardımıyla tayin edilir. Kolondan geçirilen çözeltilinin başlangıç derişimi (c_i) ve kolondan ayrılan çözeltilinin derişiminin (c_e) oranı (c_e/c_i) ordinata ve kolondan ayrılan çözeltili hacmi (V_e) absise konularak elde edilen eğrinin $c_e/c_i = 1$ doğrusuna kadar integrasyonundan bulunan değerın toplam alandan çıkarılmasıyla polimerin kapasitesi belirlenir. Elde edilen eğriler breakthrough (şekil 2.10) adlandırılır (Hennion, 1999; Tütem ve diğer., 1998; Yalçın, 2004).



Şekil 2.10: Adsorpsiyon işleminde dinamik kolon kapasitesinin breakthrough (kopma) tekniğine göre bulunması.

2.1.7. MIP'lerin Adsorpsiyon Parametrelerinin Belirlenmesi

Freundlich ve Langmuir izotermi, MIP'lerin adsorpsiyon parametrelerinin belirlenmesinde kullanılırlar.

2.1.7.1. *Freundlich İzotermi*

Freundlich izotermi (Rushton ve diğer., 2005; Li ve diğer., 2013; Hong ve diğer., 2013; García-Calzón ve Díaz-García, 2007; Ng ve diğer., 2003; Umpleby ve diğer., 2001a ve 2001b) adsorpsiyon dengesini tanımlayan bilinen en eski eşitliklerdendir Freundlich'e göre bir adsorbanın yüzeyi üzerinde bulunan adsorblama alanları heterojendir yani farklı türdeki adsorplama alanlarından oluşmuştur. Bu deneysel bağıntı, heterojen yüzey üzerinde adsorpsiyon ısısının ve ilgisinin eşit dağılmadığı, çok tabakalı adsorpsiyon için kullanılabilir. Freundlich eşitliği, adsorpsiyon enerjisinin komşu bağlanma

bölgelerinin dolu olup olmadığına bağlı olarak değiştiğini varsaymaktadır. Deneysel eşitlik aşağıdaki şekildedir;

$$q_e = K_f c_e^{1/n} \quad (2.4)$$

Bu eşitlikte

q_e : Adsorplama miktarı (μg madde g^{-1} polimer),

c_e : Çözeltide adsorplanmadan kalan madde derişimi (μM)'dir.

K_f ve $1/n$ sırasıyla adsorpsiyon kapasitesini ve adsorpsiyon şiddetini gösteren Freundlich sabitleridir.

Bu eşitlikte K_f ve n sabitleri sıcaklığa, adsorbent ve adsorbat maddeye bağlıdır. n 'nin değeri 1'den büyük olmalıdır. Bu durum ($n > 1$), adsorpsiyon işleminin elverişli olduğunu göstermektedir (Chiou ve Li, 2002).

Bu eşitlik her iki tarafın logaritması alınarak daha kullanışlı (doğrusal) hale getirilebilir:

$$\log q_e = \log K_f + 1/n \log c_e \quad (2.5)$$

Deneysel verilerin Freundlich modeline uygunluğunu incelemek amacıyla $\log c_e$ 'ye karşı $\log q_e$ grafiği çizilmiştir. Grafiğin doğrusal çıkması, Freundlich adsorpsiyon izoterminin uygulanabilirliğini gösterir. Çeşitli çevresel faktörlere bağlı olarak değişen deneysel adsorpsiyon sabitleri, K_f ve n , kesim noktası ve eğimden hesaplanabilir.

Genel olarak Freundlich modeli, adsorban derişimi arttıkça, dengede adsorplanan miktarların arttığı, heterojen yüzeylerdeki adsorplamayı ifade eden daha gerçekçi bir modeldir (Ng ve diğ., 2003).

2.1.7.2. Langmuir İzotermi

Langmuir izotermi (García-Calzón, J.A., Díaz –García, M.E., 2007; Ng ve diğ., 2003; Uempleby ve diğ., 2001b), adsorbent yüzeyinde adsorplayıcı noktaların olduğunu farz eder. Her adsorplayıcı noktanın bir molekül adsorplayacağını kabul ederek oluşan tabakanın bir molekül kalınlığında bir tabaka olacağını söyler. Langmuir izoterminde adsorpsiyon, adsorbat derişiminin artışı ile doğrusal olarak artış gösterir. Denge

halinde maksimum adsorpsiyon kapasitesine ulaşılmış ve yüzey tek tabakayla kaplanmış olur. Bu durumdan itibaren adsorbe edilen adsorbat miktarı sabitlenir. Langmuir izoterminde adsorpsiyon enerjisi tek düze dağılım gösterir. Langmuir modeli řu denklemlerle açıklanır:

$$q_e = q_{maks} \cdot b \cdot c_e / (1 + b \cdot c_e) \quad (2.6)$$

$$c_{eq} / q_e = 1 / (q_{maks} b) + c_{eq} / q_{maks} \quad (2.7)$$

Burada;

c_e : Adsorplama sonrası çözeltilerde kalan maddenin derişimi (μM),

q_e : Adsorbentin birim kütlesi başına adsorplanan madde miktarı ($\mu\text{g g}^{-1}$),

b : Adsorpsiyon enerjisini ifade eden Langmuir sabiti ($\text{L } \mu\text{mol}^{-1}$),

q_{maks} : Adsorpsiyon kapasitesini ifade eden Langmuir sabiti ($\mu\text{g g}^{-1}$)'dir.

c_e/q_e değerinin, c_e değerine karşı değişiminin grafiğe geçirilmesiyle ortaya çıkan doğrunun eğimi $1/q_{maks}$ sabitinin değerini verirken kesim noktası da $1/bq_{maks}$ değerinden b sabitini verecektir. Adsorpsiyonun elverişliliğini bulmak için Webber ve Chakkravorti tarafından tanımlanan boyutsuz ayırma R_L sabiti (dağılma veya boyutsuz ayırma faktörü) aşağıdaki denklemden hesaplanır ve bu sabitin 0 ile 1 arasında değerler alması elverişlilik durumunun sağlandığına işaret eder (Guo ve diğ., 2004).

$$R_L = 1 / (1 + b \cdot c_0) \quad (2.8)$$

b (a_L): Langmuir sabiti ($\text{L } \mu\text{mol}^{-1}$)

c_0 : Maddenin çözeltildeki başlangıç derişimi ($\mu\text{mol L}^{-1}$)

Bu eşitlikten bulunana R_L değerleri; $R_L > 1$, $R_L = 1$, $0 < R_L < 1$ ve $R_L = 0$ olduğu durumlarda sırasıyla adsorpsiyon izoterminin elverişsiz doğrusal, elverişli ve tersinmez olduğunu gösterir (Guo ve diğ., 2004).

2.2. FENOLİK BİLEŞİKLER

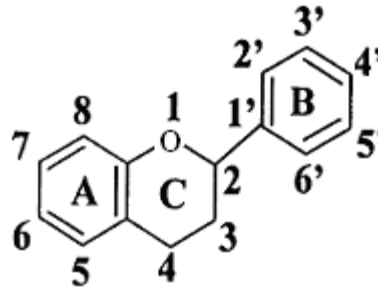
Polifenoller; bitki dünyasının büyük bir kısmında bulunan, fitokimyasalların en geniş sınıflarından birini oluşturan ve insan yaşamında gerekli olan bileőiklerdir. Polifenoller

güçlü antioksidanlardır ve aktiviteleri kimyasal yapılarına bağlıdır. Bitki polifenollerini çok fonksiyonlu olup, indirgeme aracı, hidrojen atomu verici ve singlet oksijen söndürücü olarak davranırlar. Bazı polifenoller ise metal iyonu kelatlama özelliklerine sahip antioksidanlar olarak etkilidirler.

Besinlerde bulunan fenolik maddeler; flavonoidler, fenolik asitler, fenolik polimerler (tanenler) olmak üzere üç sınıfa ayrılır (Rice-Evans ve diğ., 1996).

2.2.1. Flavonoidler

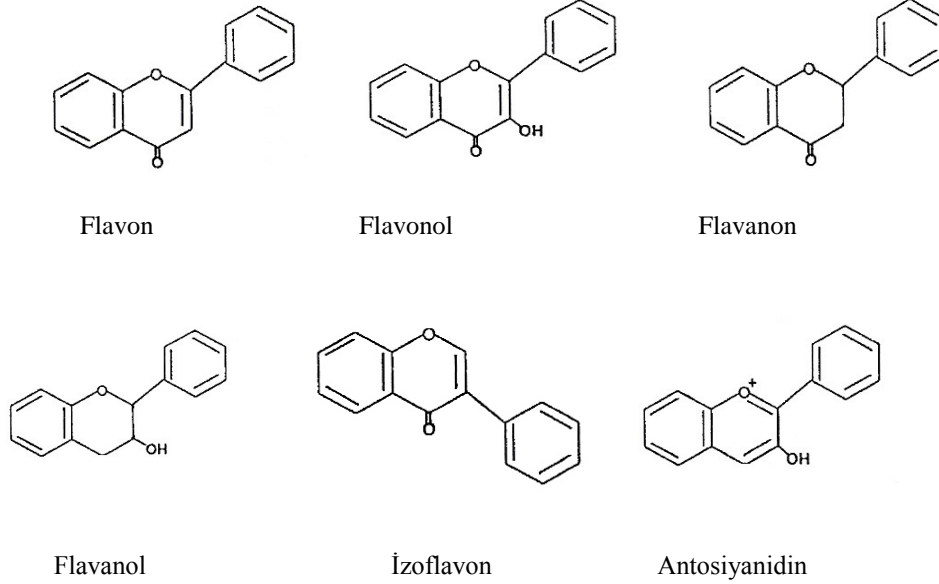
Bitki fenollerinin en geniş sınıfını difenilpropan ($C_6C_3C_6$) iskeletine sahip flavonoidler oluşturmaktadır (Canedas ve Packer, 2002). Flavonoidler; önemli antioksidan ve kelatlama özelliğine sahip, düşük molekül ağırlıklı ve en geniş bitki fenolikleri sınıfıdır. 6 karbonlu A, B ve 3 C'lu C halkalarından oluşan heterosiklik bileşikler, hetero halkanın yükseltgenme derecesine göre farklılaşırlar. Aromatik halkalar A ve B, hetero halka ise C olarak ifade edilir. Karbon atomları C halkasındaki oksijenden başlayarak, B halkasındaki karbon atomları ise üssü (') rakamlarla numaralandırılır (Şekil 2.11). Doğada, birçoğu yaprak, çiçek ve kökte bulunan 4000'den fazla flavonoid çeşidi vardır. Meyve, sebze, şarap, kakao ve çayda bol miktarda bulunurlar. Yiyeceklerde genellikle 3-O-glikozitleri ve polimerleri şeklinde bulunurlar. Glikozit birimi genellikle glukozdur ancak glukoramnoz, galaktoz, arabinoz ve ramnoz ya da daha farklı olabilmektedir. Bağırsaklarda hidrolizlenerek biyolojik bakımdan aktif aglikonlara dönüşürler. İnsan ve hayvanlarda mide-bağırsak sisteminden emilirler, değişmeden ya da metabolitleri halinde idrar ve dışkı ile atılırlar (Cook ve Samman, 1996; Heim ve diğ., 2002).



Şekil 2.11: Flavonoidlerin genel yapısı.

Flavonoidler; antosiyaninler ve antoksantrinler şeklinde sınıflandırılır. Antoksantrinler, renksiz veya beyazdan sarıya dönük renkte olurlar ve flavon, flavonol, flavanol,

flavanon, izoflavon ve dihidrokalkonlar olarak sınıflandırılırlar (Canedas ve Packer, 2002).



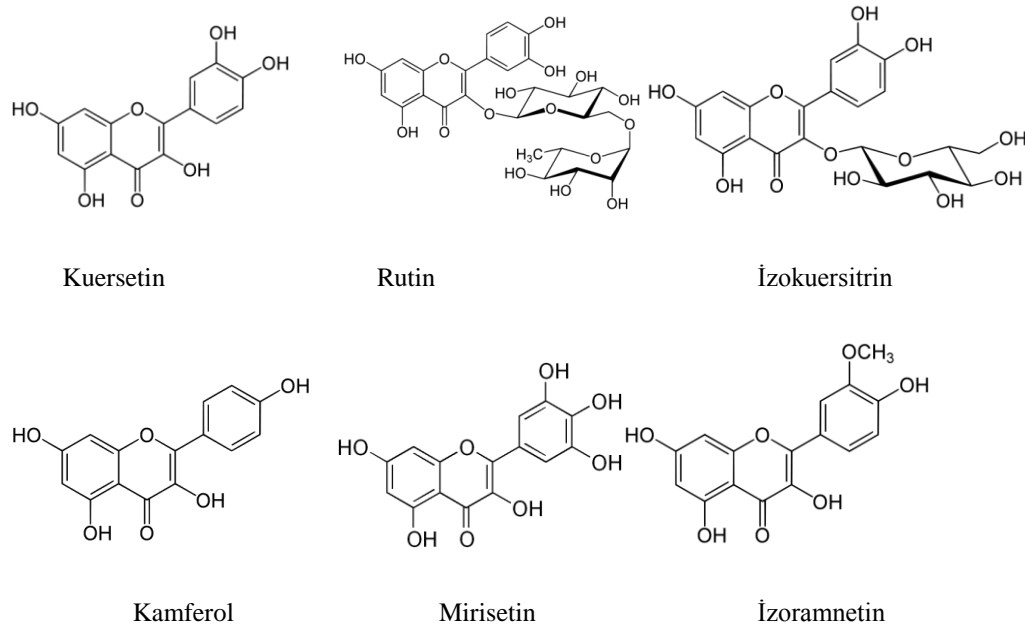
Şekil 2.12: Flavonol, flavon, flavanon, flavanol, izoflavon ve antosiyanidin'in kimyasal yapıları.

Antosiyaninler, antosiyanidinlerin glikozitleri olup çiçeklere ve meyvelere kırmızı, mavi ve mor renkleri veren, suda çözünebilen en önemli bitki pigment sınıfıdır. Flavanonlar ve flavonlar çoğunlukla birlikte bulunur ve belirli enzimlerle bağlıdırlar. Çoğu bitki familyasında, flavonlar ve flavonoller arasında karşılıklı bir dışlama vardır ve flavanonca zengin bitkilerde antosiyaninler neredeyse hiç yoktur (Canedas ve Packer, 2002).

Flavonoller (3-hidroksiflavon), flavonun 3 no'lu C atomuna bağlı bir hidroksil grubu taşırlar. Flavonoidlerin bitkilerde en yaygın olarak bulunan sınıfıdır. En önemli flavonoller kuersetin, glikozitlenmiş kuersetin (rutin), kamferol, mirisetin, izoramnetindir (Aherne ve O'Brien, 2002; Heim ve diğ., 2002; Rice-Evans ve diğ., 1996).

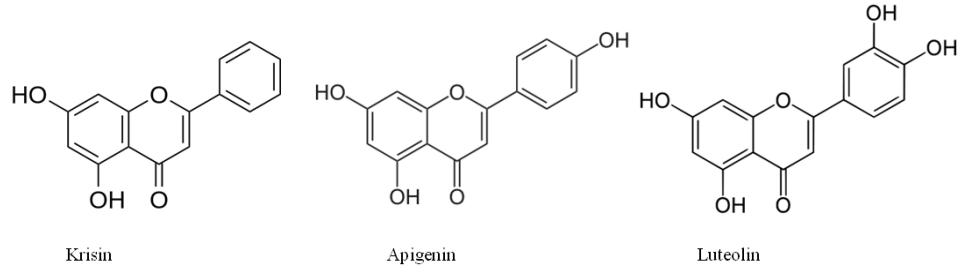
Kuersetin, flavonoidlerin en aktif ve en önemli bileşiği ve bitkilerin temel fenolik bileşenidir. Meyve ve sebzelerde, özellikle soğan, elma ve üzümde bol miktarda bulunmaktadır (Karaman, 2008; Moskaug ve diğ., 2004). Kuersetin meyve ve

sebzelere en çok glikozitleri halinde bulunmaktadır (en çok glukoz ve ramnozları). Kuersetin; antioksidan, antiviral, antiinflamatuvar ve antitümör özellikleri gibi biyolojik aktivitesi sebebiyle pek çok biyolojik aktif takviyeler ve medikal preparatlarda kullanılan gittikçe ilgi çeken bir konu haline gelmiştir (Song ve diğ., 2009; Boots ve diğ., 2008). Ayrıca kuersetin, *in vitro* ortamda antifibrotik, antikoagülatif, antibakteriyel, antiaterojenik, antihipertansif ve antiproliferatif özellik göstermektedir (Boots ve diğ., 2008). Bu sebeple kuersetinin çeşitli bitkisel matrislerden izolasyonu önemli bir araştırma konusu haline gelmiştir. Ayrıca kuersetinin biyolojik bileşiklerin yanı sıra çok bileşenli gıda ürünlerinden önderişiklendirmesi (zenginleştirilmesi) önemli ve gerekli olan bir aşamadır. Kuersetinin izolasyonu ve zenginleştirilmesi kalıp molekül olarak kuersetin ile hazırlanan moleküler baskılı polimerler kullanılarak gerçekleştirilmektedir (Hong ve Chen, 2013; Chen ve diğ.; 2012; Pakade ve diğ., 2013; Xie ve diğ., 2001).



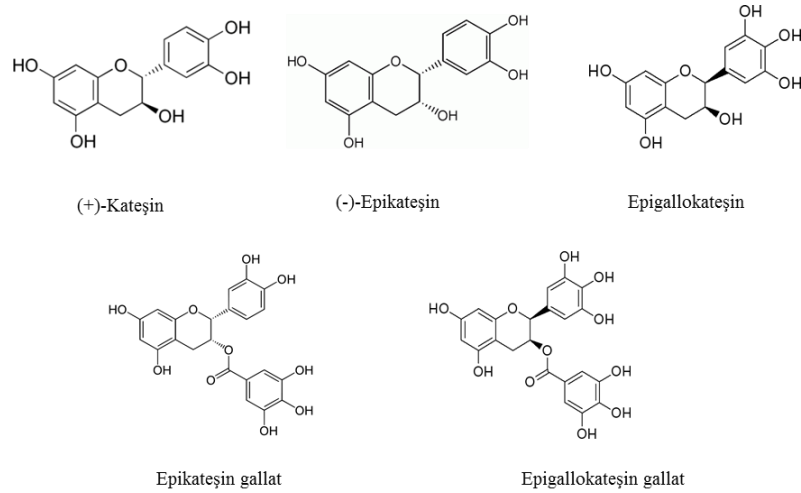
Şekil 2.13: Başlıca flavonollerin kimyasal yapıları.

Flavon sınıfına ait temel bileşikler apigenin, luteolin ve krisindir. Maydanoz, kereviz ve zeytinde bol miktarda bulunmaktadır (Karaman, 2008).



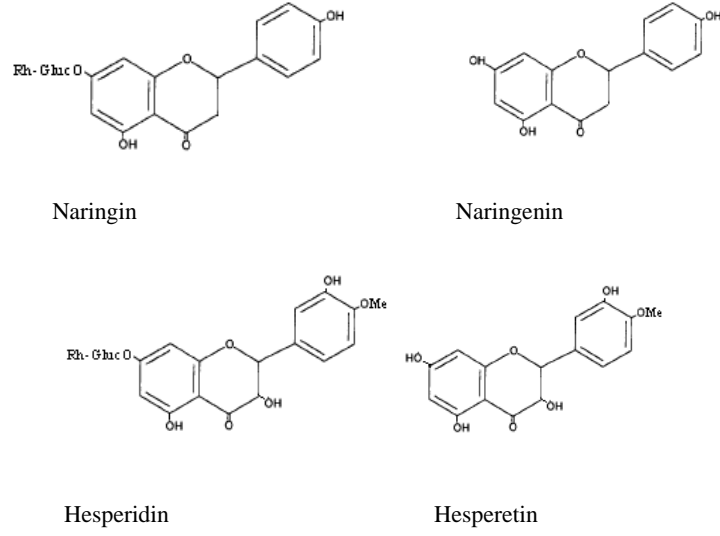
Şekil 2.14: Başlıca flavonların kimyasal yapıları.

Flavonoidlerin C halkasında C-4'teki karbonil grubunun mevcut olmaması halinde flavanol oluşur. Flavanoller flavonların indirgenmiş türevleridir. En önemlileri kateşin ve epikateşin'dir. Kateşin ve epikateşinin gallik asitle kombinasyonları sonucu kateşin ve epikateşin gallatlar meydana gelir. Bu bileşikler çoğunlukla yeşil ve siyah çayda, kırmızı ve beyaz şarapta, şeftalide ve elmada yüksek miktarda bulunur (Karaman, 2008).



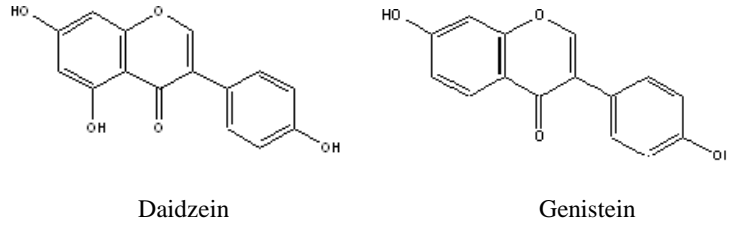
Şekil 2.15: Başlıca flavanollerin ve gallik asit türevlerinin kimyasal yapıları.

Flavonun dihidro türevleri ise flavanonlardır. En önemlileri naringenin, naringin, hesperidin ve hesperetindir. Naringenin 3'-hidroksi flavanondur. Greyfurtun karakteristik acılığını veren bileşik naringenin glikoziti, naringindir. Naringenin aglikonu olan naringenin ise acı değildir. Hesperidin ve hesperetin limon ve portakalda yüksek miktarda bulunur. Hesperidin, hesperetin glikozitidir.



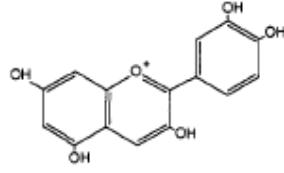
Şekil 2.16: Başlıca flavanonların kimyasal yapıları.

Flavonların izomeri olan izoflavonların en bilinen bileşikleri genistein ve daidzein olup baklagil ve soya fasulyesinde fazla miktarda bulunmaktadır.

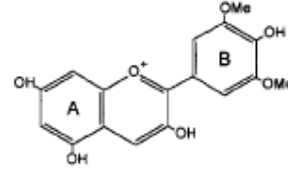


Şekil 2.17: Başlıca izoflavonların kimyasal yapıları.

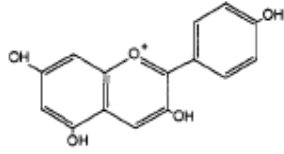
Antosiyaninler, suda çözünen, çiçeklere pembe ve turuncudan mavi ve mora değişen, meyvelere ise kırmızı ve mor renk veren pigmentlerdir. Aglikonları antosiyanidinlerdir. Renkleri büyük ölçüde pH'a bağlıdır. En önemlileri; apigenidin, siyanidin, malvinidin ve delfinidin'dir. Siyanidin galaktozit elmada bulunan antosiyanidinlerdendir.



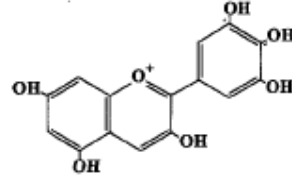
Siyanidin



Malvidin



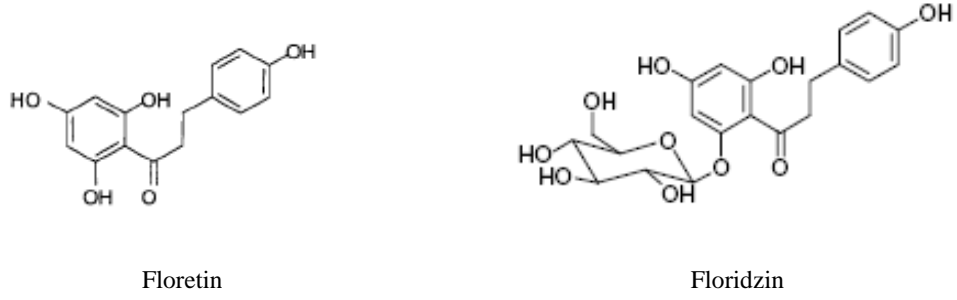
Apigenidin



Delfinidin

Şekil 2.18: Başlıca antosiyanin ve antosiyanidinlerin kimyasal yapıları.

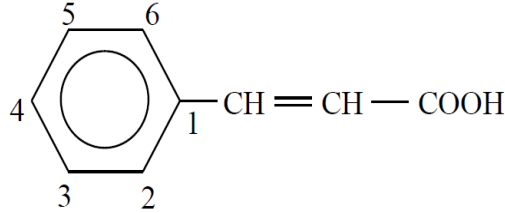
Dihidroalkonlar (floretilin), merkezi piran halkasının açık olmasından dolayı diğer flavonoidlerden farklı bir yapıya sahiptir. Bu bileşikler elma ve elma türevi ürünler (elma suyu, elma şırası gibi) için karakteristiktir. En fazla bulunan, floretin türevi olan floridzindir (floretilin glukozit) floretin ksiloglukozit, daha düşük miktarda bulunmaktadır. Bu dihidroalkon glikozitleri elmanın et ve kabuğunda bulunmakla beraber çekirdekdeki miktarı daha yüksektir.



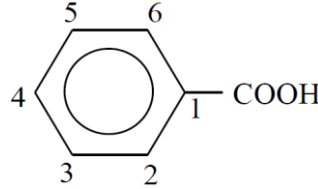
Şekil 2.19: Floretin ve floridzin'in kimyasal yapıları.

2.2.2. Fenolik Asitler

Bitkilerde yüksek miktarda bulunan fenolik asitler, hidroksisinnamik (Şekil 2.20) ve hidroksibenzoik (Şekil 2.21) asitleri içeren iki gruptan oluşur.



Şekil 2.20: Hidroksisinnamik asitlerin genel kimyasal yapısı.

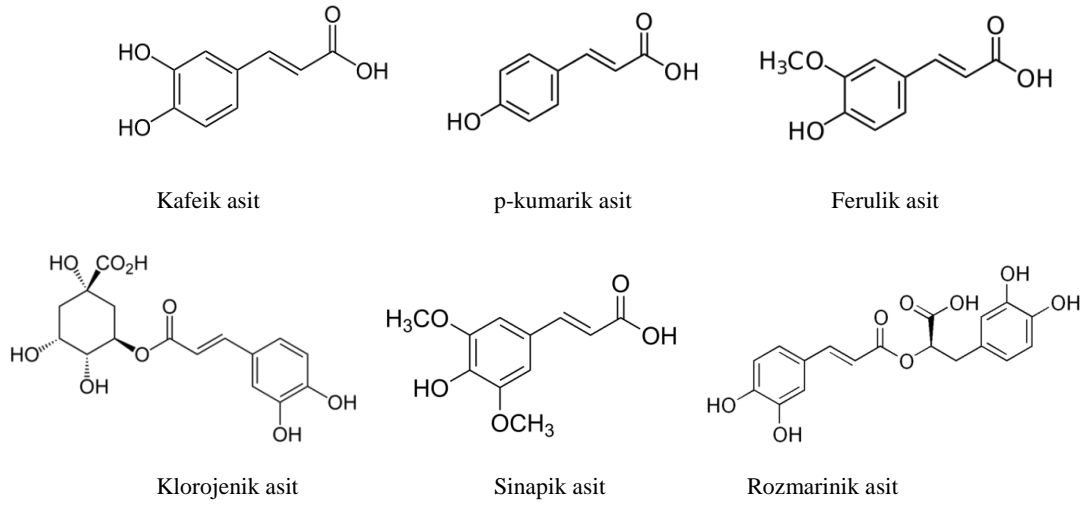


Şekil 2.21: Hidroksibenzoik asitlerin genel kimyasal yapısı.

2.2.2.1. Hidroksisinnamik Asitler

Hidroksisinnamik asitler, fenil-propanoid türevleridir ve genellikle bitkisel gıdalarda bulunur. Hidroksisinnamik asitler, bitkilerin fenolik metabolizmalarında merkezi rol oynayan ve fenilalaninin biyosentetik türevi olan fenolik bileşenlerdir. Bu bileşikler aynı zamanda flavonoidlerin öncüsüdür ve bitkilerde hücre duvarının yapısına katılırlar. Genellikle bu tür fenolik asitler bitkilerde esterleri halinde veya şekerlerle, organik asitlerle veya yağlarla birleşmiş halde bulunurlar. Hidroksisinnamik asitler trans konumunda daha kararlıdır (Abu-Amsha ve diğ., 1996; Maurya ve Devasagayam, 2010). Ancak UV ışınlarına maruz bırakıldıklarında trans izomerinden cis izomerine

dönüşürler. Bu bileşenler meyve, sebze, çiçek, fındık, tohum, şarap, çay, kahve ve zeytinyağı gibi bitkisel (veya bitki temelli) ürünlerde bulunurlar. Kafeik asit, p-kumarik asit ve kafeik asidin kuinik asit esteri olan klorojenik asit, elma, armut, üzüm gibi meyvelerde ve bitkilerde en çok bulunan hidroksisinnamik asitlerdir. Klorojenik asit, kafeik asidin depolanma şekli olarak düşünülmektedir, çünkü klorojenik asidin biyosentezi sırasındaki tersinirdir (Chen ve Ho, 1997; Karaman, 2008). Kafeik asit birçok bitki ve içecekte bulunan bir fenolik antioksidandır ve meyvelerdeki toplam hidroksisinnamik içeriğinin %70 ini oluşturmaktadır. Kafeik asit, iltihabı (inflamasyon) yavaşlatan böylece serbest radikallerin zararlı etkilerine ve endotelial hasara karşı koruma gibi önemli biyolojik etkileri olan bir antioksidandır (Maurya ve Devasagayam, 2010). Bu sebeplerden dolayı kafeik asidin izolasyonu ve zenginleştirilmesi önemli bir araştırma konusu olmakta ve bu amacı gerçekleştirebilmek için kafeik asidin kalıp olarak kullanılmasıyla kafeik asit baskılı polimerler sentezlenmektedir (Li ve diğ., 2013; Li ve diğ., 2005; Zhu ve diğ., 2011; Valero-Navarro ve diğ., 2011; Michailof ve diğ., 2008).

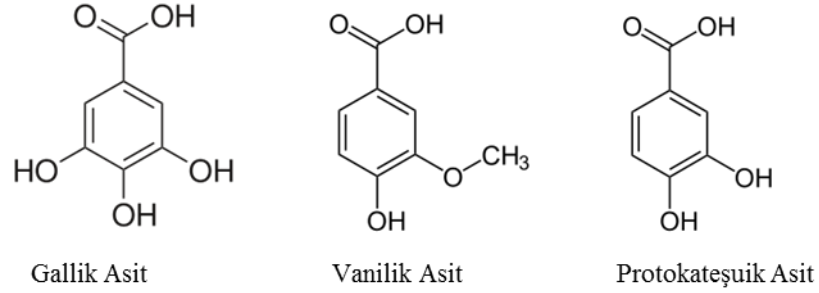


Şekil 2.22: Başlıca hidroksisinnamik asitlerin kimyasal yapıları.

2.2.2.2. Hidroksibenzoik Asitler

Hidroksibenzoik asitler yapılarındaki hidroksi ve metoksi gruplarının yerleşimi ve sayılarına göre çeşitlenirler. Bunlardan birkaçı; gallik, vanilik ve protokateşuik asittir. Monohidroksibenzoatlar etkili hidroksil radikali süpürücülerdir çünkü hidroksillenmeye

ve hidroksil radikallerine yüksek reaktivite göstermeye eğilimlidirler. Fenolik halka ile karboksilat grubu arasında metilen grubu girmesiyle oluşan fenilasetik asitlerde *orto* ve *meta* hidroksi türevleri 1 mM'a yakın antioksidan aktivite gösterirler. Dihidroksibenzoik asit türevlerinin antioksidan aktiviteleri hidroksil gruplarının pozisyonlarına bağlı olup, *o-p* pozisyonlarında aktivite yüksek olurken *m-p* pozisyonlarına sahip olanlarda aktivite düşer (Canedas ve Packer, 2002; Karaman, 2008).



Şekil 2.23: Başlıca hidroksibenzoik asitlerin kimyasal yapıları.

2.3. KAFEİK ASİT VE KUERSETİNLE BASKILI POLİMERLERLE YAPILMIŞ ÇALIŞMALAR

Tablo 2.1 ve 2.2' de kuersetin ve kafeik asit baskılı polimerlerle literatür bilgileri özetlenmiştir.

Tablo 2.1: Kuersetin ile ilgili çalışmalar.

| Kalıp molekül (K) | Monomer (M) – Çapraz bağlayıcı (ÇB) | Porojen | Polim. Tekniği | K: M: ÇB mol oranı | Doğal örnek | MIP uygulana alanı | Seçimliliği araştırılan fenolik bileşikler | Adsorpsiyon – Karakterizasyon | Ref |
|-------------------|-------------------------------------|--|-----------------|----------------------------------|---------------------------------|--------------------|---|-------------------------------|---------------------------|
| KUE | AA-EDMA | THF | Bulk (non-kov.) | 1:5:50 | Gingko bitki yaprakları | MIP-HPLC, MISPE | KUE, KR, MOR, NAR, RT, OHP, GHF, GA | - | Xie ve diğ., 2001 |
| KUE, RT, C-fla | 4-VP , MAA – EDMA | Aseton , ACN, ACN: DMSO (9:1, v/v) | Bulk (non-kov.) | 1:8:40 | Şarap | MISPE | KUE, MOR, FS, KAT, RT, C-fla, FR | - | Weiss ve diğ., 2002 |
| KUE, RT | AA, MAA, 4-VP -EDMA | DMSO:ACN (2:3, v/v) (KUE için), DMSO:DMF (3:1,v/v) (RT için) | Bulk (non-kov.) | 1:5:20 | Şarap, yeşil çay, portakal suyu | MIP-HPLC, MISPE | PiroKAT, REZ, KRE, EKAT, KAT, KUE | - | Theodoridis ve diğ., 2006 |
| KUE | MAA-TRIM | MeOH | Bulk (non-kov.) | 1: 5: 25 | <i>Herba Lysimachiae</i> | MIP-MSPD | KUE, BER | Scatchard analizi - FTIR | Hong ve Chen, 2013 |
| KUE | AA-EDMA | THF , Aseton, 1,4-dioksan, ACN | Bulk (non-kov.) | 1:7:47 | <i>Cacumen platycladi</i> | MISPE | KUE, RT, KATŞ | Scatchard analizi – FTIR, SEM | Song ve diğ., 2009 |
| KUE | 4-VP-EDMA | MeOH: H ₂ O (9:1, v/v), MeOH, THF, <u>THF:H₂O:MeOH (6:3:1, v/v/v)</u> | Bulk (non-kov.) | 1:10:40, <u>1: 10: 46</u> | Sarı soğan | MISPE | KUE, KUE-4'-glikozit, KUE-3,4'-diglukozit, MOR, KAM | FTIR, SEM, TGA | Pakade ve diğ., 2012 |

Tablo 2.1 (devam).

| | | | | | | | | | |
|-----|---|---|---|--|--|----------|--|---|------------------------------|
| KUE | MAA - EDMA | MeOH: H ₂ O (1: 1, v/v) | Nanokürecik formatlı çöktürme | 1: 16: 25 | İlaç salınım sistemleri | - | KUE, KAT | SEM | Curcio ve diğ., 2012 |
| KUE | 4-VP , 4-VP: AA (1:1) - EDMA | Aseton | Bulk (non-kov.) | 1:4:40, 1:(4:4):40, 1:8:40 , 1:6:30, 1:10:40, 1:12:60, 1:16:60, 1:20:100 | - | MIP-HPLC | KUE, MOR, FS, KAT, RT, C-fla | BET - ¹ H NMR | O'Mahony ve diğ., 2006 |
| KUE | 4-VP , MAA - EDMA , TRİM | Aseton, aseton: ACN (1:1, v/v), aseton:ACN (3:1, v/v) , ACN, THF | Bulk (non-kov.) | 1:1:5, 1:4:20 , 1:5:30, 1:6:30 | Yeşil ve siyah çay, üzüm atıkları, kakao | MISPE | KUE, KAT, EpigalloKAT gallat, EKAT | Freundlich, Langmuir, Allosteric, Dubinin- Radushkevich- FTIR, SEM, BET | López ve diğ., 2012 |
| KUE | <u>AA</u> , DMAEMA - EDMA | Aseton | Bulk (non-kov.) | 1:2:10 , 1:2:20, 0,5:2:10, 0,125:2:10 | - | - | KUE, NAR, MOR, FS | - | Kudrinskaya ve diğ., 2009 |
| KUE | MAA - DEGDA | DMF | Makrogözenekli kitosan boncukları kullanılarak (non- kov.) | 7:140:13,6 | - | MIP-HPLC | KUE, İZORM | Langmuir, Freundlich/SEM | Xia ve diğ., 2006 |

Tablo 2.2: Kafeik asit ile ilgili çalışmalar.

| Kalıp molekül (K) | Monomer (M) – Çapraz bağlayıcı (ÇB) | Porojen | Polim. Tekniği | K: M: ÇB mol oranı | Doğal örnek | MIP uygulana alanı | Seçimliliği araştırılan fenolik bileşikler | Adsorpsiyon – Karakterizasyon | Ref |
|-------------------|---|---|---------------------------|---|-----------------------------------|--------------------|---|-------------------------------|------------------------------|
| KA | AA- EDMA | Sikloheksanol-dodekanol | Monolitik bask. (non-kov) | 1:1,54:2,88 | <i>Salicornia herbea</i> yapr. | MISPE | 3,4-diHBA, KA, FA | SEM | Zu ve diğ., 2011 |
| KA, <i>p</i> -HBA | 4-VP , MAA, alilanolin, alilüre EDMA (<i>p</i> -HBA için) PETRA (KA için) | THF (KA için) ACN (<i>p</i> -HBA için) | Bulk (non kov.) | 1:4:12 (KA için) 1:4:20 (<i>p</i> -HBA için) | Zeytin yağı fabrikası atık suları | MISPE, MIP-HPLC | GA, <i>p</i> -HBA, 3,4-diHBA, KA, vanilin, VA, tirozol, <i>p</i> -KUA | Freundlich, Langmuir | Michailof ve diğ., 2008 |
| KA | MAA- EDMA | THF: izooktan (2:1, v/v) | Monolitik bask. (non-kov) | 1:4:12 | - | MIP-HPLC | KA, GA, KLA, VA | Freundlich, Langmuir | Li ve diğ., 2004 |
| KA | 4-VP- DVB-80 | ACN: toluen (75:25, v/v) | Çöktürme polim. | 1:4:20 | Ticari elma suyu | MIP-HPLC | <i>p</i> -HBA, KIA, FA, DHKA, <i>p</i> -KUA, 3,4-diHBA, KA, KLA | Freundlich, SEM | Valero-Navarro ve diğ., 2011 |

2.4. ÇALIŞILAN DOĞAL ÖRNEKLER

2.4.1. Isırgan (*Urtica dioica*)

Isırgan otu, pro-vitamin A ve C vitamini ve mineraller açısından zengindir. Yapılan araştırmalar ısırgan yapraklarının esansiyel amino asitler, askorbik asit, karbonhidratlar ve çeşitli mineralleri içeren önemli bir kaynak olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca ısırganın antioksidan, antiinflamatuvar, bağışıklık-baskılayıcı ve antiromatizmal etkileri bulunmaktadır. Orta Avrupa ülkelerinde, ısırgan yaprakları romatoit artrit ve diğer iltihaplı hastalıkların sonuçlarını azaltmak amacıyla çay olarak tüketilmektedir (Toldy ve diğ., 2009).

Ayrıca Türkiye’de de bu etkilerinin yanı sıra halk hekimliğinde mide hastalıkları, öksürük ve karaciğer yetmezliğinin tedavisinde kullanılmaktadır (Gülçin ve diğ., 2004).

2.4.2. Yeşil Kahve Çekirdeği (*Coffea arabica*)

Kahve dünya çapında en yaygın olarak tüketilen içeceklerden biridir (Shimoda ve diğ., 2006). Yeşil kahve büyük oranda kafein ve polifenol içeriğine sahiptir. Polifenoller arasında en fazla kafeik asidin kuinik asit esteri olan klorojenik asit olmak üzere bunun yanında kafeik asit, ferulik asit ve *p*-kumarik asit içermektedir. Kahvenin kavrulma işlemi sırasında polifenol içeriği değişmektedir. 10 g kahve içeren bir fincan kahvede ortalama 15-325 mg klorojenik asit bulunmaktadır. (Richelle ve diğ., 2001; Shimoda ve diğ., 2006). Kahvenin antioksidan ve antineoplastik etkileri bulunmaktadır. Yeşil kahve hafif, yeşil fasulye benzeri bir aromaya sahiptir; kahvenin karakteristik aroması kavurma işlemi sırasında gelişir (Naidu ve diğ., 2008). Son yıllarda yapılan araştırmalar insan ve farelerde yeşil kahve ekstraktlarının antihipertensif etki gösterdiği ispatlanmıştır. Ayrıca insan vazoreaktivitesinde iyileşme meydana getirir, fare ve insanlarda yağ birikimi ve vücut ağırlığı üzerinde inhibitör etkisi gösterir ve insanlarda glukoz metabolizmasının modülasyonunu sağlamaktadır (Farah ve diğ., 2008). Kahvenin içerdiği kafeinin merkezi sinir sistemi, kardiyovasküler sistem ve endokrin sistem üzerinde etkileri vardır. Yapılan araştırmalar kahve kafeinin modern toplumlardaki dejeneratif hastalıkları önlediğini göstermektedir (Shimoda ve diğ., 2006).

2.4.3. Siyah Çay (*Camellia sinensis*)

Çayları birçok kritere göre sınıflandırmak mümkün olmakla beraber; üç temel çay çeşidi vardır. Bunlar, siyah çay, yeşil çay ve beyaz çaydır. Dünyada üretilen ve tüketilen çay miktarının % 78'i siyah çaya, % 20'si yeşil çaya ve < % 2'si de beyaz çaya aittir. Siyah çay başta batı ülkeleri olmak üzere bazı Asya ülkelerinde tüketilir oysa yeşil çay Çin, Japonya, Hindistan ve bazı Kuzey Afrika ülkelerinde ve Orta Doğu'da tüketilir. Yeşil çay, flavanoller, flavandioller, flavonoller ve fenolik asitleri içerir. Yeşil çay flavanollerinin büyük kısmını kateşinler oluşturmaktadır. Siyah çayda ise tiamflavin ve tiarubigin başlıca polifenollerdir. Çayın içerdiği bu polifenolik bileşenler sayesinde özellikle kanser önleyici olarak ve kalp-damar hastalıkları üzerinde olumlu etkilere sahip oldukları kanıtlanmıştır (Mukhtar ve Ahmad, 2000; Yang ve Landau, 2000).

2.4.4. Kırmızı Soğan (*Allium cepa L.*) Kabuğu

Soğan, pek çok ülkede günlük flavonoidlerin en büyük kaynaklarından biridir. Yapısında en fazla bulunan flavonoid, kuersetindir. Soğanların içerdiği kuersetin miktarı, soğan türüne ve kısımlarına bağlıdır. Soğanların kabuk kısımlarında en fazla bulunan antioksidan, kamferoldür ancak diğer kısımlarının başlıca flavonoidi kuersetindir. Kırmızı soğanların içerdikleri kuersetin miktarı sarı soğanların yaklaşık iki katıdır (Nuutila ve diğ., 2003). Kırmızı soğanlar ayrıca siyanidin ve peonidin türevlerinden oluşan antosiyaninleri içermektedir.

Soğan kabukları glukoz ve fruktoz içermektedir. Hem antosiyaninler hem de flavonoller şekerli formları halinde soğanda bulunurlar (Cools ve diğ., 2010).

Soğan ekstraktları, hipokolesterolemik, hipolipidemik, antihipertensif, antidiabetik, antitrombotik ve antihiperhomosisteinematik etkilerinden dolayı kardiyovasküler hastalıklarda etkindir. Antimikrobiyal, antioksidan, antikarsinojenik, antimutajenik, antiastımatik, immünomodülatör ve prebiotik etkilere de sahiptir (Corzo-Martínez ve diğ., 2007).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. CİHAZ LİSTESİ

- Radwag AS 220/C/2 analitik terazi, kimyasal madde ve örneklerin tartımı için;
- Bandelin Sonorex ultrasonik banyo, ekstraksiyon işlemleri ve kimyasal maddelerin çözünmesine yardımcı olmak için;
- GFL 1008 ve HB4 basic KIKA-WERKE su banyoları, sentez ve hidroliz işlemleri için;
- Heidolph ısıtıcılı manyetik karıştırıcı; sokslet ekstraksiyon işlemleri için,
- Büchi R210/215 marka evaporatör, ekstraktların vakumda kuruluğa kadar buharlaştırılması için;
- Hamilton marka 1 mL'lik ve 3 mL'lik boş katı faz ekstraksiyon kartuşları;
- Agilent 12 port katı faz ekstraksiyon sistemi ve Isolab vakum pompası, katı faz ekstraksiyon işlemleri için
- Retsch marka 100-150 µm elek sistemi, polimerleri belirli tanecik boyutlarına getirmek için;
- Biosan OS-20 orbital çalkalayıcı, kesikli temas (batch) testleri için;
- Elektro-mag girdap karıştırıcı, çözeltileri karıştırmak için;
- Millipore Simpax 1 Synergy 185 bidistile su sistemi;
- Shimadzu 2600 UV-Vis spektrofotometre, absorbans ölçümleri ve spektrum çizimleri için;
- HELMA marka 10 mm ışına yollu bir çift kuartz küvet;
- Waters Breeze 2 Model HPLC cihazı (Milford, MA, USA): 1525 model ikili pompa, termostatlı kolon fırını, 2998 model fotodiyot dizisi dedektör (PDA) (Chelmsford, MA, USA), Hamilton marka 25 µL-şırınga (Reno, NV, USA), ACE C18 analitik kolon (4.6 mm×250 mm, 5 µm) (Milford, MA, USA), HPLC ayrımları için;
- Empower PRO (Waters Associates, Milford, MA, USA) yazılımı, HPLC data analizleri için;

- JEOL-7001 FESEM cihazı, SEM analizi için;
- Perkin Elmer Spectrum BX FTIR cihazı, FTIR spektrum çizimleri için.

3.2. KİMYASAL MADDELER

Kullanılan kimyasal maddeler; vanilik asit (VA), akrilamid (AA) (Fluka), gallik asit (GA), asetonitril (ACN), metanol (MeOH), sodyum sülfat, asetik asit (Sigma Aldrich), floridzin (FL), *p*-kumarik asit (*p*-KUA), (+)-kateşin hidrat (KAT), (-)-epikateşin (EKAT), rutin hidrat (RT), klorojenik asit (KLA), kafeik asit (KA), rosmarinik asit (RA), mirisetin (MR) (Sigma), 4-hidoksibenzoik asit (4-HBA), 3,4-dihidroksibenzoik asit (3,4-diHBA), ferulik asit (FA), sinapik asit (SA), kuersetin hidrat (KUE), 4-vinilpiridin (4-VP), metakrilik asit (MAA), 1-vinil imidazol (1-VI), etilenglikol dimetakrilat (EDMA), 2,2'-azobisisobutironitril (AIBN), benzofenon, sodyum (Aldrich), dimetilsülfoksit (DMSO), tetrahidrofuran (THF), dimetilformamid (DMF), aseton, etanol, *o*-fosforik asit, % 37'lik hidroklorik asit (Merck).

3.2.1. Susuz THF Hazırlanması

1 L'lik balonjoje içindeki 500 ml ticari THF üzerine 10 g benzofenon eklenip karıştırıldı, ardından 5 g çok ince kesilmiş sodyum parçaları balonun içine konuldu. Sodyum ilavesiyle çözücünün renginin yeşil ile mavi arası olduğu görüldü. Daha sonra balonun ağzı kapatılıp karışım, karanlıkta 1 gece oda sıcaklığında bekletildi. Sürenin sonunda karışımın renginin oluşan benzofenon radikal anyonu nedeniyle mor olduğu gözlemlendi. THF'in kuruduğunun göstergesi olan bu anyonun bulunduğu karışım distillenerek susuz THF elde edildi (Furniss ve diğ., 1989; Laferrie`re ve diğ., 2004).

3.3. UYGULANAN YÖNTEMLER

3.3.1. Fenolik Bileşiklerin Analizi için HPLC Yönteminin Geliştirilmesi

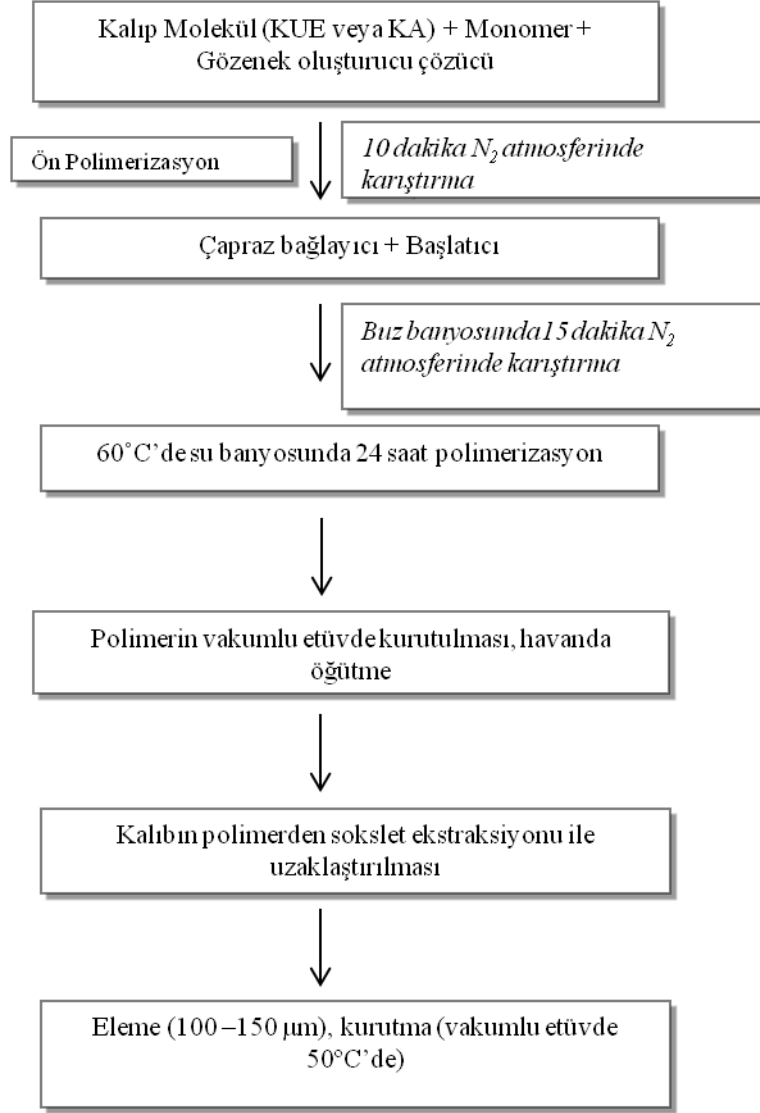
Fenolik bileşiklerin analizi için Metanol (A) ve % 0.2 *o*-H₃PO₄ içeren bidistile su (B)'dan oluşan ikili hareketli fazın kullanıldığı iki farklı gradient elüsyon yöntemi geliştirildi.

1. Yöntem
 - 3 dakika % 20 (A) , eğim (2,0)
 - 3-5 dakika % 35 (A) , eğim (2,0)
 - 5-16 dakika % 80 (A) , eğim (2,0)
 - 16-22 dakika % 100 (A), eğim (2,0)
2. Yöntem
 - 5 dakika % 30 (A) , eğim (1,0)
 - 5-25 dakika % 66 (A) , eğim (6,0)
 - 25-35 dakika % 100 (A) , eğim (2,0)

Heri iki yöntemde de akış hızı 1 mL dak⁻¹, dedeksiyon (belirleme) dalga boyları PDA dedektör kullanılarak 280, 290, 320, 360, 520 nm olarak uygulandı.

3.3.2. Moleküler Baskılı Polimer Sentezleri

Moleküler baskılı polimer sentez yöntemlerinden en fazla çalışılan ve kullanım alanı olan yığın polimerlerdir. Hazırlama kolaylığı ve maliyetinin düşük olması sebebiyle tercih edilmektedir. Kuersetin (KUE) ve Kafeik aside (KA) özgü polimerin hazırlanması için farklı monomerler, gözenek oluşturucu çözücüler ve kalıp molekül: monomer: çapraz bağlayıcı mol oranları ile uygun polimerizasyon koşullarında non-kovalent yığın polimerler hazırlandı. Tüm polimerler için baskısız polimerler (kalıp molekül içermeyen, NIP) de hazırlandı. Genel polimer hazırlama şeması Şekil 3.1'de görülmektedir.



Şekil 3.1: Moleküler baskılı polimerlerin genel sentez şeması.

3.3.2.1. Uygun Monomerin Belirlenmesi

KUE-MIP'ler için; AA, MAA ve 4-VP monomerleri ayrı ayrı kullanılarak KUE baskılı ve baskısız polimerler sentezlendi. Örneğin, 1:4:20 oranındaki polimeri sentezlemek için 0,798 mmol KUE, kapaklı şişede 15 mL aseton veya THF içinde çözüldükten sonra üzerine 3,192 mmol monomer ilave edilip ön-polimerizasyon için 10 dakika N_2 altında karıştırıldı. Daha sonra karışımın üzerine çapraz bağlayıcı olarak 15,96 mmol EDMA ve başlatıcı olarak 0,304 mmol AIBN ilave edilip buz banyosuna konularak, 15 dakika azot geçirildi. Bu sürenin sonunda şişenin ağzı kapatılıp $60^\circ C$ 'lik su banyosunda 24 saat bekletilerek polimerizasyon gerçekleştirildi. Aynı koşullarda kalıp molekül kullanılmadan 0:4:20, 0:6:30, 0:8:40, 0:10:50 oranlarında baskısız (boş) polimerler (non-imprinted polymers, NIP) sentezlendi.

Elde edilen polimerler, aseton ile yıkanıp kurutulduktan sonra havanda toz haline getirildi ve metanol:asetik asit (4:1, v/v) karışımıyla (250 mLx2) iki gün (baskılı polimerlerdeki kalıp molekülünü uzaklaştırmak için), daha sonra asiti uzaklaştırmak için metanolla (250 mL x 2) iki gün sokslet sisteminde yıkandı. Polimerlerden kalıp molekül uzaklaştırma basamağına ACN ile yıkama da eklendi ve UV spektrumlarında KUE absorbansı görülmeyinceye kadar ACN ile çalkalamalı su banyosunda yıkamaya devam edildi. Yıkanan polimerler elekten geçirilerek partikül boyutları 100-150 µm aralığında olan kısım vakumlu etüvde 50°C de kurutularak adsorpsiyon denemelerinde kullanıldı.

KA-MIP'ler için; AA, MAA, 1-VI ve 4-VP monomerleri ayrı ayrı kullanılarak KA baskılı ve baskısız polimerler sentezlendi. Örneğin 1:4:16 oranındaki polimeri sentezlemek için 0,4625 mmol kafeik asit, kapaklı şişede 9 mL kuru THF içinde çözüldükten sonra üzerine 1,85 mmol monomer ilave edilip ön-polimerizasyon için 10 dakika karıştırıldı. Daha sonra karışımın üzerine çapraz bağlayıcı olarak 7,4 mmol EDMA ve başlatıcı olarak 0,93 mmol AIBN ilave edilip buz banyosuna konularak, 15 dakika azot geçirildi. Bu sürenin sonunda şişenin ağzı kapatılıp 60°C lik su banyosunda 24 saat bekletilerek polimerizasyon gerçekleştirildi. Aynı koşullarda kalıp molekül kullanılmadan 0:4:12; 0:4:16; 0:4:20; 0:5:30; 0:6:30; 0:8:40 oranlarında baskısız (boş) polimerler (non-imprinted polymers, NIP) sentezlendi.

Elde edilen polimerler, THF ile yıkanıp kurutulduktan sonra havanda toz haline getirildi ve metanol:asetik asit (4:1, v/v) karışımıyla (250 mLx2) iki gün (baskılı polimerlerdeki kalıp molekülünü uzaklaştırmak için), daha sonra asiti uzaklaştırmak için metanolla (250 mL x 2) iki gün sokslet sisteminde yıkandı. Polimerlerden kalıp molekül uzaklaştırma basamağına ACN ile yıkama da eklendi ve UV spektrumlarında KA absorbansı görülmeyinceye kadar ACN ile çalkalamalı su banyosunda yıkamaya devam edildi. Yıkanan polimerler elekten geçirilerek partikül boyutları 100-150 µm aralığında olan kısım vakumlu etüvde 50°C de kurutularak adsorpsiyon denemelerinde kullanıldı.

3.3.2.2. Uygun Gözenek Oluşturucu Çözücünün Belirlenmesi

KUE-MIP'ler için; en uygun monomer olarak 4-VP belirlendikten sonra aseton ve THF porojen çözücüleri kullanılarak 1:4:20 oranındaki polimer sentezlenmiş ve bunlara batch (kesikli temas) adsorpsiyon testi uygulanarak yapılan geri bağla(n)ma denemeleri sonucunda en uygun gözenek oluşturucu çözücü belirlenmiştir.

KA-MIP'ler için; en uygun monomer olarak 4-VP belirlendikten sonra MeOH, ACN ve THF porojen çözümleri kullanılarak 1:4:16 oranındaki polimer sentezlenmiş ve bunlara batch (kesikli temas) adsorpsiyon testi uygulanarak yapılan geri bağla(n)ma denemeleri sonucunda en uygun gözenek oluşturucu çözümlü belirlenmiştir.

3.3.2.3. Uygun Kalıp Molekül: Monomer: Çapraz Bağlayıcı Oranının Belirlenmesi
KUE-MIP'ler için; farklı kalıp molekül:monomer:çapraz bağlayıcı oranları kullanılarak (1:4:20, 1:6:30, 1:8:40, 1:10:50) 4-VP monomeri ve aseton çözümlüsüyle KUE baskılı ve baskısız polimerler sentezlenmiş ve polimer mol oranları ile KUE adsorpsiyonları karşılaştırılmıştır.

KA-MIP'ler için; Farklı kalıp molekül:monomer:çapraz bağlayıcı oranları kullanılarak (1:4:12, 1:4:16, 1:4:20, 1:5:30, 1:6:30, 1:8:40) 4-VP monomeri ve THF çözümlüsüyle KA baskılı ve baskısız polimerler sentezlenmiş ve polimer mol oranları ile KA adsorpsiyonları karşılaştırılmıştır.

3.3.3. Moleküler Baskılı Polimerlerde Kalıp Molekülün Geri Bağla(n)ma Büyüklüklerinin İncelenmesi

3.3.3.1. Geri Bağla(n)maya Zaman Etkisi

Polimerlerin KUE ve KA tutma kapasitesine, çalkalama süresinin etkisini belirlemek için ayrı ayrı süre optimizasyonu yapıldı.

KUE-MIP'ler için; beş ayrı erlene 1:4:20 polimerinden 30'ar mg tartılıp üzerine ACN:DMSO (98:2, v/v) karışımında hazırlanan 40 µM KUE çözümlüsünden 4'er mL ilave edilip 2, 4, 6, 8 ve 24 saat oda sıcaklığında çalkalandı (250 rpm). 1.0/0.45 µm'lik GF/PET (cam/polietilen tereftalat) filtrelerden geçirilerek elde edilen süzüntülerdeki KUE miktarı UV spektrumlarıyla 370 nm dalgaboyundaki absorbanlardan yararlanılarak belirlendi.

KA-MIP'ler için; beş ayrı erlene 1:4:16 polimerinden 30'ar mg tartılıp üzerine ACN'de hazırlanan KUE ile aynı derişimdeki KA çözümlileriyle aynı şekilde yapılan denemeler sonucu elde edilen süzüntülerdeki KA miktarı UV spektrumlarıyla 320 nm dalgaboyundaki absorbanlardan yararlanılarak belirlendi.

3.3.3.2. *Geri Bağla(n)maya Çözücü Etkisi*

KUE-MIP'lerde geri bağla(n)maya çözücü etkisini incelemek için; KUE'nin yıkama işlemiyle MIP'lerden tamamen uzaklaştırılmasından sonra bu polimerlere KUE'nin yeniden bağlanması çalışmaları yapıldı ve bu çalışmalarda çözücü olarak MeOH ve ACN:DMSO (70:30, 90:10, 95:5, 97:3, 98:2, v/v) karışımları kullanıldı. Bunun için 1:4:20 mol oranındaki MIP ve 0:4:20 mol oranındaki NIP'lerden 30'ar mg alınıp üzerlerine farklı çözücülerde hazırlanmış 60 µM KUE çözeltilerinden 4'er ml ilave edilip 6 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda 250 rpm'de bekletilerek batch testi uygulandı. 1.0/0.45 µm'lik GF/PET filtrelerden geçirilerek elde edilen süzüntülerdeki KUE miktarı UV spektrumlarıyla 370 nm dalgaboyundaki absorbanslardan yararlanılarak belirlendi.

KA-MIP'lerde geri bağla(n)maya çözücü etkisini incelemek için; KA'nın yıkama işlemiyle MIP'lerden tamamen uzaklaştırılmasından sonra bu polimerlere KA'nın yeniden bağlanması çalışmaları yapıldı. Geri bağlanma çalışmalarında çözücü olarak metanol, ACN, THF, DMF ve ACN:DMSO (70:30, 90:10, 95:5, 97:3, 98:2, v/v) karışımları kullanıldı. KUE çalışmalarındaki miktarlarda kullanılan polimerler ve farklı çözücülerdeki KA çözeltileriyle aynı süre uygulanan kesikli temas testleri sonucunda süzüntülerdeki KA miktarı UV spektrumlarıyla 320 nm dalga boyundaki absorbanslardan yararlanılarak belirlendi.

3.3.3.3. *Geri Bağla(n)maya Kalıp Molekül Değişimi Etkisi*

KUE-MIP'lerde geri bağla(n)maya KUE değişimi etkisini incelemek için; 1:4:20 mol oranındaki MIP ve 0:4:20 mol oranındaki NIP'lerden 30'ar mg alınıp üzerlerine ACN:DMSO (98:2, v/v) çözücü karışımında hazırlanan 10-50 µM değişim aralığındaki KUE çözeltilerinden 4'er ml ilave edildi. 6 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda 250 rpm'de bekletildikten sonra 1.0/0.45 µm'lik GF/PET filtrelerden geçirilerek elde edilen süzüntülerdeki KUE miktarı UV spektrumlarıyla 370 nm dalgaboyundaki absorbanslardan yararlanılarak belirlendi.

KA-MIP'lerde geri bağla(n)maya KA değişimi etkisini incelemek için; 1:4:16 mol oranındaki MIP ve 0:4:16 mol oranındaki NIP'lerden 30'ar mg alınıp üzerlerine ACN'de hazırlanan 20-10000 µM değişim aralığındaki KA çözeltilerinden 4'er ml ilave

edildi. KUE-MIP çalışmaları ile aynı süre uygulanan kesikli temas testleri sonucunda süzüntülerdeki KA miktarı UV spektrumlarıyla 320 nm dalga boyundaki absorbanlardan yararlanılarak belirlendi.

3.3.4. Moleküler Baskılı Polimerlerin Adsorpsiyon Özelliklerinin Belirlenmesi

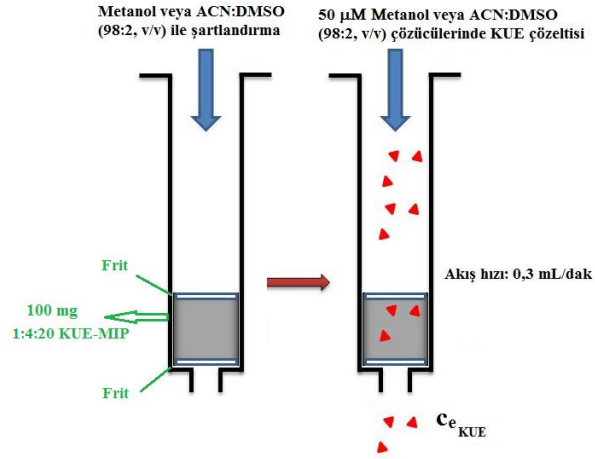
3.3.4.1. *Batch (Kesikli Temas) Adsorpsiyon Testi*

KUE-MIP ve NIP'ler için; farklı derişimlerde KUE kullanılarak sentezlenen polimerlere batch (kesikli temas) adsorpsiyon testi uygulandı. Bunun için 1:4:20 KUE-MIP ve NIP'ten 30'ar mg tartılıp üzerlerine ACN:DMSO (98:2, v/v) karışımında hazırlanan 10-60 µM KUE çözeltilerinden 4'er mL ilave edilip 6 saat oda sıcaklığında çalkalandı (250 rpm). 1.0/0.45 µm'lik cam/PTFE filtrelerden geçirilerek elde edilen süzüntülerdeki KUE miktarı UV spektrumlarıyla 370 nm dalgaboyundaki absorbanlardan yararlanılarak belirlendi.

KA-MIP ve NIP'ler için; farklı derişimlerde KA ve KLA kullanılarak sentezlenen polimerlere batch (kesikli temas) adsorpsiyon testi uygulandı. Bunun için 1:4:16 KA-MIP ve NIP'ten 30'ar mg tartılıp üzerlerine ACN'de hazırlanan 20-100 µM KA ve 10-80 µM KLA çözeltilerinden 4'er mL ilave edilip 6 saat oda sıcaklığında çalkalandı (250 rpm). 1.0/0.45 µm'lik cam/PTFE filtrelerden geçirilerek elde edilen süzüntülerdeki KA ve KLA UV spektrumlarıyla KA için 320 nm ve KLA için 322 nm dalga boyundaki absorbanlardan yararlanılarak belirlendi.

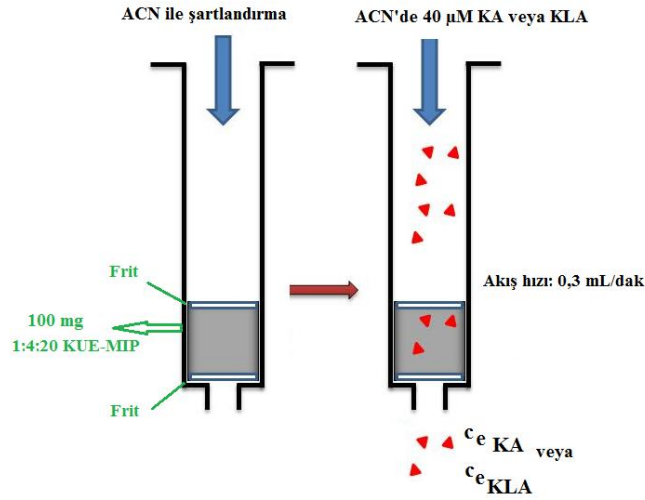
3.3.4.2. *Kolon denemeleri*

1:4:20 KUE-MIP ile kolon denemeleri iki farklı çözücü ortamında {Metanol ve ACN:DMSO (98:2, v/v)} yapıldı. 3 mL'lik boş SPE (Solid-phase extraction, solid-faz ekstraksiyonu) kartuşu içine 100 mg polimer konulup öncelikle kartuş içerisinden şartlandırmak için Metanol veya ACN:DMSO (98:2, v/v) karışımı geçirildi. Daha sonra SPE sistemi kullanılarak 50 µM KUE çözeltisi yaklaşık 0,3 mL/dakika akış hızıyla kolondan geçirildi (Şekil 3.2). Elüatlarda UV spektrumlarıyla KUE miktarı tayin edildi. Kartuşa KUE'yi yükleme işlemine, elüatlarda başlangıç absorbanına ulaşınca yani polimerin KUE ile doygunluğa ulaşmasına kadar devam edildi.



Şekil 3.2: KUE baskılı polimerle kolon denemesinin şematik gösterimi.

1:4:16 KA-MIP ile KA ve KLA için ACN çözücü ortamında ayrı ayrı deneme yapıldı. İki ayrı 3 mL'lik boş SPE (Solid-phase extraction, solid-faz ekstraksiyonu) kartuşlarına içine 100'er mg polimer konulup öncelikle kartuşlardan şartlandırmak için ACN geçirildi. Daha sonra SPE sistemi kullanılarak 40 µM KA ve KLA çözeltileri yaklaşık 0,3 mL/dakika akış hızıyla iki ayrı kolondan geçirildi. Elüatlarda UV spektrumlarıyla KA ve KLA miktarları tayin edildi. Kartuşa KA ve KLA'yı yükleme işlemine, elüatlarda başlangıç absorbansına ulaşmaya yani polimerin KA ve KLA ile doygunluğa ulaşmasına kadar devam edildi.



Şekil 3.3: KA baskılı polimerle kolon denemesinin şematik gösterimi.

3.3.4.3. Seçimlilik Denemeleri

1:4:20 mol oranındaki KUE-MIP ve 0:4:20 mol oranındaki NIP için fenolik bileşiklerin seçimlilik denemeleri, KUE gibi flavonoidlerin flavanol sınıfından olan RT, flavanol sınıfından KAT, fenolik asitlerin hidroksisinnamik asit sınıfından KA ve hidroksibenzoik asit sınıfından VA ile gerçekleştirilmiştir.

Bunun için, MIP ve NIP'lerden ayrı ayrı erlenlere 30'ar mg tartılıp üzerlerine 4'er mL 40 µM fenolik bileşik çözeltilerinden ilave edilip 250 rpm'de 6 saat çalkayıcıda oda sıcaklığında çalkalanmıştır. Süzüntülerdeki fenolik bileşikler UV spektrumları alınarak maksimum absorplama yaptıkları dalgaboyunda (λ_{maks}) analizlenmiştir.

1:4:16 mol oranındaki KA-MIP ve 0:4:16 mol oranındaki NIP için fenolik bileşiklerin seçimlilik denemeleri, KA gibi fenolik asitlerin hidroksisinnamik asit sınıfından olan FA, RA, KLA, SA ve p-KUA, hidroksibenzoik asit sınıfından olan GA, 4-HBA, 3,4-diHBA ve VA ve flavonoidlerin flavanol sınıfından olan KAT ile gerçekleştirilmiştir.

Bunun için, MIP ve NIP'lerden ayrı ayrı erlenlere 30'ar mg tartılıp üzerlerine 4'er mL 80 µM fenolik bileşik çözeltilerinden ilave edilip 250 rpm'de 6 saat çalkayıcıda oda sıcaklığında çalkalanmıştır. Supernatantlardaki fenolik bileşikler UV spektrumları alınarak maksimum absorplama yaptıkları dalgaboyunda (λ_{maks}) analizlenmiştir.

3.3.5. Moleküler Baskılı Polimerlerin Yapılarının İncelenmesi

En uygun polimerler olarak belirlenen 1:4:20 KUE-MIP ve 1:4:16 KA-MIP ile bunların NIP'lerinin yapısal karakterizasyonu FTIR-ATR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy- Attenuated Total Reflectance, Fourier Dönüşümlü İnfrared Spektroskopisi-Zayıflatılmış Toplam Yansıma) analizi ile yapılmıştır.

3.3.6. Uygun Polimerlerin Morfolojilerinin İncelenmesi

En uygun polimerler olarak belirlenen 1:4:20 KUE-MIP ve 1:4:16 KA-MIP ile bunların NIP'lerinin morfolojileri SEM (Scanning Electron Microscope, Taramalı Elektron Mikroskobu) kullanılarak incelenmiştir. Örnekler vakum ortamında altın ile kaplandıktan sonra SEM analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.3.7. Sentetik Karışımlarla Moleküler Baskılı Katı-Faz Ekstraksiyonu Uygulamaları

3.3.7.1. Gallik asit, Kafeik asit, Katesin, Rutin ve Kuersetin İçeren Sentetik Karışım için KUE-MISPE Uygulaması

SPE kolonun Hazırlanması

En uygun polimer olduğuna karar verilen kuersetin baskılı 1:4:20 mol oranındaki polimerden bir beher içerisinde tartılan 50 mg, ACN ile karıştırılarak alt kısmına frit yerleştirilmiş olan 1 mL'lik boş bir SPE polipropilen kartuşa ıslak doldurma yöntemiyle dolduruldu. Başka bir PTFE frit de kartuşun üst kısmına yerleştirildi. Kartuştaki polimer ACN ile şartlandırıldı.

Sentetik Karışım Çözeltilisinin Hazırlanması

Hidroksibenzoik asit sınıfından gallik asit, hidroksisinnamik asit sınıfından kafeik asit, flavonoidlerin flavanol sınıfından katesin 10^{-2} M ve flavonoidlerin flavonol sınıfından rutin $2,7 \times 10^{-3}$ M ve kuersetin 5×10^{-3} M olacak şekilde stok çözeltiler ACN:DMSO (98:2, v/v) karışım çözücüsü ile hazırlandı. Herbirinin derişimi 2×10^{-4} M olacak şekilde bu çözeltilerden uygun miktarlar alınarak istenen hacme ACN ile tamamlandı. SPE kolona yüklemeyden önce geliştirilen gradient elüsyon yöntemlerinden biricisiyle kromatogramı alındı. Karışım çözeltilisinin kromatogramında elde edilen pikler düzgün olmadığından MISPE uygulamasında tüm örnekler, enjeksiyon öncesi 1:1 oranında suyla seyreltildi.

MISPE Uygulaması

- Yükleme (akış hızı: 0,3 mL dak⁻¹)
10 mL ACN ile şartlandırılan 1:4:20 mol oranındaki KUE-MIP'e, hazırlanan karışım çözeltisinden polimer doygunluğa ulaşana kadar 0,5 mL'lik porsiyonlar halinde toplam 2,5 mL yüklendi.
- Yıkama (akış hızı: 1 mL dak⁻¹) (Yıkama adımlarında çözücüler kartuştan, yükleme adımına göre daha hızlı geçirildi.) Polimerde kalıp molekül dışında tutunan diğer bileşenlerin tutulması özgül olmadığından yıkama basamağı bu maddeleri uzaklaştırmak amacıyla uygulanır.
Yıkama 1: 0,5 mL ACN
Yıkama 2: 1 mL H₂O
Yıkama 3: 2 mL H₂O
Yıkama 4: 1 mL ACN:H₂O (20:80, v/v)
Yıkama 5: 2 mL ACN:H₂O (20:80, v/v)
- Elüsyon (akış hızı: 0,5 mL dak⁻¹)
MeOH:HAc (4:1, v/v) ile 1'er mL'lik porsiyonlar halinde toplam 4 mL kullanılarak yapıldı. Kromatogramdan geri kazanılan KUE miktarı hesaplandı.

3.3.7.2. Floridzin, Mirisetin ve Kuersetin İçeren Sentetik Karışım için KUE-MISPE Uygulaması

Sentetik Karışım Çözeltisinin Hazırlanması

Dihidrokalikon sınıfından floridzinden 10⁻² M ve kuersetin gibi flavonol sınıfından olan mirisetin ve kuersetinden 5x10⁻³ M olacak şekilde stok çözeltiler ACN:DMSO (98:2, v/v) karışım çözücüsü ile hazırlandı. Herbirinin derişimi 2x10⁻⁴ M olacak şekilde bu çözeltilerden uygun miktarlar alınarak istenen hacme ACN ile tamamlandı. SPE kolona yüklemmeden önce geliştirilen gradient elüsyon yöntemlerinden biricisiyle kromatogramı alındı. Karışım çözeltisinin kromatogramında elde edilen pikler düzgün olmadığından MISPE uygulamasında tüm örnekler, enjeksiyon öncesi 1:1 oranında suyla seyreltildi.

MISPE Uygulaması

- Yükleme (akış hızı: 0,3 mL dak⁻¹)

10 mL ACN ile şartlandırılan 1:4:20 mol oranında 50 mg KUE-MIP'e, hazırlanan karışım çözeltisinden polimer doygunluğa ulaşana kadar 0,5 mL'lik porsiyonlar halinde toplam 1,5 mL yüklendi.

➤ Yıkama (akış hızı: 1 mL dak⁻¹)

Yıkama 1: 0,5 mL ACN

Yıkama 2: 4 mL H₂O

Yıkama 3: 2 mL H₂O

Yıkama 4: 2 mL ACN:H₂O (20:80, v/v)

Yıkama 5: 3 mL ACN: H₂O (20:80, v/v)

➤ Elüsyon (0,5 mL dak⁻¹)

MeOH:HAc (4:1, v/v) ile 1'er mL'lik porsiyonlar halinde toplam 4 mL kullanılarak yapıldı. Kromatogramdan geri kazanılan KUE miktarı hesaplandı.

3.3.7.3. 4-Hidroksi Benzoik Asit, Vanilik Asit, Kafeik Asit, p-Kumarik Asit ve Ferulik Asit İçeren Sentetik Karışım için KA-MISPE Uygulaması

SPE kolonun Hazırlanması

En uygun polimer olduğuna karar verilen KA baskılı 1:4:16 mol oranındaki polimerden bir beher içerisinde tartılan 50 mg, ACN ile karıştırılarak alt kısmına frit yerleştirilmiş olan 1 mL'lik boş bir SPE polipropilen kartuşa ıslak doldurma yöntemiyle dolduruldu. Başka bir PTFE frit de kartuşun üst kısmına yerleştirildi. Kartuştaki polimer ACN ile şartlandırıldı.

Sentetik Karışım Çözeltisinin Hazırlanması

Hidroksibenzoik asit sınıfından 4-HBA ve VA, hidroksisinnamik asit sınıfından KA, FA ve p-KUA 10⁻² M olacak şekilde stok çözeltiler ACN çözücüsü ile hazırlandı. Bu stok çözeltiler kullanılarak herbirinin derişimi 3x10⁻⁴ M olacak şekilde karışım çözeltisi hazırlandı ve SPE kolona yüklemeye önce kromatogramı geliştirilen gradient elüsyon yöntemlerinden ikincisiyle alındı. Karışım çözeltisinin kromatogramında elde edilen pikler düzgün olmadığından MISPE uygulamasında tüm örnekler, enjeksiyon öncesi 1:1 oranında suyla seyreltildi.

MISPE Uygulaması

➤ Yükleme (akış hızı: 0,3 mL dak⁻¹)

10 mL ACN ile şartlandırılan 1:4:16 mol oranında KA-MIP'e, hazırlanan karışım çözeltisinden polimer doygunluğa ulaşana kadar 0,5 mL'lik porsiyonlar halinde toplam 1,5 mL yüklendi.

- Yıkama (akış hızı: 1 mL dak⁻¹)

Yıkama 1: 2,5 mL ACN

Yıkama 2: 0,5 mL ACN

- Elüsyon (akış hızı: 0,5 mL dak⁻¹)

MeOH: HAc (4:1, v/v) ile 0,5'er mL'lik porsiyonlar halinde toplam 2 mL kullanılarak yıkandı. Kromatogramdan geri kazanılan KA miktarı hesaplandı.

3.3.8. Doğal Örneklerle Moleküler Baskılı Katı-Faz Ekstraksiyonu Uygulamaları

Doğal örnek olarak ısırgan otu, kırmızı soğan kabuğu, siyah çay ve yeşil kahve çekirdeği kullanıldı. MISPE uygulamalarından önce doğal örnekler ekstraksiyon ve bazıları da ayrıca hidroliz işlemine tabi tutuldu.

- Isırgan Otu, Kırmızı Soğan Kabuğu, Siyah Çay ve Yeşil Kahve Çekirdeği Ekstraktlarının Hazırlanması

Hava ortamında kurutulmuş ısırgan otu örneğinden 9 g, kırmızı soğan kabuğu örneğinden 18 g, siyah çay örneğinden 7,5 gram tartıldı. Örnekler, % 70 MeOH'ün 50 mL'si ile 60 dakika, ikinci bir 30 mL'si ile 45 dakika ve 20 mL'si ile 15 dakika ultrasonik banyoda ağızları kapalı cam erlenler içinde üç kademede ekstrakte edildi. Bu üç ekstrakt bir araya getirilerek son hacim 100 mL'ye tamamlandı. Tüm ekstraktlar önce süzgeç kağıdından daha sonra GF/PTFE (Glass fiber/polietilen tereftalat) 1,0 / 0,45 µm'lik enjektör uçlu mikro filtreden geçirildi ve analiz süresine kadar -20 °C'de saklandı.

Öğütülmüş yeşil kahve çekirdeğinden 1,6 g tartıldı ve %70 MeOH'ün 10 mL'si ile 60 dakika, ikinci bir 10 mL'si ile 45 dakika ve 5 mL'si ile 15 dakika ultrasonik banyoda ağızları kapalı cam erlen içinde üç kademede ekstrakte edildi. Bu üç ekstrakt bir araya getirilerek son hacim 25 mL'ye tamamlandı. Tüm ekstraktlar önce süzgeç kağıdından daha sonra GF/PTFE 1,0 / 0,45 µm'lik enjektör uçlu mikro filtreden geçirildi ve analiz süresine kadar -20 °C'de saklandı.

▪ Isırgan Otu, Kırmızı Soğan Kabuğu ve Siyah Çay Ekstraktlarının Hidrolizi

% 70 metanollü siyah çay, ısırgan otu ve kırmızı soğan kabuğu ekstraktları, son derişim % 50 metanol ve 1,2 M HCl olacak şekilde ayarlanarak 80°C'de 2 saat hidroliz edildi. (Hertog ve diğ., 1992a; Hertog ve diğ., 1992b).

▪ Ekstrakt ve Hidrolizatların MISPE Uygulamasına Uygun Hale Getirilmesi

Ekstraktlar metanol ve su, ekstrakt hidrolizatları ise metanol, su ve asit içerdiğinden polimerin fenolik bileşikleri adsorplayamamasına yol açacağı için evaporatörde 45°C'de kuruluğa kadar buharlaştırılıp kalıntı, belirli hacimde ACN:DMSO (98:2, v/v) karışımında çözüldü.

Bunun için;

- Kırmızı soğan kabuğu ekstraktının 45 mL'si evaporatörde kuruluğa kadar buharlaştırılıp 25 mL ACN:DMSO (98:2, v/v)'de,
- Yeşil kahve çekirdeği ekstraktının 20 mL'si evaporatörde kuruluğa kadar buharlaştırılıp 7 mL ACN:DMSO (98:2, v/v)'de
- Isırgan ekstraktı hidrolizatının 70 mL'si evaporatörde kuruluğa kadar buharlaştırılıp 8 mL ACN:DMSO (98:2, v/v)'de,
- Kırmızı soğan kabuğu ekstraktı hidrolizatının 20 mL'si evaporatörde kuruluğa kadar buharlaştırılıp 8 mL ACN:DMSO (98:2, v/v)
- Siyah çay ekstraktı hidrolizati 70 mL'si evaporatörde kuruluğa kadar buharlaştırılıp 10 mL ACN:DMSO (98:2, v/v)'de çözüldü.

3.3.8.1. Isırgan Otu Ekstraktı Hidrolizati için KUE-MISPE Uygulaması

ACN varlığında kromatogramlarda elde edilen pikler düzgün olmadığından MISPE uygulamasının her basamağında örnekler enjeksiyon öncesi 1:1 oranında suyla seyreltildi. Kromatografik analiz, geliştirilen gradient elüson yöntemlerinin birincisiyle gerçekleştirildi.

➤ **Yükleme (0,3 mL dak⁻¹ akış hızıyla)**

Buharlaştırıldıktan sonra ACN:DMSO (98:2, v/v)'de çözülmüş ısırgan otu ekstrakt hidrolizatından 2 mL alınıp ACN ile 1:1 oranında seyreltildi (V=4 mL). Susuz Na₂SO₄ ile nemi giderilen hidrolizattan 2 mL alınıp 10 mL ACN ile şartlandırılmış 100 mg 1:4:20 KUE-MIP içeren 3 mL'lik SPE kartaşa yüklendi. Kartuştan çıkan çözelti, yükleme sonrası olarak HPLC'ye enjekte edildi ve yükleme öncesi ve sonrası kromatogramlar karşılaştırıldı.

- Yıkama (1,0 mL dak⁻¹ akış hızıyla)
Polimerde kuersetin dışında tutunan diğer bileşenlerin tutunması spesifik olmadığından dolayı bu maddeleri uygun çözücü sistemleriyle kartuştan yıkayarak çıkarmak hedeflendi.
Yıkama 1: 0,5 mL ACN
Yıkama 2: 12 mL bidistile H₂O
Yıkama 3: 10 mL ACN:H₂O karışımı (20:80, v/v)
Yıkama 4: 10 mL ACN:H₂O karışımı (40:60, v/v)
- Elüsyon (0,5 mL/dak akış hızıyla)
Elüsyon 1: 2 mL MeOH:HAc (4:1, v/v)
Elüsyon 2: 3 mL MeOH:HAc (4:1, v/v)
Kromatogramdan geri kazanılan KUE miktarı hesaplandı.

3.3.8.2. *Kırmızı Soğan Kabuğu Ekstraktı için KUE-MISPE Uygulaması*

- Yükleme (akış hızı: 0,3 mL dak⁻¹)
Buharlaştırıldıktan sonra ACN:DMSO (98:2, v/v)'de çözülmüş kırmızı soğan kabuğu ekstraktından 0,5 mL alınıp ACN ile 2,8 mL'ye seyreltildi. Susuz Na₂SO₄ ile nemi giderilen ekstraktan 1,3 mL alınıp 10 mL ACN ile şartlandırılmış 100 mg 1:4:20 KUE-MIP içeren 3 mL'lik SPE kartuşa yüklendi.
- Yıkama (akış hızı: 1,0 mL dak⁻¹)
Yıkama 1: 5 mL ACN
Yıkama 2: 4 mL H₂O
Yıkama 3: 4 mL H₂O
Yıkama 4: 6 mL ACN:H₂O (50:50, v/v)
Yıkama 5: 4 mL ACN:H₂O (50:50, v/v)
Yıkama 6: 2 mL ACN:H₂O (50:50, v/v)
- Elüsyon (akış hızı: 0,5 mL dak⁻¹)
Elüsyon 1: 6 mL MeOH:CH₃COOH (4:1, v/v)
Elüsyon 2: 3 mL MeOH:CH₃COOH (4:1, v/v)
Kromatogramdan geri kazanılan KUE ve KAM miktarları hesaplandı.

3.3.8.3. *Kırmızı Soğan Kabuğu Ekstraktı Hidrolizatı için KUE-MISPE Uygulaması*

- Yükleme (akış hızı: 0,3 mL dak⁻¹)

Buharlaştırıldıktan sonra ACN:DMSO (98:2, v/v)'de çözülmüş kırmızı soğan kabuğu ekstrakt hidrolizatından 0,5 mL alınıp ACN ile 1:10 oranında seyreltildi (V = 5 mL). Susuz Na₂SO₄ ile nemi giderilen hidrolizattan 1,3 mL alınıp 10 mL ACN ile şartlandırılmış 100 mg 1:4:20 KUE-MIP içeren 3 mL'lik SPE kartuşa yüklendi.

- Yıkama (akış hızı: 1,0 mL dak⁻¹)
 - Yıkama 1: 6 mL ACN
 - Yıkama 2: 8 mL H₂O
 - Yıkama 3: 6 mL ACN:H₂O karışımı (20:80, v/v)
 - Yıkama 4: 4 mL ACN:H₂O (40:60, v/v)
 - Yıkama 5: 1 mL ACN:H₂O (50:50, v/v)
 - Yıkama 6: 4 mL ACN ile yapıldı
- Elüsyon (akış hızı: 0,5 mL dak⁻¹)
 - Elüsyon işlemi 2 basamakta toplam 8 mL MeOH: HAc (4:1, v/v) karışımıyla yapıldı. Kromatogramdan geri kazanılan KUE ve KAM miktarları hesaplandı.

3.3.8.4. *Siyah Çay Ekstraktı Hidrolizatı için KUE-MISPE Uygulaması*

- Yükleme (akış hızı: 0,3 mL dak⁻¹)
 - Buharlaştırıldıktan sonra ACN:DMSO (98:2, v/v)'de çözülmüş siyah çay ekstrakt hidrolizatından 0,5 mL alınıp ACN ile 4,0 mL'ye seyreltildi. Susuz Na₂SO₄ ile nemi giderilen hidrolizattan 1,3 mL alınıp 10 mL ACN ile şartlandırılmış 100 mg 1:4:20 KUE-MIP içeren 3 mL'lik SPE kartuşa yüklendi.
 - Yıkama (akış hızı: 1,0 mL dak⁻¹)
 - Yıkama 1: 4 mL ACN
 - Yıkama 2: 4 mL H₂O
 - Yıkama 3: 8 mL ACN:H₂O (40:60, v/v)
 - Elüsyon (akış hızı: 0,5 mL dak⁻¹)
 - Elüsyon 1: 8 mL MeOH:HAc (4:1, v/v)
 - Elüsyon 2: 3 mL MeOH:HAc (4:1, v/v)
 - Elüsyon 3: 2 mL MeOH:HAc (4:1, v/v)
- Kromatogramdan geri kazanılan KUE ve KAM miktarları hesaplandı.

3.3.8.5. *Yeşil kahve Çekirdeği Ekstraktı için KUE- MISPE Uygulaması*

- Yükleme (akış hızı: 0,3 mL dak⁻¹)

Buharlaştırıldıktan sonra ACN:DMSO (98:2, v/v)'de çözülmüş yeşil kahve çekirdeği ekstraktından 1,0 mL alınıp ACN ile 8,0 mL'ye seyreltildi. Susuz Na₂SO₄ ile nemi giderilen hidrolizattan 6,0 mL alınıp 10 mL ACN ile şartlandırılmış 100 mg 1:4:20 KUE-MIP içeren 3 mL'lik SPE kartuşa yüklendi.

➤ Yıkama (akış hızı: 1,0 mL dak⁻¹)

Yıkama 1: 0,5 mL ACN

Yıkama 2: 30 mL H₂O

Yıkama 3: 10 mL ACN:H₂O (30:70, v/v)

Yıkama 4: 30 mL ACN:H₂O (20:80, v/v)

Yıkama 5: 20 mL ACN:H₂O (10:90, v/v)

Yıkama 6: 10 mL ACN:H₂O (40:60, v/v)

Yıkama 7: 30 mL H₂O

Yıkama 8: 20 mL H₂O

➤ Elüsyon (akış hızı: 0,5 mL dak⁻¹)

Elüsyon 1: 3 mL MeOH:HAc (4:1, v/v)

Elüsyon 2: 4 mL MeOH:HAc (4:1, v/v)

Kromatogramdan geri kazanılan KUE miktarı hesaplandı.

3.3.8.6. Yeşil Kahve Çekirdeği Ekstraktı için KA- MISPE Uygulaması

Yeşil kahve çekirdeği ekstraktından KA'nın kuinik asit esteri olan KLA'nın KA-MIP kullanılarak saflaştırılması amaçlandı. ACN varlığında kromatogramlarda elde edilen pikler düzgün olmadığından MISPE uygulamasının her basamağında örnekler enjeksiyon öncesi 1:1 oranında suyla seyreltildi. Kromatografik analiz, geliştirilen gradient elüsyon yöntemlerinin ikincisiyle gerçekleştirildi.

➤ Yükleme (akış hızı: 0,3 mL dak⁻¹)

Buharlaştırıldıktan sonra ACN:DMSO (98:2, v/v)'de çözülmüş yeşil kahve çekirdeği ekstraktından 1 mL alınıp ACN ile 4 mL'ye seyreltildi. Susuz Na₂SO₄ ile nemi giderilen ekstraktan 3,5 mL alınıp 10 mL ACN ile şartlandırılmış 100 mg 1:4:16 KA-MIP içeren 3 mL'lik SPE kartuşa yüklendi.

➤ Yıkama (akış hızı: 1,0 mL dak⁻¹)

Yıkama 1: 12 mL ACN

Yıkama 2: 8 mL ACN

➤ Elüsyon (akış hızı: 0,5 mL dak⁻¹)

Elüsyon 1: 3 mL MeOH:CH₃COOH (4:1, v/v)

Elüsyon 2: 2 mL MeOH:CH₃COOH (4:1, v/v)

Kromatogramdan geri kazanılan KLA miktarı hesaplandı.

4. BULGULAR

4.1. FENOLİK BİLEŞİKLERİN HPLC KALİBRASYONLARININ SONUÇLARI

Tablo 4.1’de fenolik bileşiklerin metanol (A) ve % 0.2 *o*-H₃PO₄ içeren bidistile su (B)’dan oluşan ikili hareketli fazın kullanıldığı birinci gradient elüsyon metoduyla elde edilen HPLC kalibrasyon denklemleri görülmektedir. Tabloda, y: pik alanı, c: Molar derişim ve r: korelasyon katsayısını ifade etmektedir.

Tablo 4.1: Çeşitli fenolik bileşiklerin HPLC verileri.

| Antioksidan | Doğru Denklemi | (R ²) | Doğrusal Aralık (mol L ⁻¹) |
|-----------------|------------------------------------|-------------------|---|
| Gallik Asit | $y = 9,6 \times 10^9 c - 10895$ | 0,9992 | $1,00 \times 10^{-5} - 2,00 \times 10^{-4}$ |
| Kateşin | $y = 3,8 \times 10^9 c - 951$ | 0,9998 | $1,00 \times 10^{-5} - 2,00 \times 10^{-4}$ |
| Klorojenik Asit | $y = 1,0 \times 10^{10} c + 24953$ | 0,9994 | $1,00 \times 10^{-5} - 2,00 \times 10^{-4}$ |
| Epikateşin | $y = 3,7 \times 10^9 c - 3529$ | 0,9997 | $1,00 \times 10^{-5} - 2,00 \times 10^{-4}$ |
| Kafeik Asit | $y = 1,1 \times 10^{10} c - 2201$ | 0,9999 | $1,0 \times 10^{-5} - 2,00 \times 10^{-4}$ |
| Floridzin | $y = 1,7 \times 10^{10} c + 39641$ | 0,9996 | $1,00 \times 10^{-5} - 2,00 \times 10^{-4}$ |
| Rutin | $y = 8,5 \times 10^9 c - 16701$ | 0,9993 | $1,00 \times 10^{-5} - 2,00 \times 10^{-4}$ |
| Mirisetin | $y = 5,93 \times 10^9 c - 42007$ | 0,9996 | $4,00 \times 10^{-5} - 5,00 \times 10^{-4}$ |
| Kamferol | $y = 7,23 \times 10^9 c - 36137$ | 0,9996 | $4,00 \times 10^{-5} - 5,00 \times 10^{-4}$ |
| Kuersetin | $y = 7,9 \times 10^9 c - 17832$ | 0,9996 | $1,00 \times 10^{-5} - 2,00 \times 10^{-4}$ |

4.2. MIP SENTEZLERİ İÇİN OPTİMİZASYON ÇALIŞMALARI

4.2.1. Uygun Monomerin Belirlenmesi

Kuersetin baskılı polimer sentezinde en uygun monomeri belirleyebilmek için AA, MAA ve 4-VP'den oluşan üç farklı monomer kullanılarak aseton ortamında 1:4:20 kalıp molekül:monomer:çapraz bağlayıcı mol oranında baskılı ve baskısız polimerler sentezlendi. Bu polimerlerle 50 µM KUE kullanılarak yapılan adsorpsiyon denemeleri ile polimerlerin baskılama faktörleri hesaplandı (denklem 2.1). Sonuçlar tablo 4.2'de görülmektedir. En yüksek KUE adsorpsiyonu ve baskılama faktörü, 4-VP'nin monomer olarak kullanılmasıyla sentezlenen polimerle olduğu görülmüştür. Bu sebeple KUE baskılı polimer sentezlerinde en uygun monomerin 4-VP olduğu sonucuna varılmıştır. Bu monomerin uygun olduğu diğer bazı KUE-MIP çalışmalarında da belirtilmiştir. (Weiss ve diğ., 2002; Theodoridis ve diğ., 2006; Pakade ve diğ., 2012; O'Mahony ve diğ., 2006; López ve diğ., 2012)

Tablo 4.2: Farklı monomerlerle sentezlenen 1:4:20 oranındaki KUE-MIP ve NIP'lerin karşılaştırılması.

| Monomer | Polimer | Adsorplanan KUE Miktarı (µg g ⁻¹) | Baskılama Faktörü |
|---------|------------|---|-------------------|
| MAA | 1:4:20-MIP | 0,021 | 0,96 |
| | 0:4:20-NIP | 0,023 | |
| AA | 1:4:20-MIP | 432 | 1,43 |
| | 0:4:20-NIP | 302 | |
| 4-VP | 1:4:20-MIP | 794 | 2,83 |
| | 0:4:20-NIP | 281 | |

Kafeik asit baskılı polimer sentezinde en uygun monomeri belirleyebilmek için AA, 1-VI, MAA ve 4-VP'den oluşan dört farklı monomer kullanılarak aseton ortamında 1:4:16 kalıp molekül: monomer: çapraz bağlayıcı mol oranında baskılı ve baskısız polimerler sentezlendi. Bu polimerlerle 60 µM KA kullanılarak yapılan adsorpsiyon denemeleri ile polimerlerin baskılama faktörleri hesaplandı (denklem 2.1). Sonuçlar tablo 4.3'de görülmektedir. AA'nın monomer olarak kullanılmasıyla sentezlenen polimerlerde KA adsorpsiyonu gerçekleşmemiş ve 1-VI ve MAA'nın kullanılmasıyla sentezlenen polimerlerde ise KA adsorpsiyonu NIP'lerde MIP'e göre daha fazla olmuştur. Bu durum MIP'te KA'ya ait kalıp oluşmadığının, adsorpsiyonun non-spesifik olarak

gerçekleştiğinin göstergesidir. 4-VP'nin monomer olarak kullanılmasıyla sentezlenen polimerlerle ise MIP ve NIP'te diğer monomerlere kıyasla daha fazla KA adsorplanmış ve MIP'teki adsorpsiyonun NIP'e göre daha fazla olmasından dolayı MIP'te KA'ya ait kalıp oluşumu bu şekilde doğrulanmış ve baskılama faktörü diğerlerinden daha yüksek bulunmuştur. Bu sebeplerden dolayı KA baskılı polimer sentezlerinde en uygun monomerin 4-VP olduğuna karar verilmiştir. Bu monomerin uygun olduğu diğer bazı KA-MIP çalışmalarında da belirtilmiştir. (Li ve diğ., 2013; Michailof ve diğ., 2008; Valero-Navarro ve diğ., 2011)

Tablo 4.3: Farklı monomerlerle sentezlenen 1:4:16 oranındaki KA-MIP ve NIP'lerin karşılaştırılması.

| Monomer | Polimer | Adsorplanan KA Miktarı ($\mu\text{g g}^{-1}$) | Baskılama Faktörü |
|---------|------------|---|-------------------|
| AA | 1:4:16-MIP | 0 | 0 |
| | 0:4:16-NIP | 0 | |
| 1-VI | 1:4:16-MIP | 655 | 0,87 |
| | 0:4:16-NIP | 785 | |
| 4-VP | 1:4:16-MIP | 930 | 2,02 |
| | 0:4:16-NIP | 460 | |
| MAA | 1:4:16-MIP | 45 | 0,94 |
| | 0:4:16-NIP | 48 | |

4.2.2. Uygun Gözenek Oluşturucu Çözücünün Belirlenmesi

Kuersetin baskılı polimer sentezinde en uygun monomer olarak 4-VP belirlendikten sonra aseton ve THF gözenek oluşturucu (porojen) çözümleri kullanılarak 1:4:20 oranındaki polimer sentezlenmiş ve bunlara batch adsorpsiyon testi uygulanarak yapılan geri bağla(n)ma denemelerinin sonuçları tablo 4.4'te verilmiştir. Bu sonuçlara göre asetonun, KUE baskılı polimer sentezi için en uygun gözenek oluşturucu çözümlü olduğuna karar verilmiştir. Asetonun en uygun porojen olduğu diğer bazı KUE-MIP çalışmalarında da belirtilmiştir (Weiss ve diğ., 2002; O'Mahony ve diğ., 2006; Kudrinskaya ve diğ., 2009).

Tablo 4.4: Farklı gözenek oluşturuvcu çözücüler kullanılarak sentezlenen 1:4:20 oranındaki KUE-MIP ve NIP'lerin karşılaştırılması.

| Çözücü | Polimer | Adsorplanan KUE Miktarı ($\mu\text{g g}^{-1}$) | Baskılama Faktörü |
|--------|------------|--|-------------------|
| Aseton | 1:4:20-MIP | 791 | 2,83 |
| | 0:4:20-NIP | 281 | |
| THF | 1:4:20-MIP | 586 | 1,15 |
| | 0:4:20-NIP | 510 | |

Kafeik asit baskılı polimer sentezi için gözenek oluşturuvcu çözücü olarak metanol, ACN ve THF kullanılarak sentezler yapılmış ancak bir tek THF ortamında sentezlenen polimerde adsorpsiyon gerçekleştiği görülmüştür. Metanolün polaritesi yüksek ve kafeik asitle hidrojen bağı yapabilecek –OH grubuna sahip olduğu için KA'nın polimerizasyon sırasında monomerle hidrojen bağı yapma eğilimi azalmakta ve polimerizasyon sırasında KA'ya ait kalıp oluşumu gerçekleşmemektedir. ACN kullanıldığında ise KA'nın ACN'de çözünürlüğünün çok düşük olması nedeniyle çözünmeyi sağlamak için ısıtmak gerekmekte, polimerizasyon sırasında kullanılan KA miktarı fazla olduğu için de KA'nın bir kısmı çözünmeden kalmakta bu da polimerizasyon sırasında KA'ya ait kalıp oluşumunu engellemektedir. Bu nedenle KA baskılı polimer sentezlerinde en uygun gözenek oluşturuvcu çözücünün THF olduğuna karar verilmiştir. Bu çözücüyle hazırlanan polimer için baskılama faktörü, KA-MIP'in adsorpladığı KA miktarı 930, NIP'in ise 460 $\mu\text{g g}^{-1}$ bulunduğu için 2,02 olarak hesaplanmıştır. THF'nin en uygun porojen olduğu diğer bir KA-MIP çalışmasında da belirtilmiştir (Michailof ve diğ., 2008).

4.2.3. Uygun Kalıp Molekül:Monomer:Çapraz Bağlayıcı Mol Oranının Belirlenmesi

Kuersetin baskılı polimer sentezlerinde farklı kalıp molekül:monomer:çapraz bağlayıcı mol oranları kullanılarak (1:4:20, 1:6:30, 1:8:40, 1:10:50) 4-VP monomeri ve aseton çözücüsüyle KUE baskılı ve baskısız polimerler sentezlendi. Tablo 4.5'te polimer mol oranları ile KUE adsorpsiyonları karşılaştırılmıştır. En yüksek baskılama faktörü (2,83) 1:4:20 polimeri ile elde edilmiştir. Bu sebeple en uygun kalıp molekül: monomer: çapraz bağlayıcı mol oranının 1:4:20 olduğu sonucuna varılmıştır. Bundan sonraki çalışmalarda 1:4:20 polimeri kullanılmıştır. Literatürdeki diğer çalışmalarda aynı

monomer, çapraz bağlayıcı ve porojen ile hazırlanan KUE-MIP'ler için en uygun mol oranı 1:8:40 (Weiss ve diğ., 2002; O'Mahony ve diğ., 2006) bulunmuştur.

Tablo 4.5: Farklı molar bileşim oranlarındaki KUE-MIP and NIP'lerin karşılaştırılması.

| Polimer | Adsorplanan KUE Miktarı ($\mu\text{g g}^{-1}$) | Baskılama Faktörü |
|-------------|---|-------------------|
| 1:4:20-MIP | 794 | |
| 0:4:20-NIP | 281 | 2,83 |
| 1:6:30-MIP | 924 | |
| 0:6:30-NIP | 838 | 1,10 |
| 1:8:40-MIP | 729 | |
| 0:8:40-NIP | 327 | 2,22 |
| 1:10:50-MIP | 943 | |
| 0:10:50-NIP | 523 | 1,80 |

Kafeik asit baskılı polimer sentezlerinde farklı kalıp molekül:monomer:çapraz bağlayıcı mol oranları kullanılarak (1:4:12, 1:4:16, 1:4:20, 1:5:30, 1:6:30, 1:8:40) 4-VP monomer ve THF çözücüsüyle KA baskılı ve baskısız polimerler sentezlendi. Tablo 4.6'da polimer mol oranları ile KA adsorpsiyonları karşılaştırılmıştır. En yüksek baskılama faktörü (2,02) 1:4:16 polimeri ile elde edilmiştir. Bu sebeple en uygun kalıp molekül:monomer:çapraz bağlayıcı mol oranının 1:4:16 olduğu sonucuna varılmıştır. Literatürde aynı monomer, çapraz bağlayıcı ve porojen ile hazırlanan KA-MIP'ler için en uygun mol oranı 1:4:12 (Michailof ve diğ., 2008) bulunmuştur.

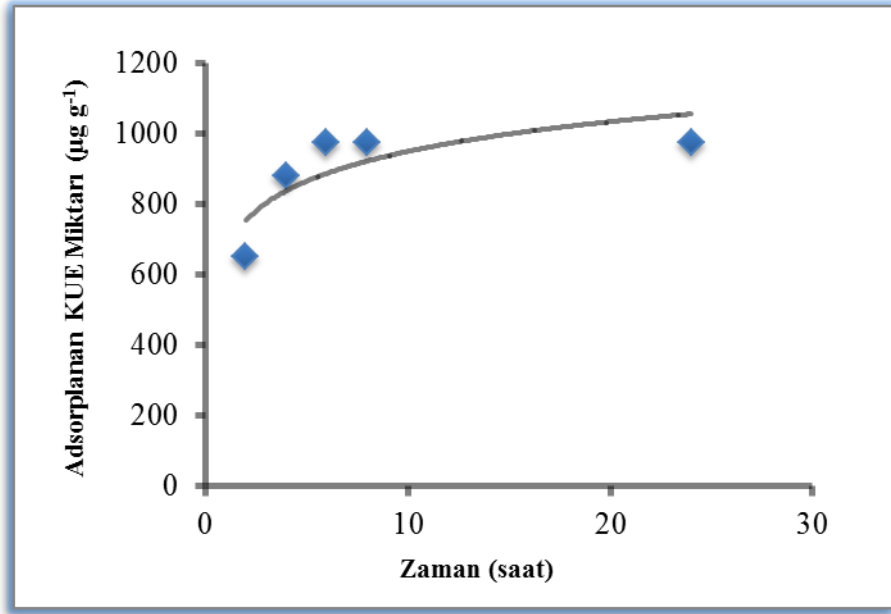
Tablo 4.6: Farklı molar bileşim oranlarındaki KA-MIP and NIP'lerin karşılaştırılması.

| Polimer | Adsorplanan KA Miktarı ($\mu\text{g g}^{-1}$) | Baskılama Faktörü |
|------------|--|-------------------|
| 1:4:12-MIP | 860 | 1,32 |
| 0:4:12-NIP | 650 | |
| 1:4:16-MIP | 930 | 2,02 |
| 0:4:16-NIP | 460 | |
| 1:4:20-MIP | 600 | 1,05 |
| 0:4:20-NIP | 570 | |
| 1:5:30-MIP | 610 | 1,83 |
| 0:5:30-NIP | 340 | |
| 1:6:30-MIP | 510 | 1,50 |
| 0:6:30-NIP | 340 | |
| 1:8:40-MIP | 600 | 1,40 |
| 0:8:40-NIP | 430 | |

4.3. MOLEKÜLER BASKILI POLİMERLERDE KALIP MOLEKÜLÜN GERİ BAĞLA(N)MA BÜYÜKLÜKLERİNİN İNCELENMESİ

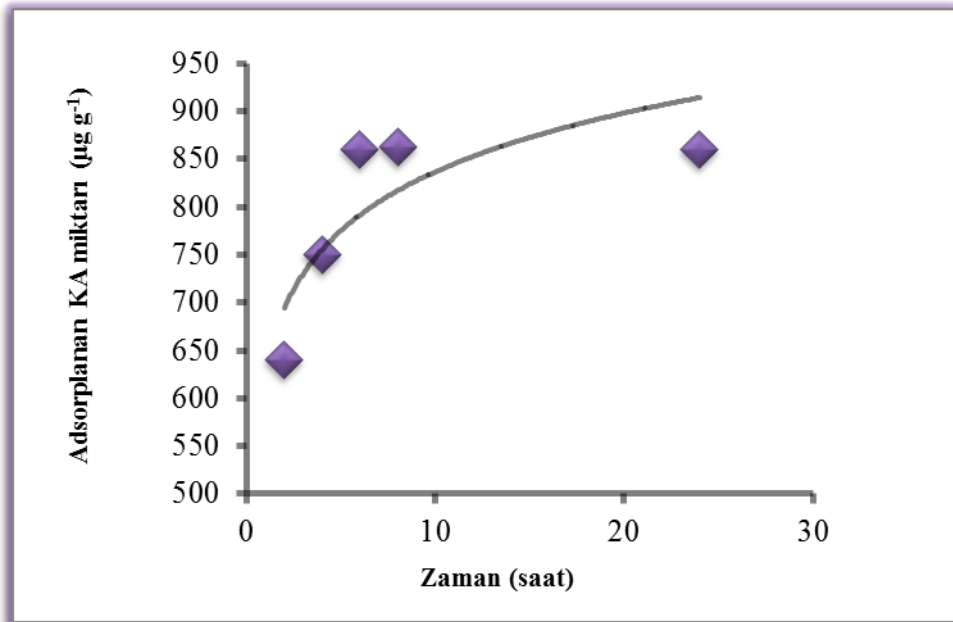
4.3.1. Geri Bağla(n)maya Zaman Etkisi

1:4:20 KUE-MIP polimerinden 5 ayrı erlene 30'ar mg tartılıp üzerine ACN:DMSO (98:2, v/v) karışımında hazırlanan 40 μM KUE çözeltisinden 4'er mL ilave edilerek 2, 4, 6, 8 ve 24 saat oda sıcaklığında çalkalama (250 rpm) sonucu adsorplanan KUE miktarları, süzüntülerin 370 nm dalga boyundaki absorbanlarından hesaplandı. Şekil 4.1'de adsorplanan KUE miktarlarına çalkalama süresinin etkisi görülmektedir.



Şekil 4.1: 1:4:20 KUE-MIP'e ait adsorpsiyon-zaman grafiği.

1:4:16 KA-MIP ve 60 µM KA çözeltisiyle tekrarlanan denemelerde süzüntülerdeki KA miktarı 320 nm dalga boyundaki absorbanslardan yararlanılarak belirlendi. Adsorpsiyon-zaman grafiği Şekil 4.2'de görülmektedir.



Şekil 4.2: 1:4:16 KA-MIP'e ait adsorpsiyon-zaman grafiği.

Her iki şekilden de görüldüğü üzere 6 saat, her iki molekül için de tutulmanın pratikte sabitlenmesi nedeniyle uygun adsorpsiyon süresi olarak belirlenmiştir.

4.3.2. Geri Bağla(n)maya Çözücü Etkisi

Kuersetin çözeltisi için çözücü olarak MeOH ve ACN:DMSO (70:30, 90:10, 95:5, 97:3, 98:2, v/v) karışımları kullanıldı. 40 µM derişimdeki KUE çözeltilerinin MeOH'de hazırlandığı durumda çok az KUE adsorpsiyonu gözlenirken, ACN:DMSO karışımlarından da en yüksek adsorpsiyon ACN:DMSO (98:2, v/v)'de gözlendi (Tablo 4.7). ACN:DMSO'nun 70:30, 90:10, 95:5 oranlarında adsorpsiyon gözlenmedi.

Tablo 4.7: Farklı çözücü ortamlarında KUE adsorpsiyonu.

| Polimer | Çözücü | Adsorplanan KUE Miktarı (µg g ⁻¹) | BaskılamaFaktörü |
|---------|-------------------------|--|------------------|
| MIP | ACN:DMSO (98:2, v/v) | 726 | 2,60 |
| NIP | | 279 | |
| MIP | ACN:DMSO (97:3, v/v) | 523 | 1,51 |
| NIP | | 346 | |
| MIP | MeOH | 145 | 1,45 |
| NIP | | 100 | |

Kafeik asit çözeltisi için çözücü olarak MeOH, ACN, THF, DMF, ACN:H₂O (50:50, v/v) ve ACN:DMSO (70:30, 90:10, 95:5, 97:3, 98:2, v/v) karışımları kullanıldı. 40 µM derişimdeki KA çözeltilerinin ACN ve ACN:DMSO (97:3, 98:2, v/v) karışımlarında hazırlananlar dışında tutulmadığı gözlendi (Tablo 4.8).

Tablo 4.8: Farklı çözücü ortamlarında KA adsorpsiyonu.

| Polimer | Çözücü | Adsorplanan KA Miktarı (µg g ⁻¹) | BaskılamaFaktörü |
|---------|-------------------------|---|------------------|
| MIP | ACN:DMSO (98:2, v/v) | 340 | 3,78 |
| NIP | | 90 | |
| MIP | ACN:DMSO (97:3, v/v) | 450 | 1,41 |
| NIP | | 320 | |
| MIP | ACN | 670 | 2,03 |
| NIP | | 330 | |

ACN:DMSO (98:2, v/v) çözücü karışımında çözülen KA için baskılama faktörü daha yüksek bulunmasına rağmen adsorpsiyon miktarı az olduğu için KA-MISPE

denemelerinde DMSO oranı, seyreltme çözücüsü olarak ACN kullanılarak daha düşük tutulmuştur.

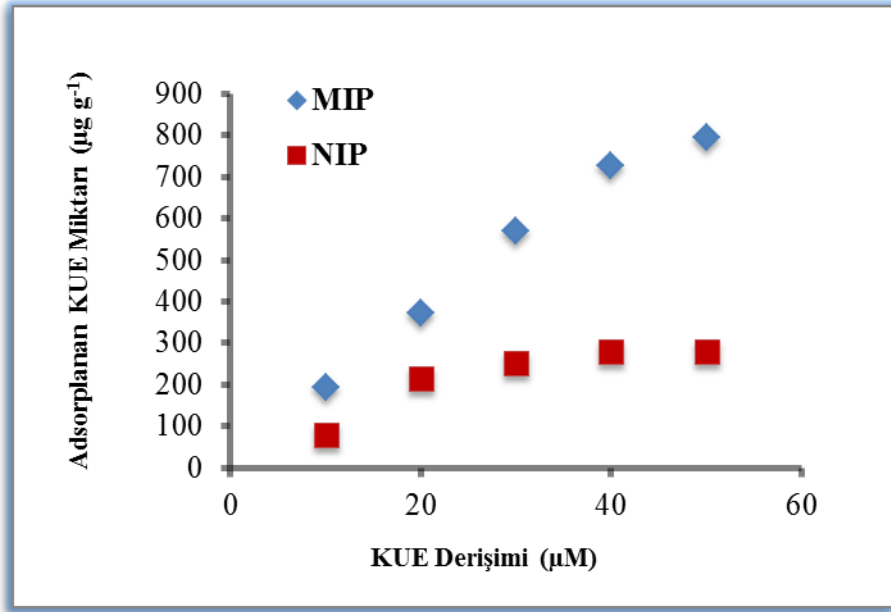
4.3.3. Geri Bağla(n)maya Kalıp Molekül Derişimi Etkisi

KUE miktarının polimerlerin tutma kapasitesine etkisini incelemek amacıyla farklı derişimlerde *KUE* (10-50 μM) kullanılarak sentezlenen polimerlere batch adsorpsiyon testi uygulandı. *KUE*-MIP ve NIP için *KUE*'nin adsorplanan miktarları ve baskılama faktörleri Tablo 4.9 'da görölmektedir.

Tablo 4.9: Farklı derişimlerde *KUE* çözeltilerinin MIP ve NIP'lerde adsorpsiyonu.

| Polimer | <i>KUE</i> Derişimi (μM) | Adsorplanan <i>KUE</i> Miktarı ($\mu\text{g g}^{-1}$) | Baskılama Faktörü |
|---------|---------------------------------------|---|-------------------|
| 1:4:20 | 10 | 194 | 2,48 |
| 0:4:20 | | 78 | |
| 1:4:20 | 20 | 373 | 1,73 |
| 0:4:20 | | 216 | |
| 1:4:20 | 30 | 568 | 2,26 |
| 0:4:20 | | 251 | |
| 1:4:20 | 40 | 726 | 2,60 |
| 0:4:20 | | 279 | |
| 1:4:20 | 50 | 794 | 2,83 |
| 0:4:20 | | 281 | |

Şekil 4.3, *KUE* derişimi ile MIP ve NIP tarafından adsorplanan *KUE* miktarları arasındadır.



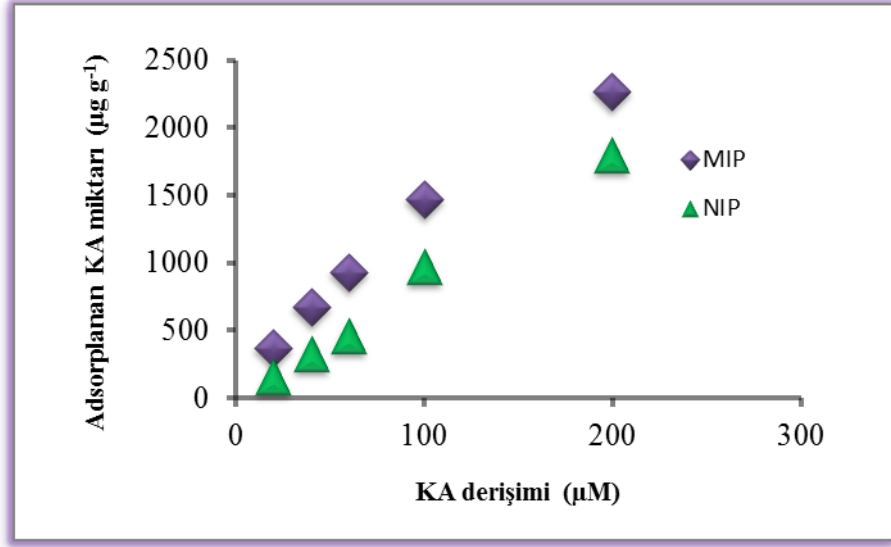
Şekil 4.3: KUE-MIP ve NIP'e ait KUE derişimi-adsorplanan KUE miktarı grafiği.

Düşük derişimlerde, özgül olmayan polimerik adsorpsiyon nedeniyle baskılama faktörü düşükken, yüksek KUE derişimlerinde baskılama faktörü belirgin olarak yükselmektedir.

KA miktarının polimerlerin tutma kapasitesine etkisini incelemek amacıyla farklı derişimlerde KA (20-10000 µM) kullanılarak sentezlenen polimerlere batch adsorpsiyon testi uygulandı. Sonuçlar, Tablo 4.10 ve Şekil 4.4'te görülmektedir. Tablo 4.10'daki sayısal verilere bakıldığında 400 µM ve üzeri derişimlere gidildikçe KA adsorpsiyonunda gerek MIP gerekse NIP için hızlı bir artış görülmektedir. 400 µM'ın altındaki derişimlerde NIP tarafından adsorplanan KA miktarı MIP'den düşükken, 400 µM'ın derişimde NIP'nin adsorpladığı KA miktarı MIP'in adsorpsiyonuna yaklaşmakta ve hatta daha yüksek derişimlerde MIP adsorpsiyonunu geçmektedir. Bunun sebebinin KA'nın asetonitrildeki çözünürlüğünün düşük olması, bu nedenle, yüksek derişimlerde KA'nın zamanla çökmesi olduğu düşünülmektedir. Dolayısıyla yüksek derişimlerde, ölçülen absorbansların polimerin KA'yı bağlamasıyla ilişkilendirilemeyeceği sonucuna varılmıştır. Baskılama faktörü de 60 µM KA derişiminin üzerinde hızla düşmektedir. Bu sebeplerden dolayı adsorpsiyon çalışmalarında 200 µM'ın üzerindeki derişimler kullanılmamıştır.

Tablo 4.10: Farklı derişimlerde KA çözeltilerinin MIP ve NIP'lerde adsorpsiyonu.

| Polimer | KA Derişimi (μM) | Adsorplanan KA miktarı ($\mu\text{g g}^{-1}$) | Baskılama Faktörü |
|------------|----------------------------------|---|-------------------|
| MIP NIP | 20 | 370 160 | 2,31 |
| MIP NIP | 40 | 670 330 | 2,03 |
| MIP NIP | 60 | 930 460 | 2,02 |
| MIP NIP | 100 | 1470 970 | 1,52 |
| MIP NIP | 200 | 2260 1800 | 1,26 |
| MIP NIP | 400 | 3670 3170 | 1,16 |
| MIP NIP | 600 | 4400 5400 | 0,81 |
| MIP NIP | 1000 | 6570 6850 | 0,96 |
| MIP NIP | 10000 | 56670 63330 | 0,89 |

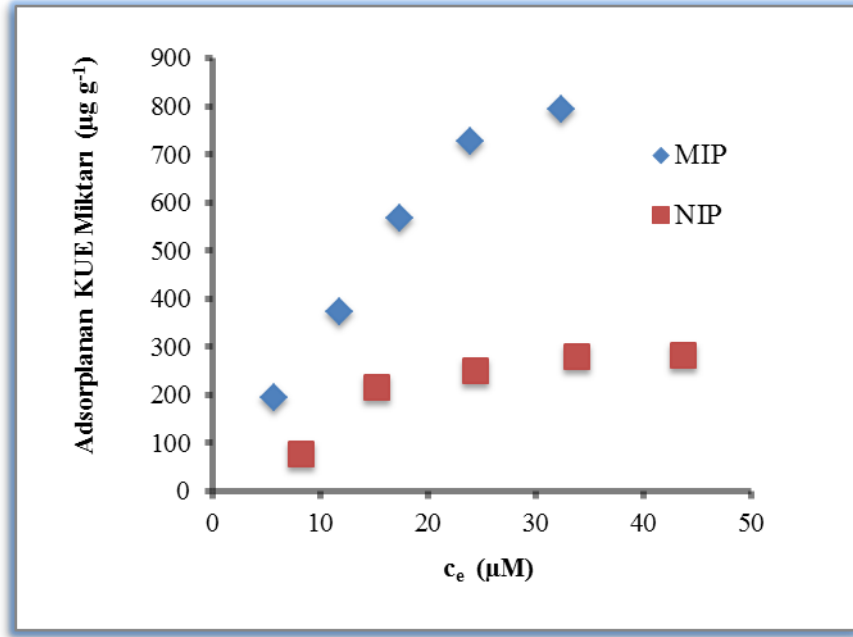


Şekil 4.4: KA-MIP ve NIP'e ait KA derişimi-adsorplanan KA miktarı grafiği.

4.4. MOLEKÜLER BASKILI POLİMERLERİN ADSORPSİYON ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

4.4.1. Batch (Kesikli Temas) Adsorpsiyon Testi

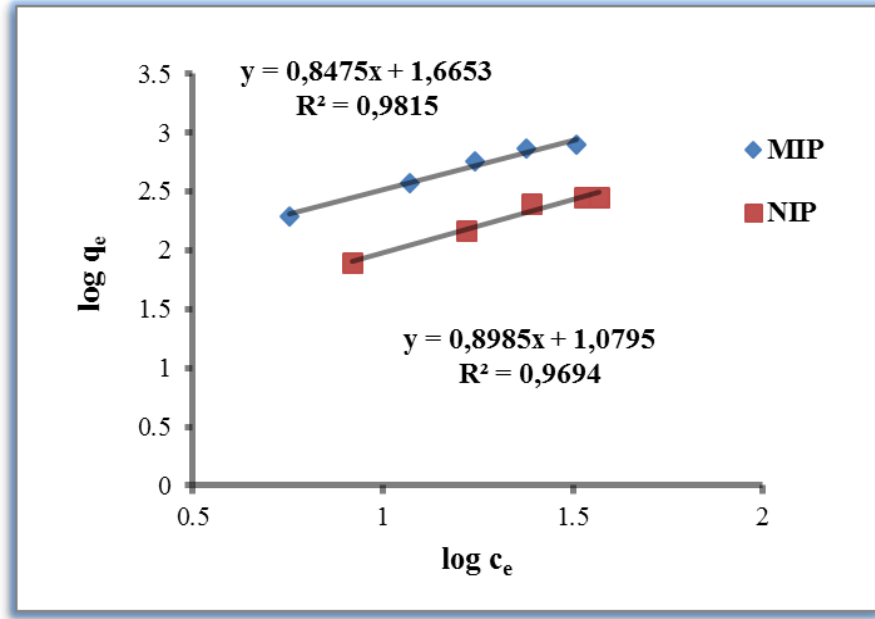
Şekil 4.5'te 1:4:20 molar bileşimli KUE-MIP ve NIP'e ait batch adsorpsiyon eğrisi görölmektedir.



Şekil 4.5: 1:4:20 KUE-MIP ve NIP'e ait batch adsorpsiyon izotermi.

KUE-MIP ve NIP'in adsorpsiyon özellikleri Freundlich ve Langmuir adsorpsiyon izotermi ile değerlendirildi.

1:4:20 KUE-MIP ve 0:4:20 NIP için $\log c_e$ ve $\log q_e$ değerleri arasında eşitlik 2.5'e göre doğrusal Freundlich adsorpsiyon izotermi çizildi (Şekil 4.6) ve elde edilen doğrunun eğiminden $1/n$, kayım değerinden ise $\log K_f$ değerleri hesaplandı. Tablo 4.11'de MIP ve NIP'e ait Freundlich izotermi büyüklükleri görülmektedir.



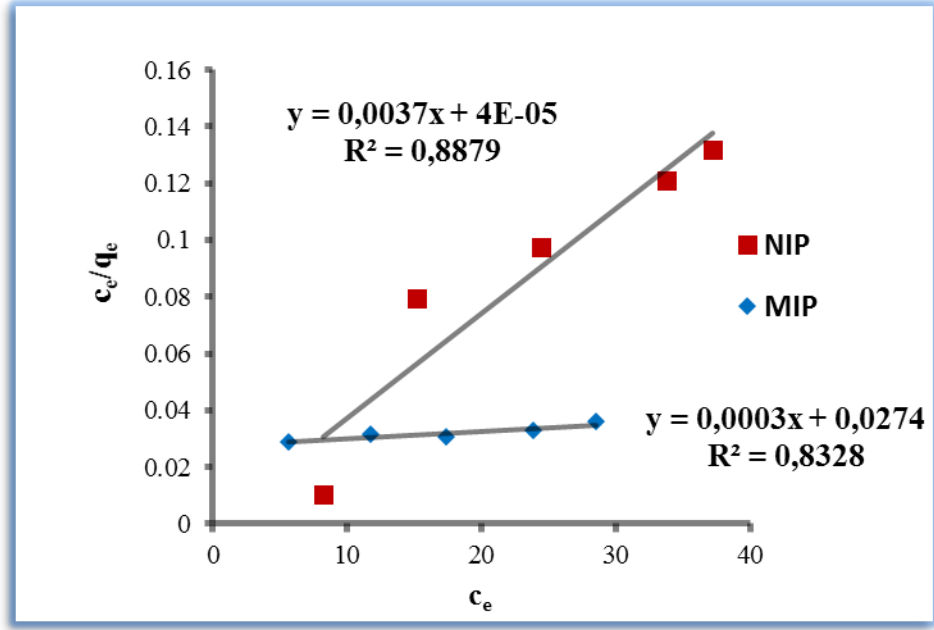
Şekil 4.6: KUE MIP ve NIP için Freundlich adsorpsiyon izotermi.

Tablo 4.11: KUE-MIP ve NIP için Freundlich adsorpsiyon izotermi değerleri.

| Polimer | Freundlich Sabitleri | | |
|---------|----------------------|------|----------------|
| | K _f | n | R ² |
| MIP | 46,27 | 1,18 | 0,9815 |
| NIP | 12,01 | 1,11 | 0,9694 |

KUE-MIP ve NIP için elde edilen uyum katsayılarının yüksekliği, adsorpsiyon yoğunluğunu gösteren n sabitinin >1 olması nedenleriyle Freundlich izotermi uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

Aynı KUE-MIP ve NIP için c_e ve c_e/q_e değerleri arasında eşitlik 2.7'ye göre doğrusal Langmuir adsorpsiyon izotermi çizildi (Şekil 4.7) ve elde edilen doğrunun eğiminden q_{max}, kayım değerinden ise b değerleri hesaplandı. Tablo 4.12'de MIP ve NIP'e ait Langmuir izotermine ait büyüklükler görülmektedir.



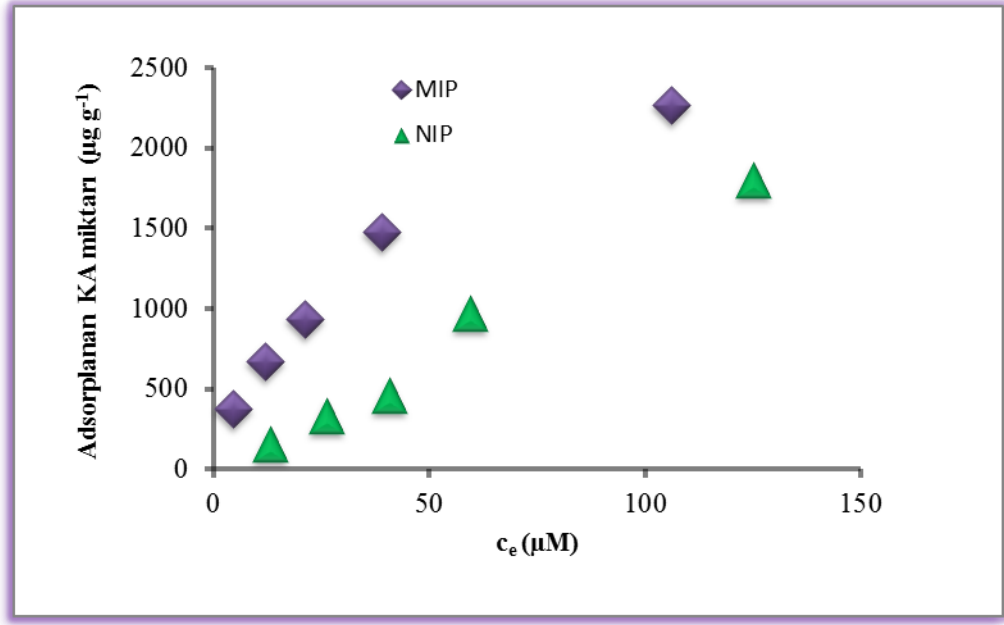
Şekil 4.7: KUE-MIP ve NIP için Langmuir adsorpsiyon izotermi.

Tablo 4.12: MIP ve NIP için Langmuir adsorpsiyon izotermi değerleri.

| Polimer | Langmuir Sabitleri | | |
|---------|--------------------|-------|--------|
| | q_{max} | b | R^2 |
| MIP | 3333 | 0,010 | 0,8328 |
| NIP | 270 | 9,09 | 0,8879 |

KUE-MIP ve NIP için elde edilen uyum katsayılarının Freundlich izotermi için elde edilenlerden düşük ve q_{max} değerinin deneysel olarak bulunandan çok büyük olması nedenleriyle bu MIP için Freundlich izotermi'nin daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

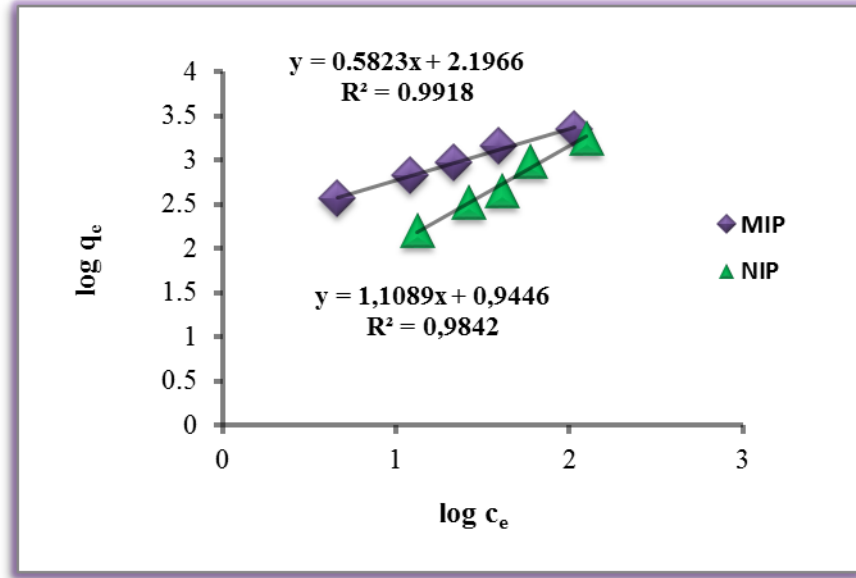
Şekil 4.8'de 1:4:16 molar bileşimli KA-MIP ve 0:4:16 NIP için KA geri bağla(n)masına ait batch adsorpsiyon eğrileri görülmektedir.



Şekil 4.8: 1:4:16 KA-MIP ve NIP'e ait KA için batch adsorpsiyon izotermi.

KA-MIP ve NIP'in KA için adsorpsiyon özellikleri Freundlich ve Langmuir izotermi ile değerlendirildi.

1:4:16 KA-MIP ve 0:4:16 NIP'de KA için $\log c_e$ ve $\log q_e$ değerleri arasında eşitlik 2.5'e göre doğrusal Freundlich adsorpsiyon izotermi çizildi (Şekil 4.9) ve elde edilen doğrunun eğiminden $1/n$, kayım değerinden ise $\log K_f$ değerleri hesaplandı. Tablo 4.13'te MIP ve NIP'e ait Freundlich izotermine ait büyüklükler görülmektedir.



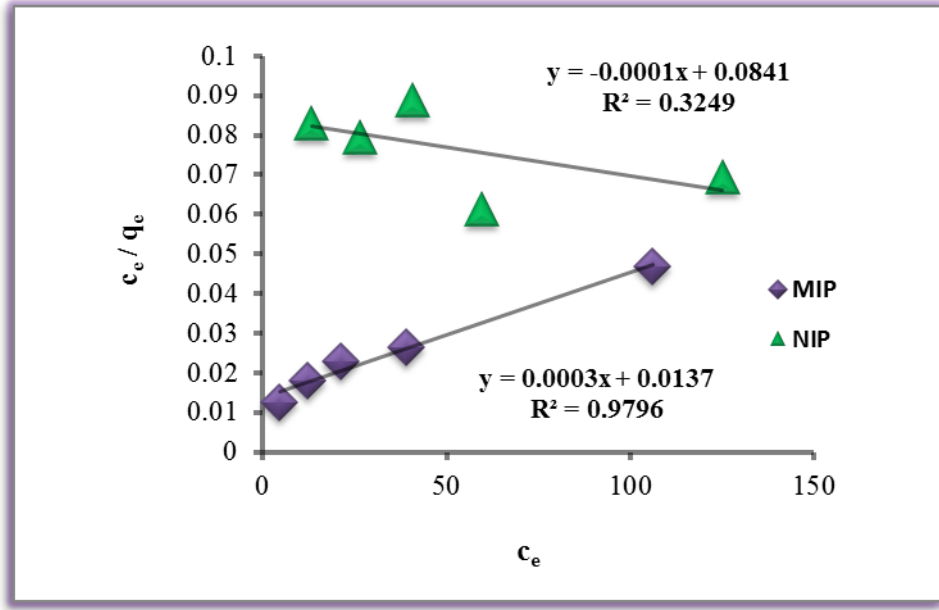
Şekil 4.9: KA-MIP ve NIP'in KA için Freundlich adsorpsiyon izotermi.

Tablo 4.13: MIP ve NIP'in KA için Freundlich adsorpsiyon izotermi değerleri.

| Polimer | Freundlich Sabitleri | | |
|---------|----------------------|------|----------------|
| | K _f | n | R ² |
| MIP | 157 | 1,72 | 0,9918 |
| NIP | 9 | 0,90 | 0,9842 |

KA-MIP'de KA için uyum katsayısının yüksekliği, n sayısının >1 olması nedenleriyle adsorpsiyonun Freundlich izotermine uyduğu sonucuna varılmıştır.

Aynı KA-MIP ve NIP'de KA için c_e ve c_e/q_e değerleri arasında eşitlik 2.7'ye göre doğrusal Langmuir adsorpsiyon izotermi çizildi (Şekil 4.10) ve elde edilen doğrunun eğiminden q_{max}, kayım değerinden ise b değerleri hesaplandı. Tablo 4.14'te MIP ve NIP'e ait Langmuir izotermine ait büyüklükler görülmektedir.



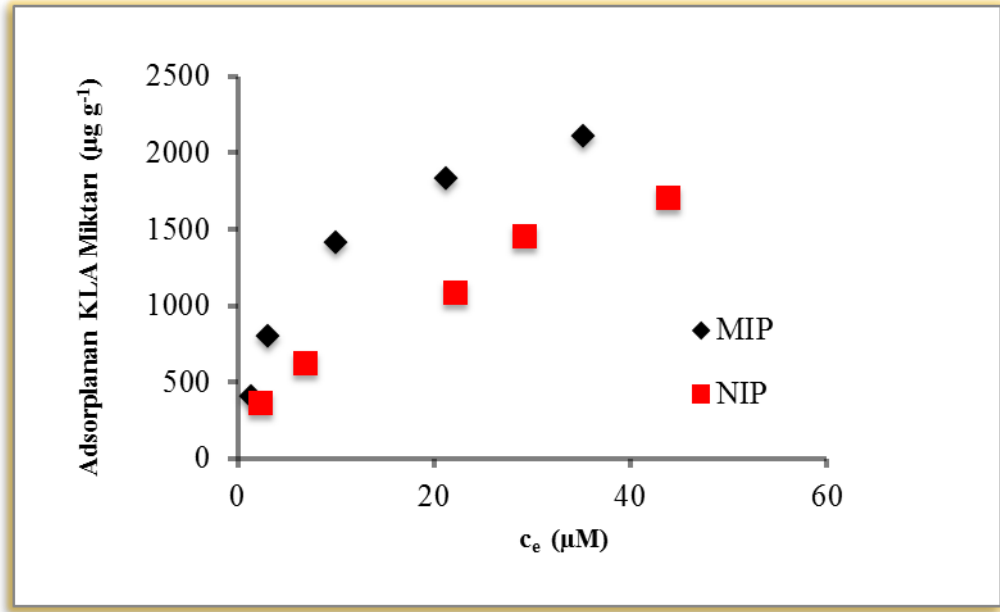
Şekil 4.10: KA-MIP ve NIP'in KA için Langmuir adsorpsiyon izotermi.

Tablo 4.14: KA-MIP ve NIP'in KA için Langmuir adsorpsiyon izotermi değerleri.

| Polimer | Langmuir Sabitleri | | |
|---------|--------------------|------------------------|--------|
| | q_{max} | b | R^2 |
| MIP | 3333 | $21,91 \times 10^{-3}$ | 0,9796 |
| NIP | 10000 | $1,19 \times 10^{-3}$ | 0,3249 |

KA-MIP'de KA adsorpsiyonunun için elde edilen uyum katsayılarının Freundlich izotermi ile elde edilenlerden düşük ve q_{max} değerinin deneysel olarak bulunandan çok büyük olması nedenleriyle bu MIP için Freundlich izotermi'nin daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

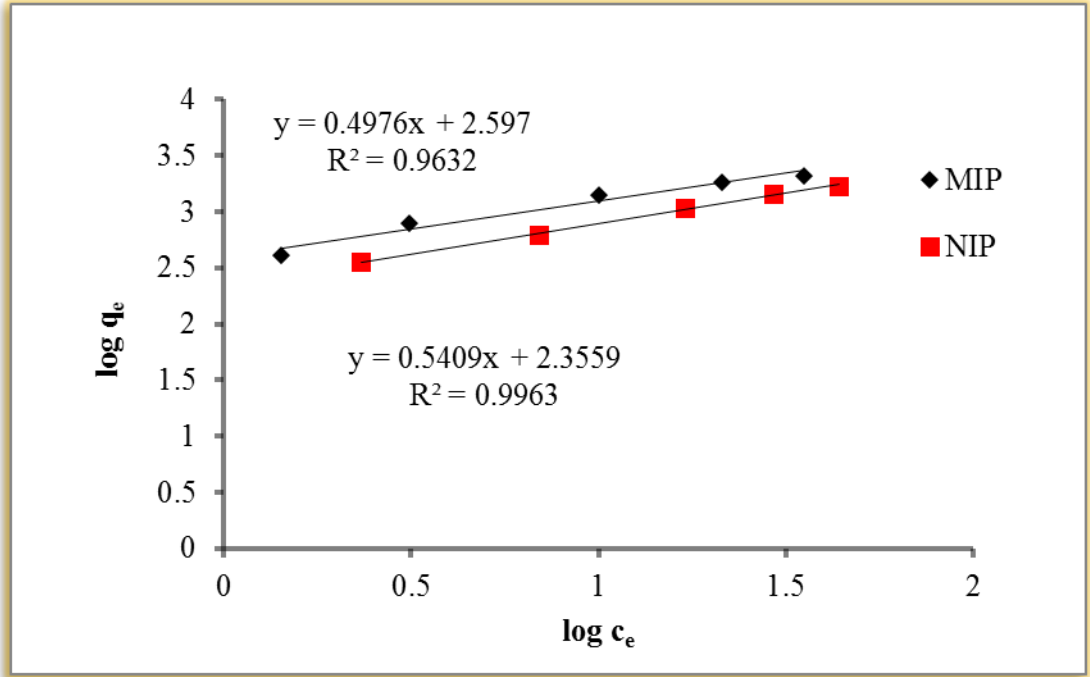
Şekil 4.11'de 1:4:16 molar bileşimli KA-MIP ve 0:4:16 NIP'in KLA için batch adsorpsiyon eğrileri görülmektedir.



Şekil 4.11: KA-MIP ve NIP'in KLA için batch adsorpsiyon izotermi

KA-MIP ve NIP'in KLA için adsorpsiyon özellikleri Freundlich ve Langmuir adsorpsiyon izotermi ile değerlendirildi.

1:4:16 KA-MIP ve 0:4:16 NIP'de KLA için $\log c_e$ ve $\log q_e$ değerleri arasında eşitlik 2.5'e göre doğrusal Freundlich adsorpsiyon izotermi çizildi (Şekil 4.12) ve elde edilen doğrunun eğiminden $1/n$, kayım değerinden ise $\log K_f$ değerleri hesaplandı. Tablo 4.15'te MIP ve NIP'e ait Freundlich izotermine ait büyüklükler görülmektedir.



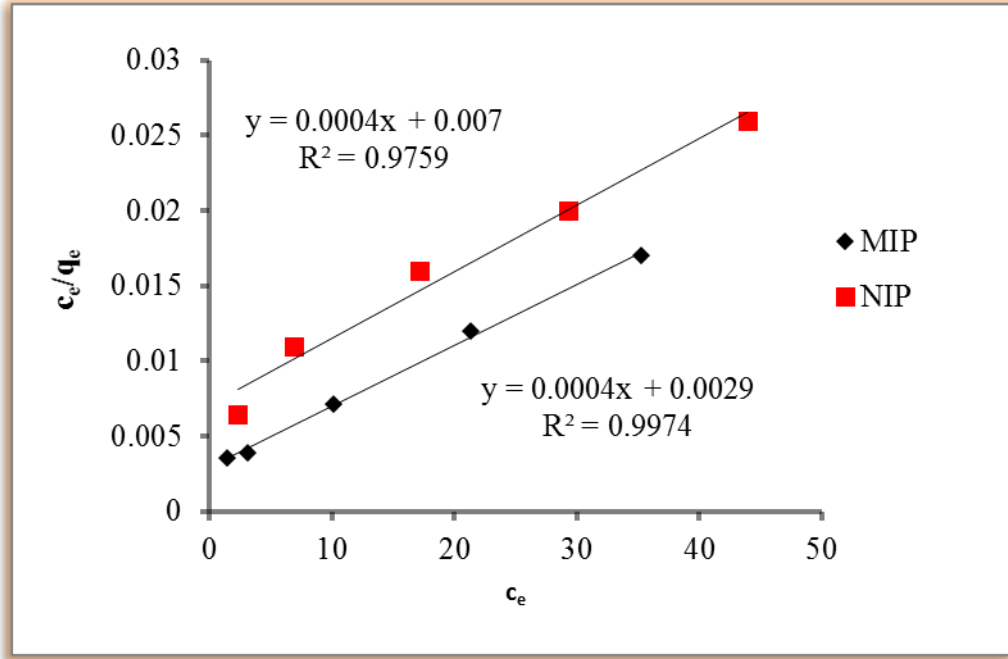
Şekil 4.12: KA-MIP ve NIP'in KLA için Freundlich adsorpsiyon izotermi.

Tablo 4.15: MIP ve NIP'in KLA için Freundlich adsorpsiyon izotermi değerleri.

| Polimer | Freundlich Sabitleri | | |
|---------|----------------------|------|----------------|
| | K _f | n | R ² |
| MIP | 395 | 2,00 | 0,9632 |
| NIP | 227 | 1,85 | 0,9963 |

KA-MIP ve NIP'de KLA için uyum katsayılarının yüksekliği, n sayısının >1 olması nedenleriyle adsorpsiyonun Freundlich izotermine uyduğu sonucuna varılmıştır.

Aynı KA-MIP ve NIP'de KLA için c_e ve c_e/q_e değerleri arasında eşitlik 2.7'ye göre doğrusal Langmuir adsorpsiyon izotermi çizildi (Şekil 4.13) ve elde edilen doğrunun eğiminden q_{max}, kayım değerinden ise b değerleri hesaplandı. Tablo 4.16'da MIP ve NIP'e ait Langmuir izotermine ait büyüklükler görülmektedir.



Şekil 4.13: KA-MIP ve NIP'in KLA için Langmuir adsorpsiyon izotermi.

Tablo 4.16: MIP ve NIP'in KLA için Langmuir adsorpsiyon izoterm verileri.

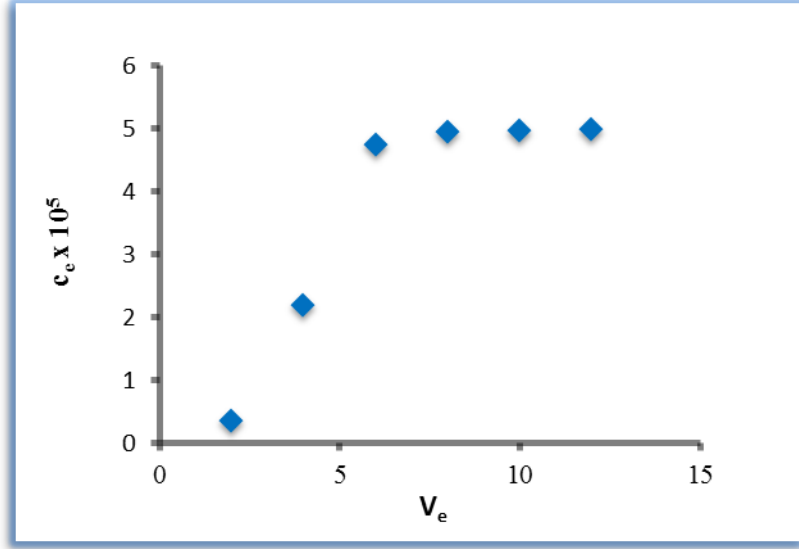
| Polimer | Langmuir Sabitleri | | |
|---------|--------------------|------|--------|
| | q_{max} | b | R^2 |
| MIP | 2500 | 0,14 | 0,9974 |
| NIP | 2500 | 0,06 | 0,9759 |

KA-MIP'de KLA adsorpsiyonu için elde edilen uyum katsayılarının Freundlich izotermi ile elde edilenlerden daha büyük olmasına rağmen Freundlich izotermi için bulunan değerin de 0,9632 ve q_{max} değerinin NIP ile aynı olması nedenleriyle bu MIP için de Freundlich izotermiminin daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

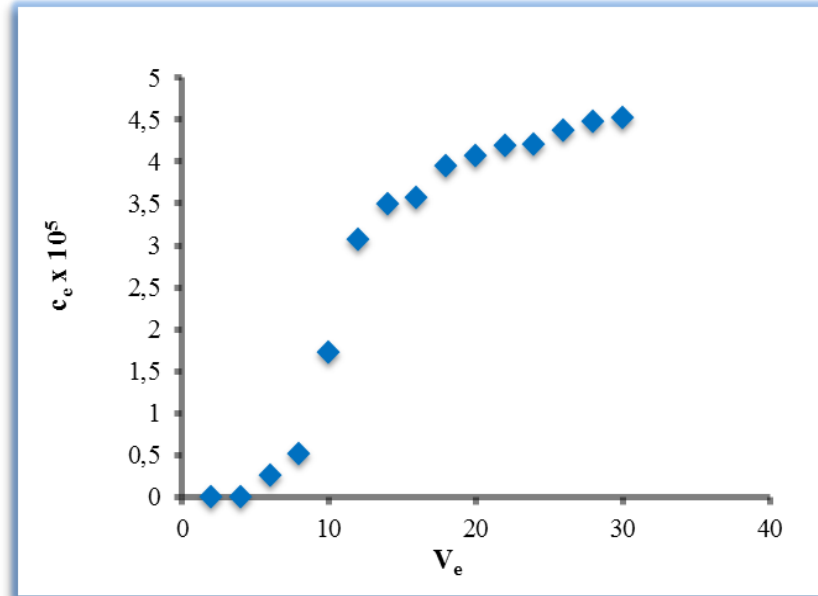
4.4.2. Kolon Denemeleri

KUE-MIP için; kolon denemeleri, 3 mL'lik boş SPE kartuşun 100 mg 1:4:20 KUE-MIP ile doldurulmasıyla hazırlanan kolondan iki farklı çözücüde {Metanol ve ACN:DMSO (98:2, v/v)} ayrı ayrı hazırlanmış 50 μ M KUE çözeltisinin yaklaşık 0,3 mL dak^{-1} akış hızıyla geçirilmesiyle gerçekleştirildi. Kolondan ayrılan çözeltinin derişiminin (c_e) ordinata, kolondan ayrılan çözelti hacminin (V_e) absise konulmasıyla çizilen kopma (breakthrough) eğrisi, Şekil 4.14'te görülmektedir. Bu eğri üstünün alanı, polimerin dinamik tutma kapasitesini mmol olarak vermektedir. Hesaplanan dinamik tutma

kapasitesi metanol ortamında $2,1 \times 10^{-4}$ mmol ($284 \mu\text{g g}^{-1}$), ACN:DMSO (98:2, v/v) ortamında ise 7×10^{-4} mmol ($946 \mu\text{g g}^{-1}$) KUE'dir. Buradan da anlaşıldığı gibi daha polar olan metanol ortamında KUE adsorpsiyonu ACN:DMSO (98:2, v/v) ortamına göre çok daha düşüktür. Bu sebeple metanolün KUE adsorpsiyonu için uygun bir çözücü olmadığı sonucuna varıldı.

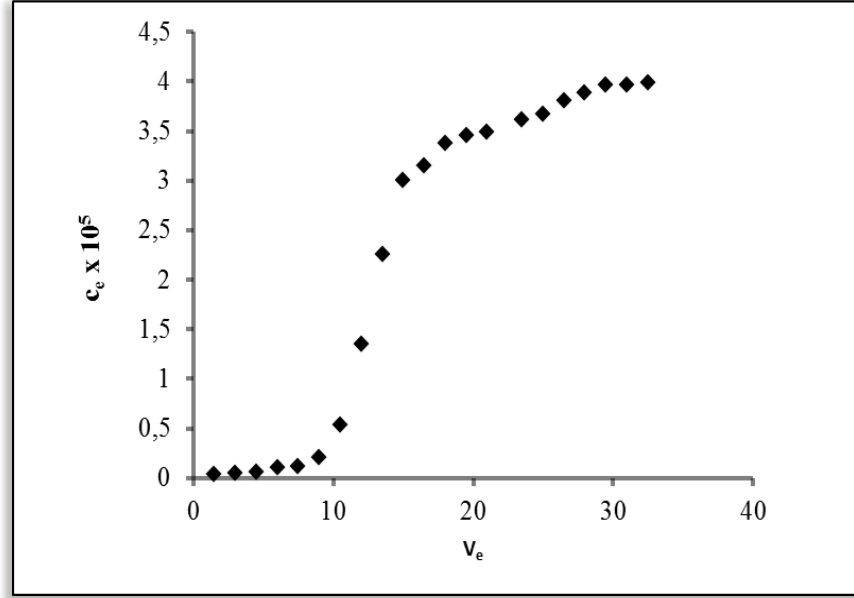


Şekil 4.14: 1:4:20 KUE-MIP'in metanol çözücüsünde hazırlanmış KUE için kopma (breakthrough) eğrisi.

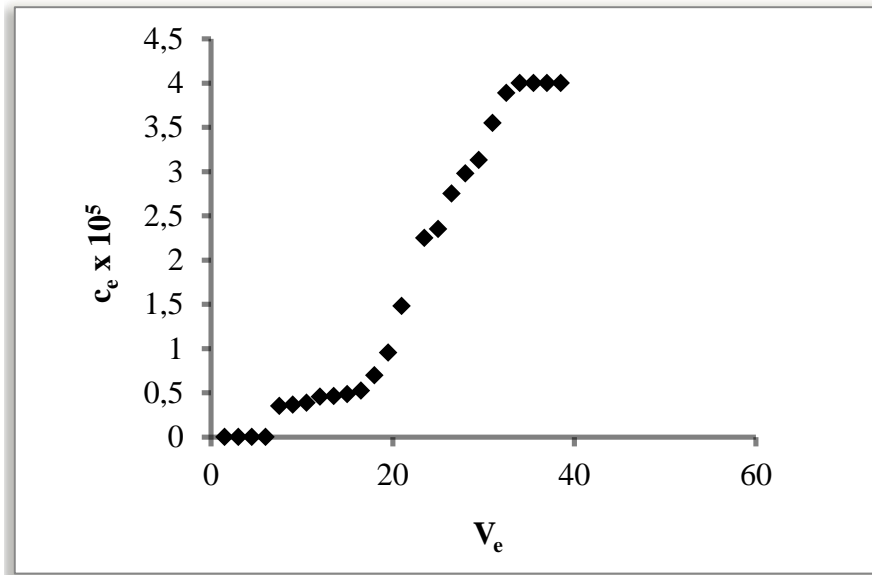


Şekil 4.15: 1:4:20 KUE-MIP'in ACN:DMSO (98:2, v/v) çözücü karışımında hazırlanmış KUE için kopma (breakthrough) eğrisi

KA-MIP için; kolon denemeleri, aynı miktar 1:4:16 KA-MIP'in aynı hacimde SPE kartuşa doldurulması ve aynı akış hızıyla geçirilen ACN çözücüsünde hazırlanmış 40 μM KA ve KLA çözeltileriyle ayrı ayrı gerçekleştirildi. Şekil 4.16 ve 4.17, sırasıyla KA ve KLA için yukarıda anlatıldığı gibi çizilen kopma eğrilerini göstermektedir.



Şekil 4.16: 1:4:16 KA-MIP'in ACN çözücüsünde hazırlanmış KA için kopma eğrisi.

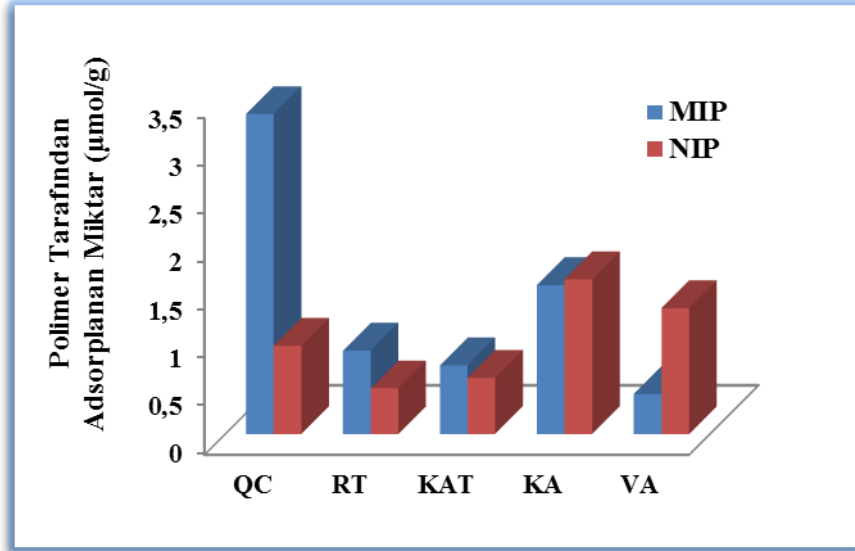


Şekil 4.17: 1:4:16 KA-MIP'in ACN çözücüsünde hazırlanmış KLA için kopma eğrisi.

Eğrilerin üst kısmından hesaplanan dinamik tutma kapasitesi KA için $5,7 \times 10^{-3}$ mmol ($1027 \mu\text{g g}^{-1}$) ve KLA için $9,05 \times 10^{-4}$ mmol ($3207 \mu\text{g g}^{-1}$) olarak bulunmuştur.

4.4.3. Seçimlilik Denemeleri

KUE-MIP için; 1:4:20 KUE-MIP ve 0:4:20 NIP’de fenolik bileşiklerin seçimlilik denemeleri, 40 μ M derişimdeki kuersetin (KUE), rutin (RT), kateşin (KAT), kafeik asit (KA) ve vanilik asit (VA) çözeltileriyle gerçekleştirildi. Şekil 4.18’de fenolik bileşiklerin MIP ve NIP’te adsorplanan miktarları gösterilmektedir.

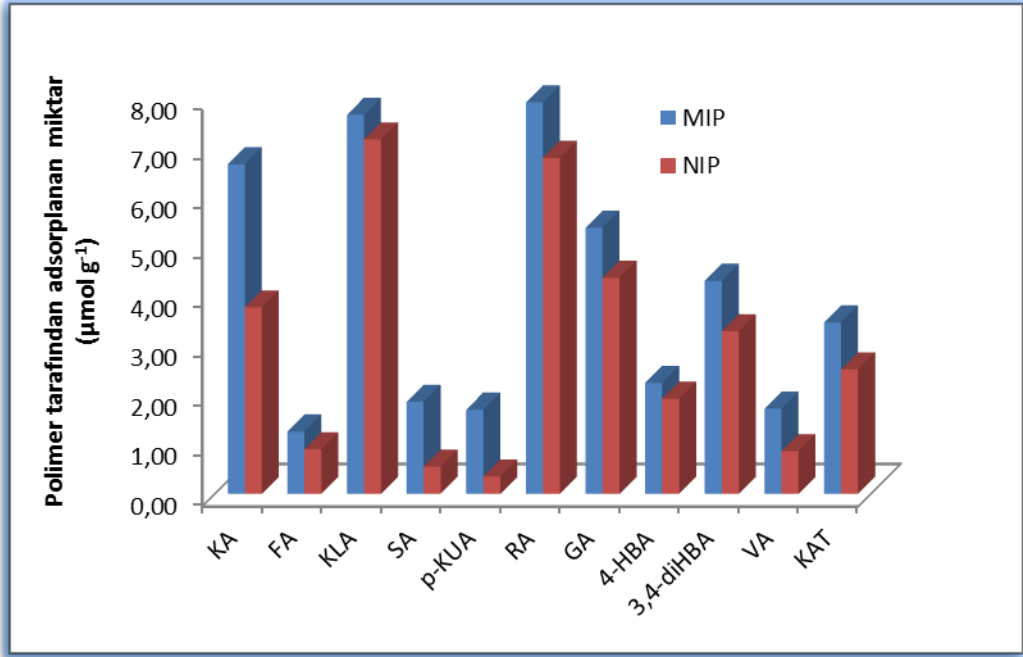


Şekil 4.18: KUE-MIP ve NIP’de fenolik bileşiklerin adsorpsiyonunun karşılaştırılması.

Şekil 4.18’de de görüldüğü gibi kuersetinin MIP üzerindeki adsorpsiyonu ve seçimliliği diğer fenolik bileşiklere göre daha fazladır. Rutin, kuersetinin şekerli formu olduğundan şeker yapısı sterik engel oluşturmuş ve bu sebeple MIP ve NIP’te daha az adsorplanmıştır. Kateşin de flavonoid yapısında olduğundan dolayı polimerlerde bir miktar adsorplanmıştır. Ancak MIP ve NIP’deki adsorpsiyon miktarı birbirine çok yakın olduğu için kateşinin MIP’te kalıba girmediği sadece yapısındaki hidroksil grupları ile polimer yüzeyinde hidrojen bağı yaptığı düşünülebilir. Kafeik asit ve vanilik asit sırasıyla hidroksisinnamik asit ve hidroksibenzoik asit yapısındadır. Ancak yapılarındaki hidroksil grupları sebebiyle polimer kalıbına girmeden yüzeyle hidrojen bağı yaparak tutuldukları söylenebilir. Sonuç olarak kateşin, kafeik asit ve vanilik asidin polimer tarafından adsorpsiyonunun non-spesifik etkileşimlere dayandığı düşünülebilir.

KA-MIP için; 1:4:16 KA-MIP ve 0:4:16 NIP’de fenolik bileşiklerin seçimlilik denemeleri, kafeik asit (KA) gibi hidroksisinnamik asit sınıfından olan ferulik asit (FA), klorojenik asit (KLA), sinapik asit (SA), rosmarinik asit (RA) ve *p*-kumarik asit (*p*-

KUA); hidroksibenzoik sınıftan olan gallik asit (GA), protokateşuik asit (PA), 4-hidroksibenzoik asit (4-HBA), 3,4-dihidroksibenzoik asit (3,4-diHBA), vanilik asit (VA) ve flavonoidlerden olan kateşin (KAT)'in 80 μM derişimdeki çözeltileriyle gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.19'da incelenen fenolik bileşiklerin MIP ve NIP'te adsorplanan miktarları görülmektedir.



Şekil 4.19: KA-MIP ve NIP'de fenolik bileşiklerin adsorpsiyonunun karşılaştırılması.

Hidroksisinnamik asit yapısında olan FA adsorpsiyonuna bakıldığında yapı olarak KA'ya benzemesine rağmen fenil grubunda 3-metoksi yapısı bulunmasının sterik engel oluşturup hidrojen bağı yapma etkinliğini azalttığı bu sebeple MIP ve NIP'de adsorpsiyonunun çok yüksek olmadığı görülmektedir. KLA ise KA'nın kuinik asit esteri olduğundan MIP kalıbına girmesi için sterik engel oluşturması beklenmekte, ancak çok fazla hidroksil grubu içerdiği için hem MIP hem de NIP tarafından yüksek oranda adsorplanmaktadır. RA ise KA'nın fenil esteri olması ve çok fazla hidroksil grubu içermesinden dolayı KA-MIP ve NIP'te oldukça yüksek miktarda adsorplanmıştır. Yüksek miktarda adsorplanan KLA ve RA'nın MIP ve NIP arasındaki adsorpsiyon farkı KA'ya göre düşük olduğundan bu bileşiklerin adsorpsiyonu KA kadar özgül değildir. SA ise fenil halkasındaki 3,5-dimetoksi grubunun sterik engellemesi nedeniyle MIP ve NIP'de daha az adsorplanmaktadır. *p*-KUA de KA'dan farklı olarak fenil halkasında sadece 4-hidroksi yapısı içerdiğinden MIP ve NIP'de adsorpsiyonu düşüktür.

Hidroksibenzoik asit yapısında olan GA ve 3,4-diHBA, KA'ya göre daha küçük molekül yapısında olduğundan ve KA gibi 3,4-dihidroksi yapısı içerdiğinden polimerde tutulma oranı yüksektir. VA ve 4-HBA'nın KA yapısıyla benzer tek bir kalıba bağlanma noktası olduğundan polimer tarafından adsorpsiyonu düşüktür.

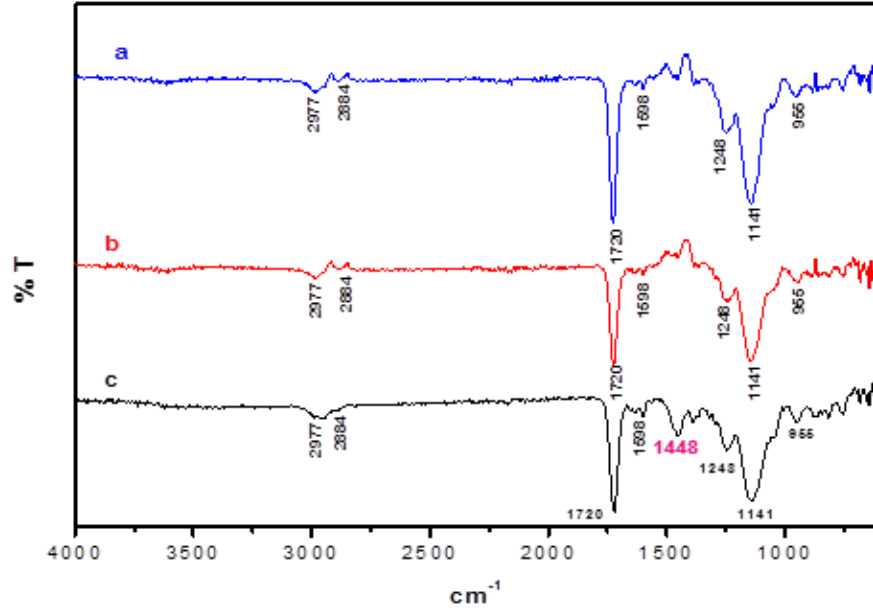
Flavonoid yapısında olan KAT'ın ise KA ile 3,4-dihidroksifenil yapısı ortak olduğu için polimer tarafından bir miktar adsorplandığı görülmektedir.

MIP'deki adsorpsiyon sıralaması ($\mu\text{mol g}^{-1}$); RA (7,90) > KLA (7,65) > KA (6,65) > GA (5,37) > 3,4-diHBA (4,30) > KAT (3,46) > 4-HBA (2,24) > SA (1,86) > VA (1,72) > *p*-KUA (1,70) > FA (1,26).

NIP'deki adsorpsiyon sıralaması ($\mu\text{mol g}^{-1}$); KLA (7,11) > RA (6,78) > GA (4,36) > KA (3,76) > 3,4-diHBA (3,28) > KAT (2,51) > 4-HBA (1,92) > FA (0,90) > VA (0,86) > SA (0,55) > *p*-KUA (0,35) şeklindedir.

4.5. MOLEKÜLER BASKILI POLİMERLERİN YAPILARININ İNCELENMESİ

KUE-MIP ve NIP'lere ait FTIR-ATR spektrumları, 0:4:20 NIP, kalıbı uzaklaştırılmış- MIP ve 1:4:20 KUE-MIP için Şekil 4.20'de görülmektedir.

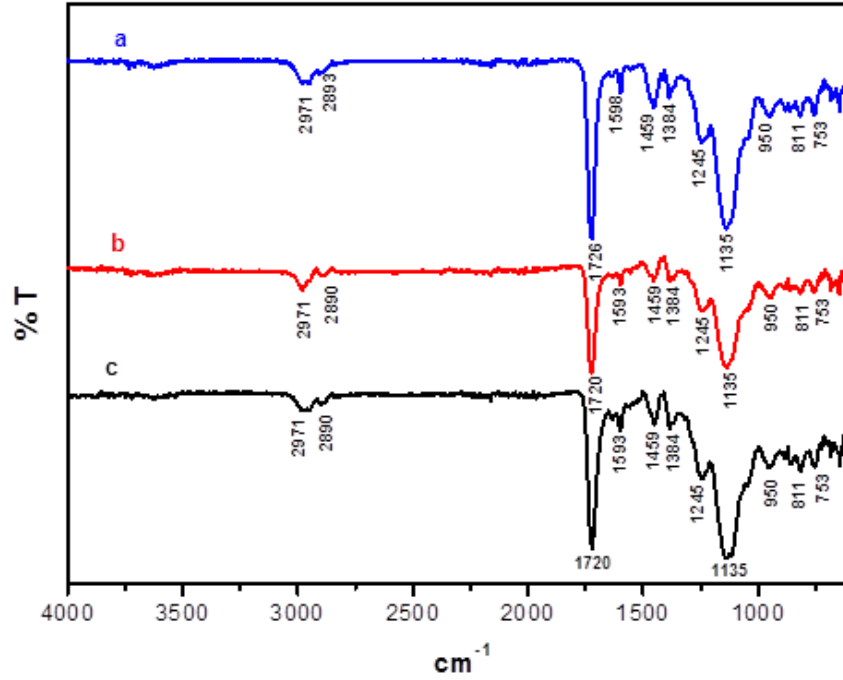


Şekil 4.20: KUE-MIP ve NIP'lerin FTIR-ATR spektrumları.

a: 0:4:20 NIP, b: kalıbı uzaklaştırılmış-MIP, c: 1:4:20 KUE-MIP

Üç polimerde de görülen 2977 cm^{-1} 'deki absorpsiyon bandı C-H gerilme, 1720 cm^{-1} 'deki band C=O gerilme, 1141 cm^{-1} 'deki band C-OH gerilme titreşimlerine, 1248 cm^{-1} 'deki band C-O bükülme bandına aittir (Hong ve Chen, 2013; Song ve diğ., 2009). KUE-MIP' te (c) görülen ve diğer spektrumlarda görünmeyen 1448 cm^{-1} 'deki band, kuersetinin yapısında bulunan karbonile komşu metilene ait absorpsiyon bandını göstermektedir (Chourasiya ve diğ., 2012). Bu da, sentezlenen MIP'de kuersetinin varlığını doğrulayan bulgulardan biridir. Kuersetin standardının saf haldeki FTIR spektrumunda 3411 cm^{-1} deki titreşim bandı, fenol grubuna ait -OH gerilmesine ait olup bu band MIP'de kaybolmuştur (Pakade ve diğ., 2012). Bunun sebebi kuersetinin fenolik -OH'larının monomerle etkileşime girmesidir. Kalıbı uzaklaştırılmış-MIP'in FTIR spektrumunda pik şiddetlerinin diğer polimerlere göre düşük olması, kuersetinin uzaklaştırılması nedeniyle bu molekülün temel titreşimlere ait pik şiddetlerine katkılarının kalkmasından dolayıdır. (Pakade ve diğ., 2012; Heneczowski ve diğ, 2001; Song ve diğ., 2009).

KA-MIP ve NIP'lere ait FTIR-ATR spektrumları, 0:4:16 NIP, kalıbı uzaklaştırılmış-MIP ve 1:4:16 KA-MIP için Şekil 4.21'de görülmektedir.



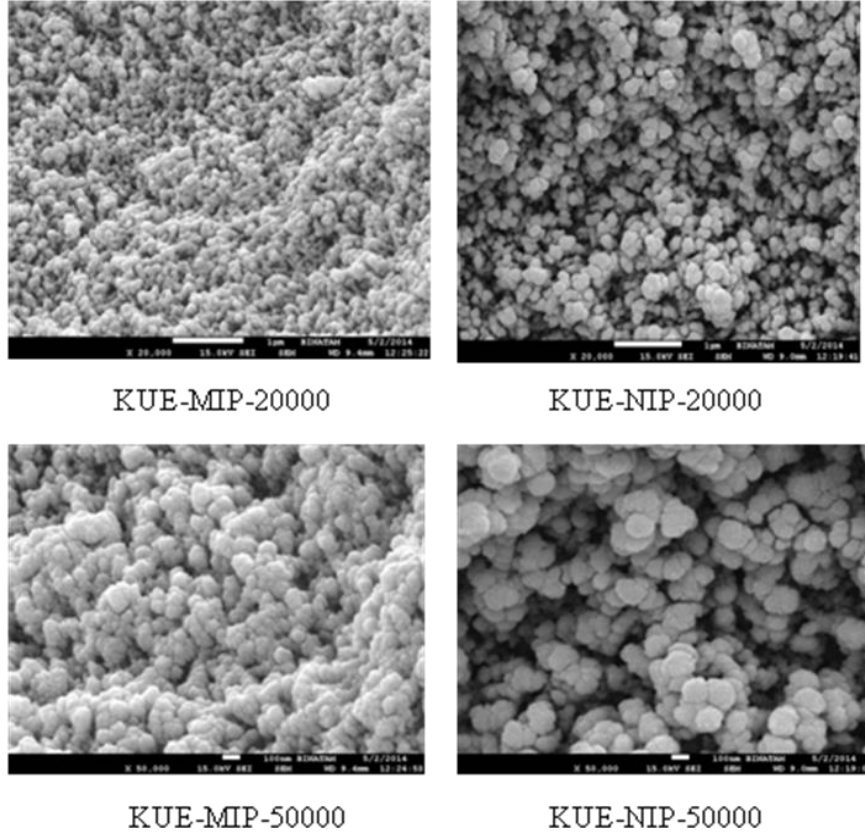
Şekil 4.21: KA-MIP ve NIP'lerin FTIR-ATR spektrumları.

a: 0:4:16 NIP, b: kalıbı uzaklaştırılmış-MIP, c: 1:4:16 KA-MIP

NIP'te 1726 cm^{-1} 'de diğerlerinde 1720 cm^{-1} 'de görülen band C=O gerilme, 1245 ve 1135 cm^{-1} 'deki bandlar C-O-C veya -C-O gerilme, 2971 cm^{-1} 'deki asimetrik -CH gerilme ve 1459 cm^{-1} 'deki band -CH simetrik gerilme titreşimlerine aittir. Bu üç spektrumda yeni bir pik belirmesi veya varolan bir pikin kaybolması şeklinde bir farklılık görülmemektedir. Buna karşılık kafeik asit standardının FTIR spektrumunda $3200\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$ 'deki -OH ve fenolik -OH titreşimlerine ait bandların (Świsłocka, 2013) MIP spektrumunda bulunmadığı görülmüş, bunun sebebinin kafeik asidin -OH gruplarının monomerle etkileşime girmesi olabileceği sonucuna varılmıştır. Ayrıca kalıbı uzaklaştırılmış-MIP'in FTIR spektrumunda pik şiddetlerinin diğer polimerlere göre düşük olması, KA'in uzaklaştırılması nedeniyle bu molekülün temel titreşimlere ait pik şiddetlerine katkılarının kalkmasından dolayı olabileceği düşünülmüştür. (Nicolescu ve diğ., 2011; Chen ve diğ., 2011; Świsłocka, 2013).

4.6. MOLEKÜLER BASKILI POLİMERLERİN MORFOLOJİLERİNİN İNCELENMESİ

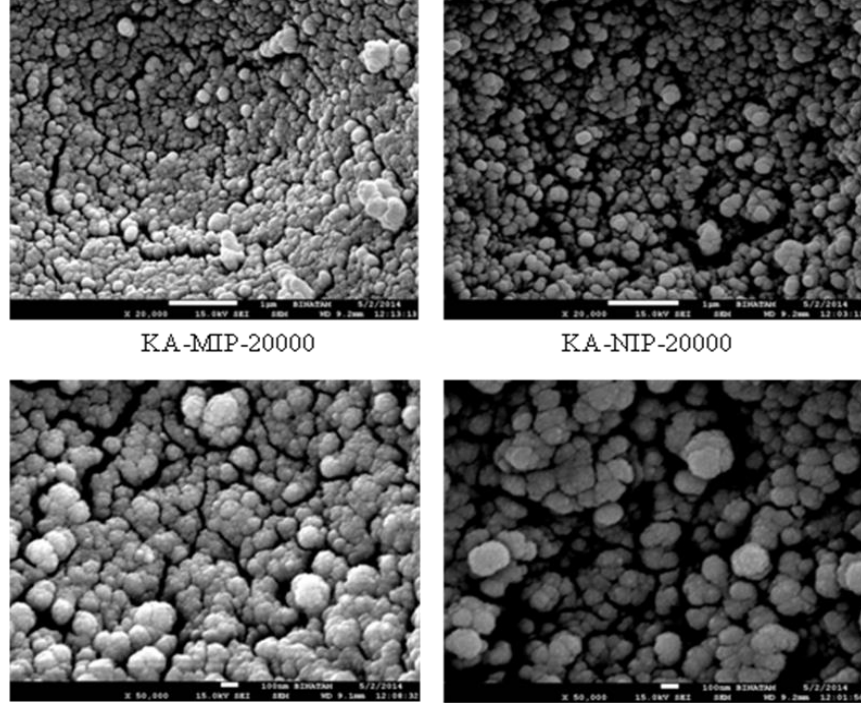
KUE-MIP ve NIP' lerin yüzey morfolojileri SEM kullanılarak 20 000 ve 50 000 büyütme oranlarında incelenmiştir (Şekil 4.22). MIP ve NIP arasında çok belirgin bir farklılık görülmemekle beraber MIP, daha yoğun gözenekler ile daha homojen yapıya sahiptir. Yığın polimerizasyonu sonucunda elde edilen polimerik yapılar küresel yapıya ve gözenekli yüzeylere sahiptirler. Polimer yüzeyinin gözenekli yapıya sahip olması yüzey alanını artırır ve bu durum polimerin özellikle kromatografik uygulamalarda dolgu malzemesi olarak kullanımında üstünlük sağlar. Yapıdaki gözenekler polimerin aynı zamanda yüksek iç yüzey alanına sahip olmasına neden olur. Sonuçta kütle aktarımını zorlaştıran yüzey ve difüzyon dirençleri azalır ve kütle aktarımı nispeten kolaylaşır (Song ve diğ., 2009).



Şekil 4.22: KUE-MIP ve NIP'e ait farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri.

KA-MIP ve NIP' lerin 20 000 ve 50 000 büyütme oranlarındaki SEM görüntülerine (Şekil 4.23) bakıldığında MIP ve NIP arasında çok önemli bir farklılık görülmemektedir. Birçok makrogözenek ve akış-kanalları bu polimerlerin ağ iskeletleri

içinde bulunmaktadır. Bu makro gözenekler ve kanallar hareketli fazın polimer içinden düşük akış direnci ile akışını ve böylece çözünen maddenin hızlı kütle aktarımını sağlar. Ayrıca düşük geri basınç, yüksek akış hızıyla çalışmaya olanak verir. Polimerizasyon sıcaklığı, çözücü tipi ve bileşim polimerin gözenek özelliklerini etkileyen en önemli üç faktördür (Zhu ve diğ., 2010).

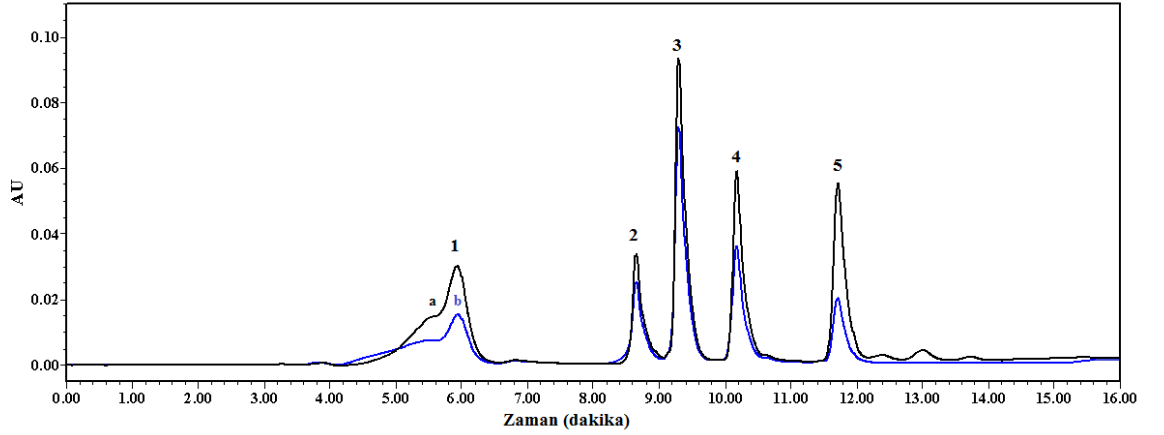


Şekil 4.23: KA-MIP ve NIP'e ait farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri.

4.7. SENTETİK KARIŞIMLARLA MOLEKÜLER BASKILI KATI-FAZ EKSTRAKSİYONU UYGULAMALARI

4.7.1. Gallik asit, Kafeik asit, Katesin, Rutin ve Kuersetin İçeren Sentetik Karışım için KUE-MISPE Uygulaması

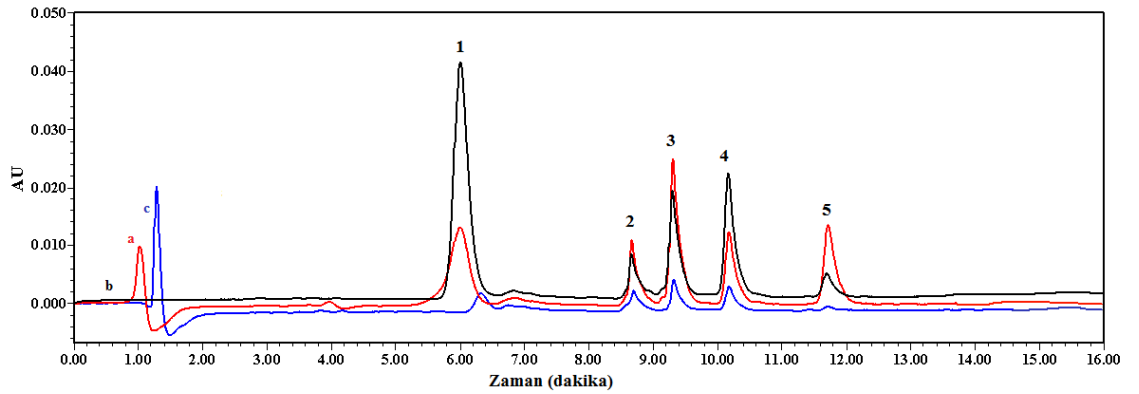
2×10^{-4} M GA, KA, KAT, RT ve KUE'den oluşan ACN ortamında hazırlanmış karışım çözeltisinden 2,5 mL alınarak 1 mL'lik SPE kartuş içindeki 50 mg 1:4:20 KUE-MIP'e 0,3 mL dak^{-1} hızla yüklenmiştir. Yükleme öncesi ve sonrası kromatogramları Şekil 4.24'te gösterilmiştir.



Şekil 4.24: GA, KA, KAT, RT, KUE'den oluşan sentetik karışım çözeltisinin KUE-MISPE yükleme öncesi (a) ve sonrası (b) kromatogramları.

1: GA, 2: KA, 3: KAT, 4: RT, 5: KUE; Belirleme dalga boyu: 280 nm

Şekil 4.24'den de görüldüğü gibi kartuşta en fazla KUE olmak üzere tüm fenolik bileşikler az da olsa tutulmuştur. Ancak KUE ve RT dışındaki diğer bileşenlerin flavonol yapısında olmamaları nedeniyle kalıba girmeden non-spesifik olarak sadece -OH gruplarıyla polimere bağlandığı düşünülmüştür. Bu sebeple bu bileşiklerin polimerden uzaklaştırılması için uygun çözücü sistemleri, özellikle polar karışımlar kullanılmıştır. Bu yıkama işlemleri sırasında polimerde adsorbe olan KUE'nin de bir kısmı uzaklaşmıştır. Şekil 4.25'te yıkama çözeltilerine ait kromatogramlar görülmektedir (1., 2. ve 5. yıkama çözeltilerine ait kromatogramlar verilmiştir.).

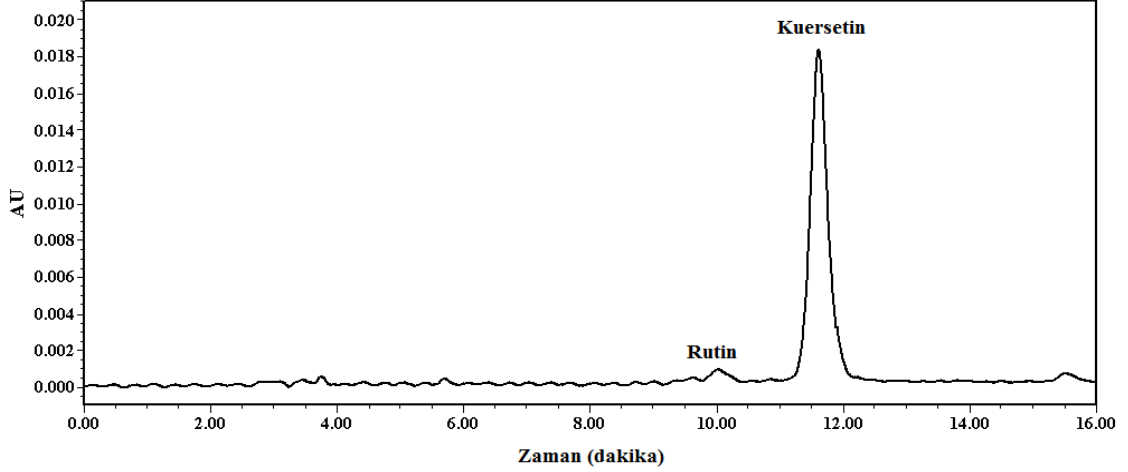


Şekil 4.25: GA, KA, KAT, RT, KUE'den oluşan sentetik karışım çözeltisinin KUE-MISPE yıkama kromatogramları.

a: Yıkama 1 (0,5 mL H₂O) ; b: Yıkama 2 (1 mL ACN) ; c: Yıkama 5 (2 mL ACN:H₂O (20:80, v/v)).

1: GA; 2: KAT; 3: KA; 4: RT; 5: KUE; Belirleme dalga boyu: 280 nm.

KUE dışındaki diğer fenolik bileşikler yıkama basamağı ile kartuştan uzaklaştırılmıştır. MISPE'nin son basamağı olan elüsyon aşamasında 3 mL MeOH:HAc (4:1, v/v) karışımı $0,5 \text{ mL dak}^{-1}$ akış hızıyla kullanılmıştır. Şekil 4.26'da elüsyon kromatogramı görülmektedir.



Şekil 4.26: GA, KA, KAT, RT, KUE'den oluşan sentetik karışım çözeltisinin KUE-MISPE elüsyon kromatogramı.

Belirleme dalga boyu: 280 nm.

Yukarıdaki elüsyon kromatogramından da görüldüğü gibi KUE-MIP ile gerçekleştirilen MISPE uygulamasında GA, KA, KAT ve RT varlığında KUE ve çok düşük miktarda RT geri kazanımı sağlanmıştır. Tablo 4.17'de sentetik karışım çözeltisi ile gerçekleştirilen KUE-MISPE uygulamasının sonuçları görülmektedir.

Tablo 4.17: GA, KA, KAT, RT ve KUE'den oluşan sentetik karışım çözeltisi için KUE-MISPE sonuçları.

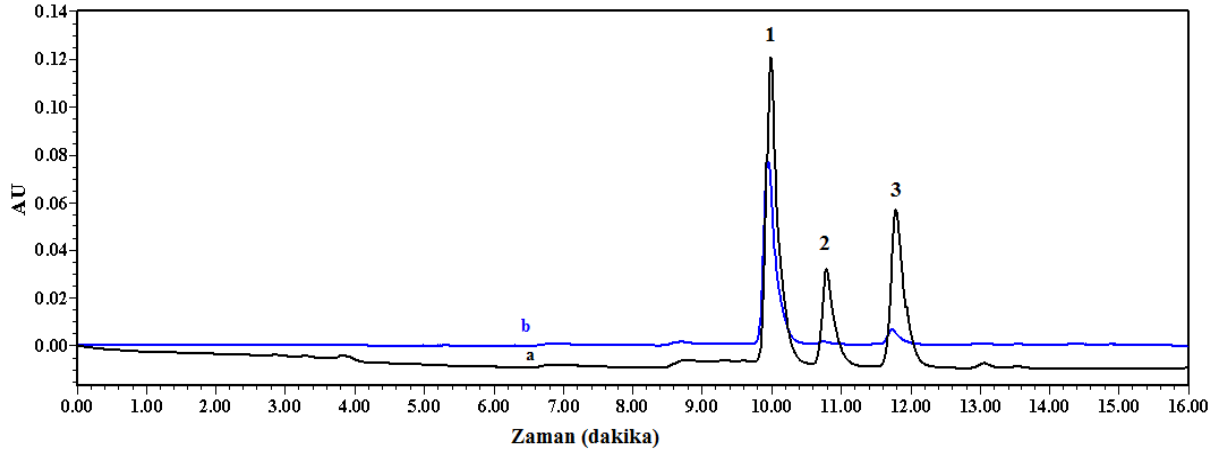
| Aşamalar | KUE miktarı (mmol) | RT miktarı (mmol) |
|----------------|---|---|
| Yüklenen | $5,00 \times 10^{-4}$ | $5,00 \times 10^{-4}$ |
| Tutulan | $3,48 \times 10^{-4}$ | $2,62 \times 10^{-4}$ |
| Geri kazanılan | $2,50 \times 10^{-4}$ (% 72) ^a | $0,61 \times 10^{-4}$ (% 23) ^a |

^a: % Geri kazanım.

Tablo 4.17'den de görüldüğü gibi hazırlanan KUE-MIP ile bitkisel örneklerde bulunma olasılığı yüksek fenolik bileşiklerin diğer sınıflarına ait GA, KAT, KA ve aynı gruptan RT varlığında KUE % 72 verimle geri kazanılmıştır. Aynı gruptan olan RT'den ise büyük ölçüde ayrılmakla birlikte % 23 oranında RT de karışımda kalmıştır. Bu da MIP'ler için beklenen ve diğer çalışmalarda da karşılaşılan bir durumdur (Song ve diğ.; Theodoridis ve diğ.,2006).

4.7.2. Floridzin, Mirisetin ve Kuersetin İçeren Sentetik Karışım için KUE-MISPE Uygulaması

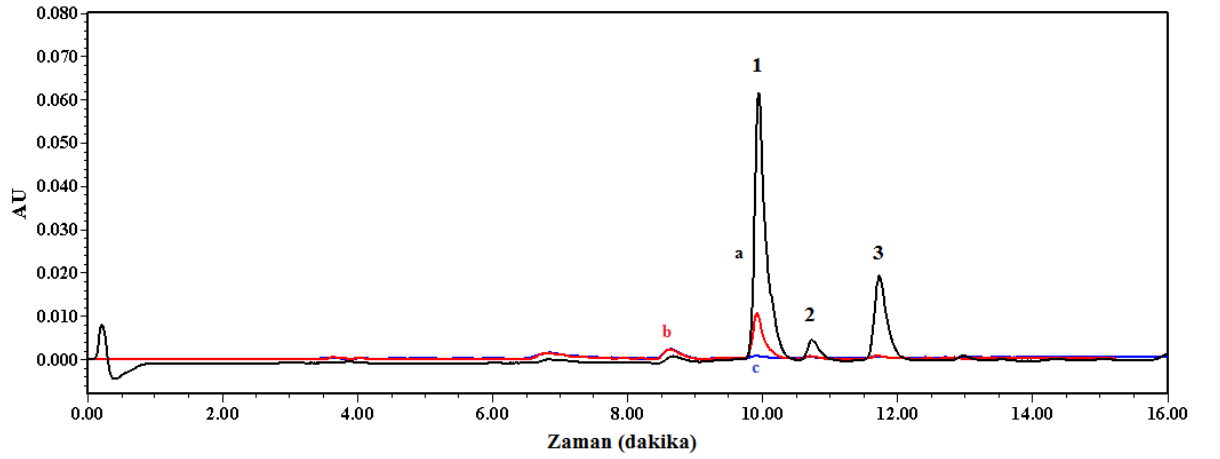
2×10^{-4} M FL, MR ve KUE'den oluşan ACN ortamında hazırlanmış karışım çözeltisinden 1,5 mL alınarak 1 mL'lik SPE kartuş içindeki 50 mg 1:4:20 KUE-MIP'e $0,3 \text{ mL dak}^{-1}$ hızla yüklenmiştir. Yükleme öncesi ve sonrası kromatogramları Şekil 4.27'de gösterilmiştir.



Şekil 4.27: FL, MR, KUE'den oluşan sentetik karışım çözeltisinin KUE-MISPE yükleme öncesi (a) ve sonrası (b) kromatogramları.

1: FL, 2: MR, 3:KUE; Belirleme dalga boyu: 280 nm.

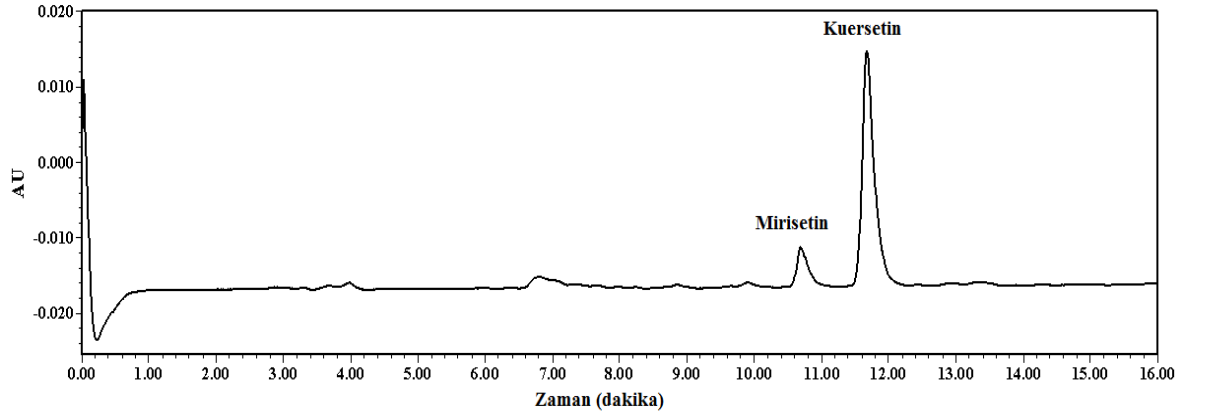
Şekil 4.27'den de görüldüğü gibi floridzin, flavonoidlerin dihidrokalkon sınıfından olduğu için polimerde non-spesifik olarak tutulmuştur, mirisetin ise kuersetin gibi flavonol sınıfından olduğu için polimer tarafından daha fazla adsorplanmıştır. Non-spesifik tutulanları polimerden uzaklaştırmak için kartuş çeşitli çözücü sistemleriyle yıkanmıştır. Şekil 4.28'de yıkama çözeltilerine ait kromatogramlar görülmektedir.



Şekil 4.28: FL, MR, KUE'den oluşan sentetik karışım çözeltisinin KUE-MISPE yıkama kromatogramları.

a: Yıkama 1 {0,5 mL ACN}, b: Yıkama 3 {2 mL ACN: H₂O (20:80, v/v)}; c: Yıkama 5 {2 mL ACN: H₂O (20:80, v/v)}; Belirleme dalga boyu: 280 nm.

Şekil 4.28'de görüldüğü gibi kuersetin dışındaki diğer bileşenler yıkama çözeltileriyle büyük oranda polimerden uzaklaşmıştır. MISPE'nin son aşaması olan elüsyon aşamasında 2 mL MeOH:HAc (4:1, v/v) karışımı 0,5 mL dak⁻¹ akış hızıyla kartuştan geçirilmiştir. Şekil 4.29'da elüsyon kromatogramı görülmektedir.



Şekil 4.29: FL, MR, KUE'den oluşan sentetik karışım çözeltisinin KUE-MISPE elüsyon kromatogramı.

Belirleme dalga boyu: 280 nm.

Yukarıdaki elüsyon kromatogramından da görüldüğü gibi KUE-MIP ile gerçekleştirilen MISPE uygulamasında FL ve MR varlığında KUE ve az miktarda MR geri kazanımı sağlanmıştır. Tablo 4.18'de sentetik karışım çözeltisiyle gerçekleştirilen KUE-MISPE uygulamasının için sonuçları görülmektedir.

Tablo 4.18: FL, MR ve KUE'den oluşan sentetik karışım çözeltisi için KUE-MISPE sonuçları.

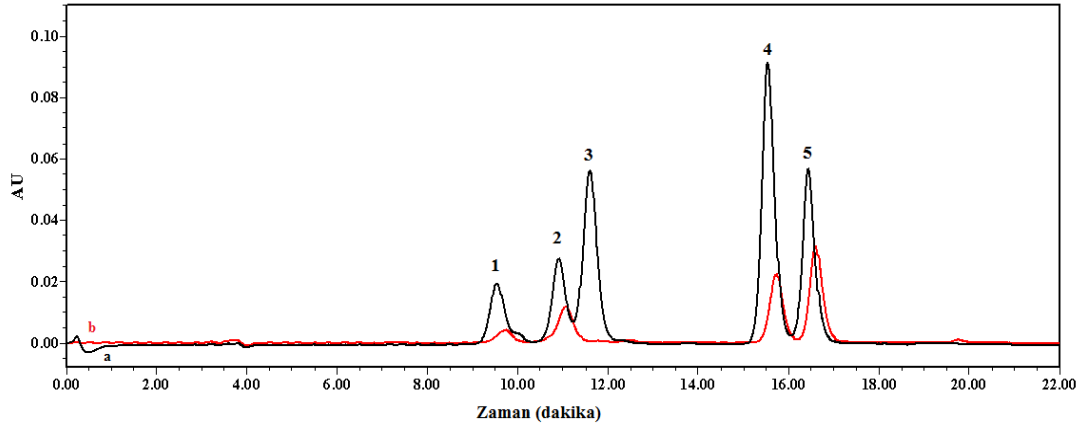
| Aşamalar | KUE miktarı (mmol) | MR miktarı (mmol) |
|----------------|---|---|
| Yüklenen | $3,30 \times 10^{-4}$ | $2,52 \times 10^{-4}$ |
| Tutulan | $2,96 \times 10^{-4}$ | $2,50 \times 10^{-4}$ |
| Geri kazanılan | $2,00 \times 10^{-4}$ (% 68) ^a | $0,65 \times 10^{-4}$ (% 30) ^a |

^a: % Geri kazanım.

Tablo 4.18'den de görüldüğü gibi hazırlanan KUE-MIP ile bitkisel örneklerde bulunma olasılığı olan fenolik bileşiklerin dihidrokalkon sınıfına ait FL ve aynı gruptan MR varlığında KUE % 68 verimle geri kazanılmıştır. Aynı gruptan olan MR ise % 30 oranında karışımda kalmıştır. Bu da MIP'ler için beklenen ve diğer çalışmalarda da karşılaşılan bir durumdur (Pakade ve diğ., 2013).

4.7.3. 4-Hidroksibenzoik Asit, Vanilik asit, *p*-Kumarik Asit, Kafeik Asit ve Ferulik Asit İçeren Sentetik Karışım için KA-MISPE Uygulaması

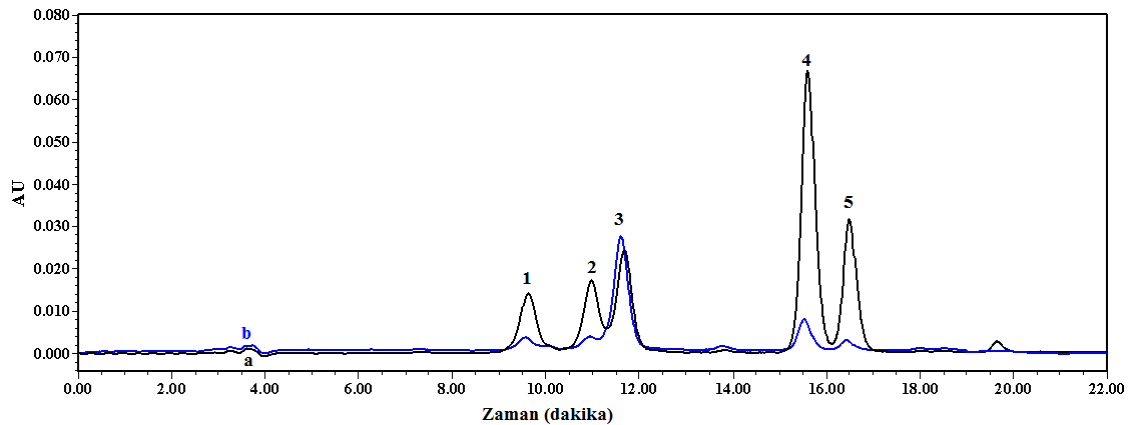
3×10^{-4} M 4-HBA, VA, KA, *p*-KUA ve FA' dan oluşan ACN ortamında hazırlanmış karışım çözeltisinden 1,5 mL alınarak 1 mL'lik SPE kartuş içindeki 50 mg 1:4:16 KA-MIP'e 0,3 mL dak⁻¹ hızla yüklenmiştir. Yükleme öncesi ve sonrası kromatogramları Şekil 4.30'da gösterilmiştir.



Şekil 4.30: 4-HBA, VA, KA, *p*-KUA ve FA'dan oluşan sentetik karışım çözeltisinin KAMISPE yüklenme öncesi (a) ve sonrası (b) kromatogramları.

1: VA, 2: KAT, 3: KA, 4: *p*-KUA, 5: FA; Belirleme dalga boyu: 280 nm.

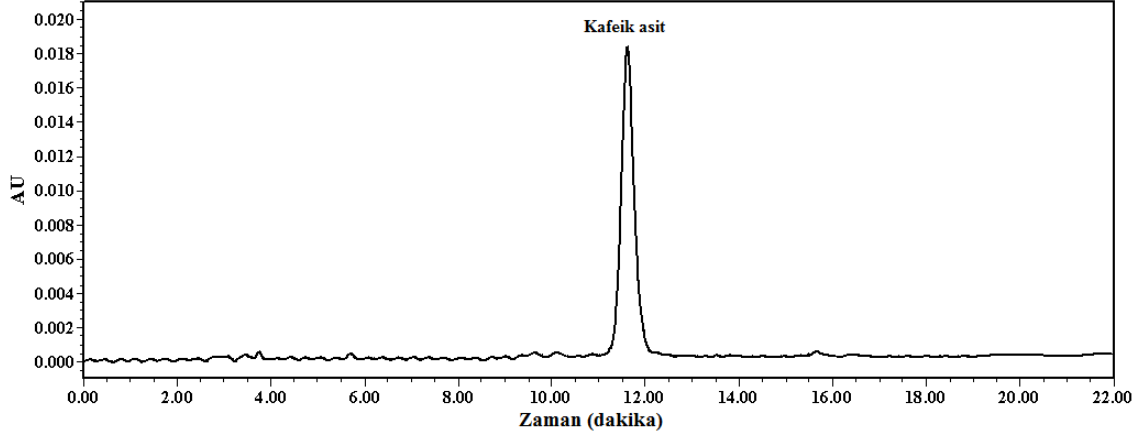
Şekil 4.30'dan da görüldüğü gibi kartuşta en fazla KA olmak üzere diğer fenolik bileşikler de tutulmuştur. Bu bileşiklerden *p*-KUA ve FA'nın KA gibi hidroksisinnamik asit yapısında olması, KAT'in flavonoidlerin flavanol sınıfından ancak 3,4-dihidroksifenil yapısının KA ile ortak olması, 4-HBA ve VA'nın ise hidroksibenzoik asit yapısında ve küçük moleküller olması nedeniyle polimerde adsorplandığı düşünülmüştür. Ancak bu tutulmaların kalıp molekül olan KA'ye göre daha zayıf olması beklendiğinden uygun çözücü sistemleriyle bu bileşiklerin MIP'den yıkama ile uzaklaştırılması amaçlanmıştır. Şekil 4.31'de yıkama çözeltilerine ait kromatogramlar görülmektedir.



Şekil 4.31: 4-HBA, VA, KA, *p*-KUA ve FA'dan oluşan sentetik karışım çözeltisinin KAMISPE yıkama kromatogramları.

a: Yıkama 1 (2,5 mL ACN); b: Yıkama 2 (0,5 mL ACN); Belirleme dalga boyu: 280 nm.

Şekil 4.31'den de görüldüğü gibi yıkama adımlarıyla bir miktar KA da MIP'den uzaklaşmıştır. Yıkama aşamasından sonra polimerde tutulmuş olan KA, MeOH:HAc (4:1, v/v) çözücü karışımıyla polimerden geri kazanılmıştır. Şekil 4.32'de elüsyon kromatogramı görülmektedir.



Şekil 4.32: 4-HBA, VA, KA, *p*-KUA ve FA'dan oluşan sentetik karışım çözeltisinin KA-MISPE elüsyon kromatogramı.

Belirleme dalga boyu: 280 nm.

Şekil 4.32'den de görüldüğü gibi yıkama aşamasında diğer bileşikler kartuştan uzaklaştırılmış ve elüsyon aşamasında KA geri kazanımı biraz düşük verimle (% 49) sağlanmıştır. Tablo 4.19'da sentetik karışım için MISPE sonuçları görülmektedir.

Tablo 4.19: 4-HBA, VA, KA, *p*-KUA ve FA'dan oluşan sentetik karışım çözeltisi için KA-MISPE sonuçları.

| Aşamalar | KA miktarı (mmol) |
|----------------|---|
| Yüklenen | $2,86 \times 10^{-4}$ |
| Tutulan | $2,84 \times 10^{-4}$ |
| Geri kazanılan | $1,40 \times 10^{-4}$ (% 49) ^a |

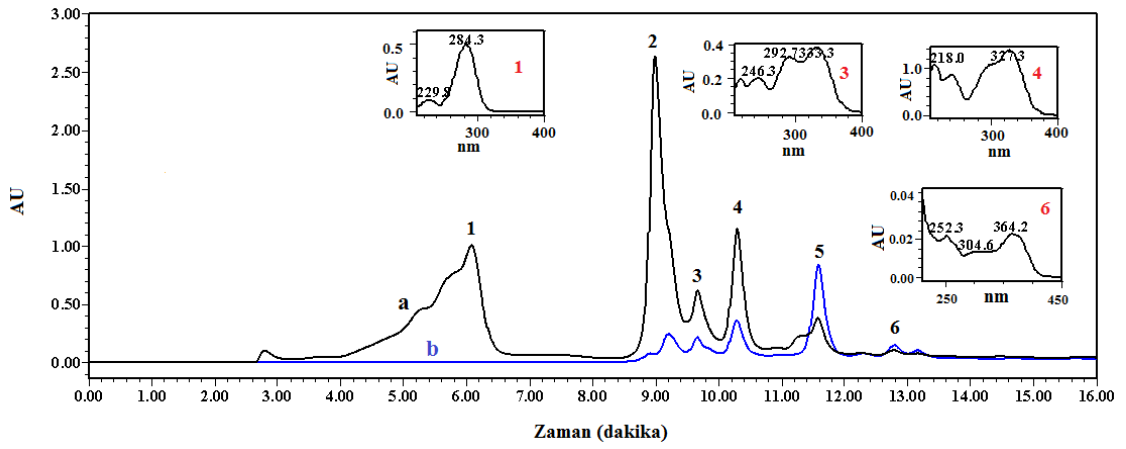
^a: % Geri kazanım.

p-KUA ve FA'in KA gibi hidroksisinnamik asit yapısında olması, KAT'in flavonoidlerin flavanol sınıfından ancak 3,4-dihidroksifenil yapısının KA ile ortak olması, 4-HBA ve VA'in ise hidroksibenzoik asit yapısında ve küçük moleküller olması nedeniyle polimerde tutulduklarından KA'in bunlar yanında saf olarak geri kazanımında verim % 50'nin altında kalmıştır.

4.8. DOĞAL ÖRNEKLERLE MOLEKÜLER BASKILI KATI-FAZ EKSTRAKSİYONU UYGULAMALARI

4.8.1. Isırgan Otu Ekstraktı Hidrolizatı için KUE-MISPE Uygulaması

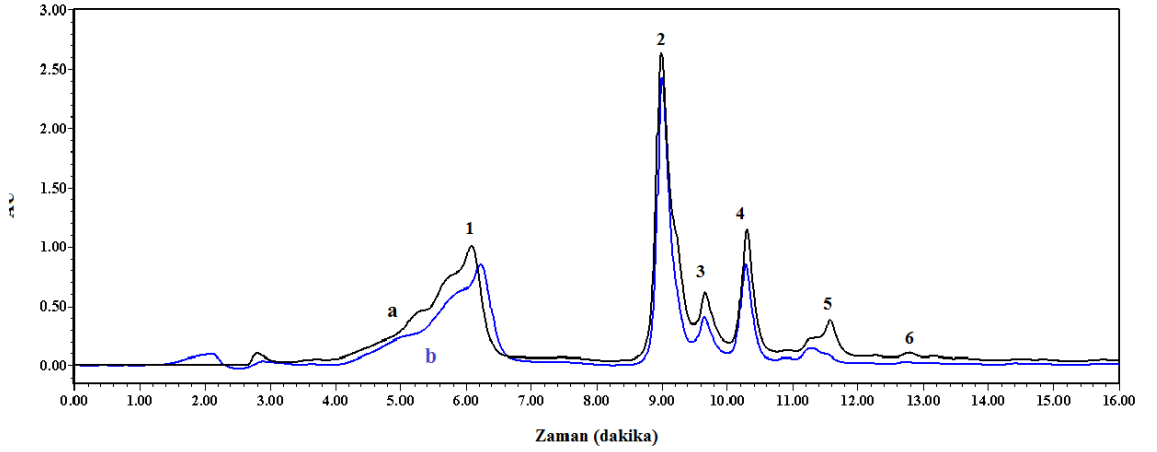
Buharlaştırıldıktan sonra ACN: DMSO (98: 2, v/v)'de çözülmüş ve nemi giderilmiş ısırgan otu ekstrakt hidrolizatından 2 mL alınıp 3 mL'lik SPE kartuş içindeki 100 mg KUE-MIP'e 0,3 mL dak⁻¹ hızla yüklendi. Hidrolizatın kromatogramı Şekil 4.33'de görülmektedir. Şekil 4.34'de ise hidrolizatın yükleme öncesi ve sonrası kromatogramları karşılaştırılmaktadır.



Şekil 4.33: Isırgan ekstraktı hidrolizatının 290 nm (a) ve 360 nm (b)'de kromatogramları.

1: Kateşin türevi; 2: Klorojenik asit; 3,4: Kafeik asit türevleri; 5: Kuersetin; 6: Kamferol.

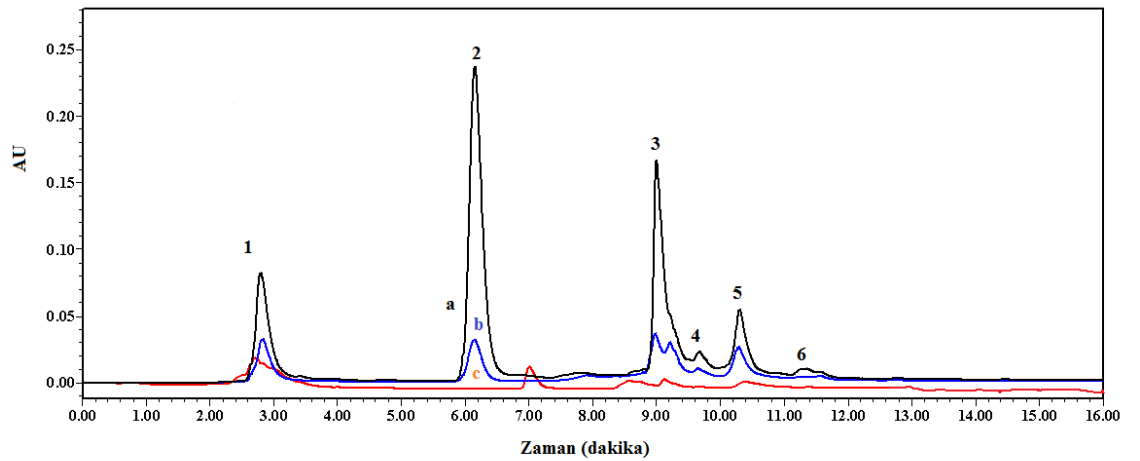
Şekil 4.33'te de görüldüğü gibi ısırgan ekstraktı hidrolizatında kateşin türevi, klorojenik asit, kafeik asit türevleri, kuersetin ve kamferol bulunmaktadır. Kromatogramda görülen 1, 3 ve 4. piklerin hangi bileşiklere ait olduğuna PDA spektrumları ve literatür bilgilerinden yararlanılarak karar verilmiştir (Sakakibara ve diğ. 2003; Zhou ve diğ., 2014). 360 nm'de kuersetin ve türevlerinin absorpsiyon maksimumu olduğu, 290 nm ise hidrolizat içindeki diğer bileşenlerin de absorpladığı dalgaboyu olduğundan, kromatogramlar bu iki dalgaboyunda verilmiştir. Tüm kromatogramlar 290 nm'ye göre yorumlanarak gerekli hesaplamalar yapılmıştır.



Şekil 4.34: Isırgan otu ekstraktı hidrolizatının KUE-MISPE kartuşa yükleme öncesi (a) ve sonrası (b) kromatogramları (290 nm).

Belirleme dalga boyu: 290 nm.

Şekil 4.34'te görüldüğü gibi kolonda en fazla tutulan kuersetinin yanında diğer bileşenler de bir miktar tutulmuştur. Kuersetin dışındaki bileşenler de fenolik yapıya sahip olduklarından yapılarındaki $-OH$ gruplarıyla kalıba girmeden polimerle hidrojen bağı yapma yeteneğinde olmaları ve ayrıca polimerin heterojen bölgeleriyle spesifik olmayan iyonik etkileşimler gösterebilmeleri olasılığı nedeniyle bu tutulma, beklenen bir durumdur. Kuersetin dışında non-spesifik tutulan diğer bileşenleri uygun çözücü sistemleriyle yıkayarak kartuştan uzaklaştırmak hedeflenmiştir. Bunun için kartuş çeşitli çözücülerle yıkanmıştır. Şekil 4.35'te yıkama çözeltilerine ait kromatogramlar verilmiştir.

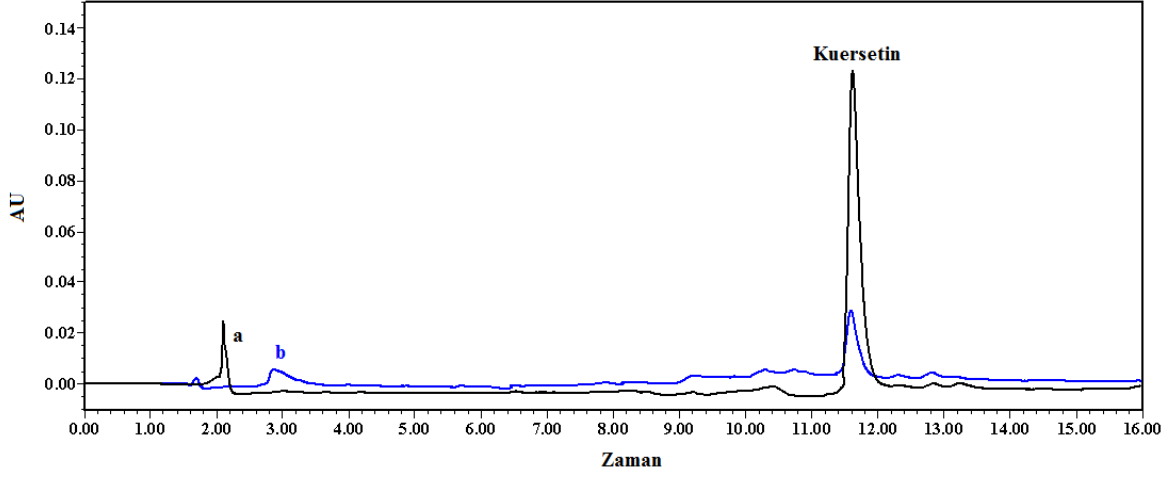


Şekil 4.35: Isırgan otu ekstraktı hidrolizatının KUE-MISPE yıkama kromatogramları.

a: Yıkama 2: {10 mL ACN: H₂O (20:80, v/v)} ; b: Yıkama 3 {10 mL ACN: H₂O (40:60, v/v)}; c: Yıkama 4 {10 mL H₂O}.

Belirleme dalga boyu: 290 nm.

Elüsyon aşaması ise önce 2 mL ve sonra 3 mL MeOH:HAc (4:1, v/v) karışımının iki basamakta 0,5 mL dak⁻¹ akış hızıyla kartuştan geçirilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.36'da elüsyon kromatogramları görülmektedir.



Şekil 4.36: Isırgan otu ekstraktı hidrolizatının KUE-MISPE elüsyon kromatogramları.

a: Elüsyon 1; b: Elüsyon 2

Belirleme dalga boyu: 290 nm.

Şekil 4.35 ve 4.36'dan da görüldüğü gibi yıkama aşamalarıyla KUE dışındaki bileşenler pratikçe tamamen uzaklaştırılmış ve kuersetin ısırgan otu ekstraktı hidrolizatından elüsyon sonunda KUE-MIP ile toplam % 87 oranında geri kazanılmıştır. Tablo 4.20'de ısırgan otu için MISPE sonuçları görülmektedir.

Tablo 4.20: Isırgan otu ekstraktı hidrolizatı için KUE-MISPE sonuçları.

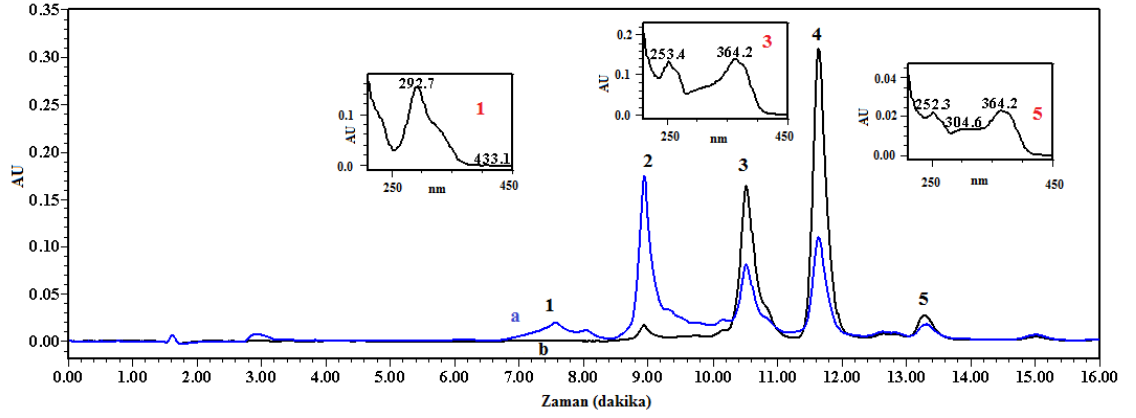
| Aşamalar | KUE miktarı (mmol) |
|-----------|---|
| Yüklenen | 6,63x10 ⁻⁴ |
| Tutulan | 6,21x10 ⁻⁴ |
| Elüsyon1 | 4,09x10 ⁻⁴ (% 66) ^a |
| Elüsyon 2 | 1,30x10 ⁻⁴ (% 21) ^a |

^a: % Geri kazanım

4.8.2. Kırmızı Soğan Kabuğu Ekstraktı için KUE-MISPE Uygulaması

Buharlaştırıldıktan sonra ACN:DMSO (98:2, v/v)'de çözülmüş ve nemi giderilmiş kırmızı soğan kabuğu ekstraktından 1,3 mL alınıp 3 mL'lik SPE kartuş içindeki 100 mg KUE-MIP'e 0,3 mL dak⁻¹ hızla yüklendi. Şekil 4.37'de kırmızı soğan kabuğu

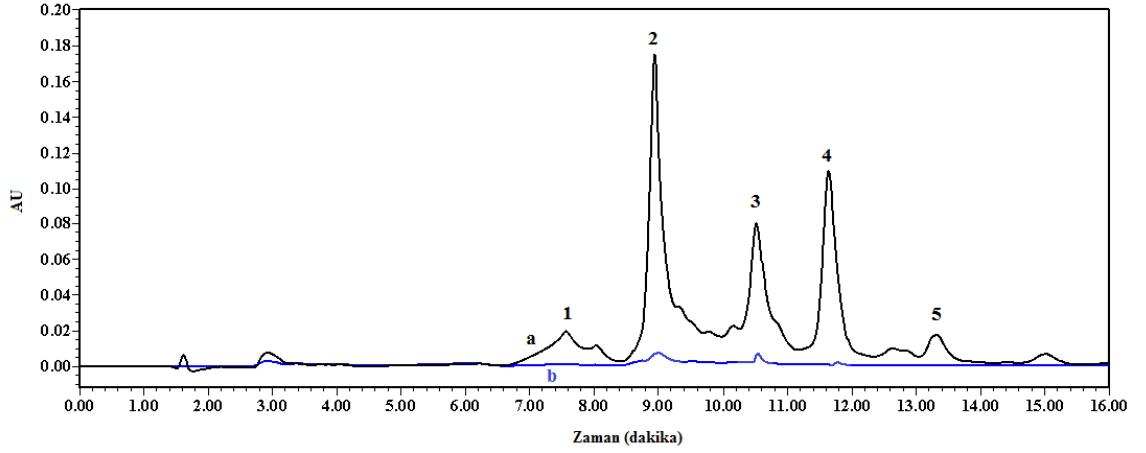
ekstraktının kromatogramı görülmektedir. Şekil 4.38’de ekstraktın yükleme öncesi ve sonrası kromatogramları karşılaştırılmaktadır.



Şekil 4.37: Kırmızı soğan kabuğu ekstraktının 290 nm (a) ve 360 nm (b) dalga boylarındaki kromatogramları.

1: Hidroksibenzoik asit türevi; 2: Klorojenik asit; 3: Kuersetin glikoziti; 4: Kuersetin; 5: Kamferol.

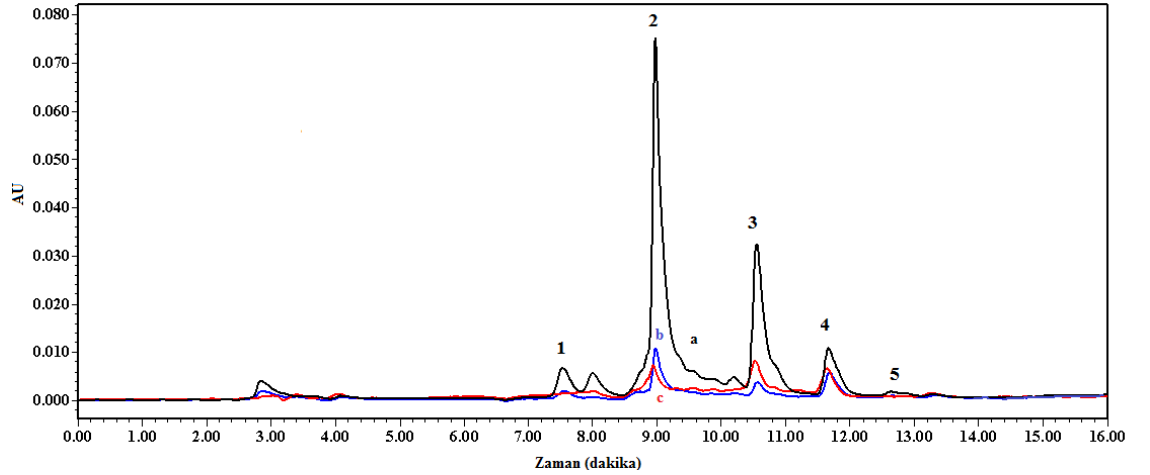
Şekil 4.37’de görüldüğü gibi kırmızı soğan kabuğu ekstraktında hidroksibenzoik asit türevi, klorojenik asit, kuersetin glikoziti, kuersetin ve kamferol (KAM) bulunmaktadır. Kromatogramda görülen 1. ve 3. piklerin hangi bileşiklere ait olduğuna PDA spektrumları ve literatür bilgilerinden yararlanılarak karar verilmiştir (Sakakibara ve diğ. 2003). 360 nm’de kuersetin ve türevlerinin absorpsiyon maksimumu olduğu, 290 nm ise ekstrakt içindeki diğer bileşenlerin de absorpladığı dalgaboyu olduğundan, kromatogramlar bu iki dalgaboyunda verilmiştir. Tüm kromatogramlar 290 nm’ye göre yorumlanarak gerekli hesaplamalar yapılmıştır.



Şekil 4.38: Kırmızı soğan kabuğu ekstraktının KUE-MISPE yüklemesi öncesi (a) ve sonrası (b) kromatogramları.

Belirleme dalga boyu: 290 nm..

Şekil 4.38’te görüldüğü gibi kolonda kuersetinle birlikte diğer bileşenler de tutulmuştur. Kuersetin dışındaki bileşenler de fenolik yapıya sahip olduklarından yapılarındaki –OH gruplarıyla kalıba girmeden polimerle hidrojen bağı yapma yeteneğinde olmaları ve ayrıca polimerin heterojen bölgeleriyle spesifik olmayan iyonik etkileşimler gösterebilmeleri olasılığı nedeniyle bu tutulma, beklenen bir durumdur. Kuersetin dışında non-spesifik tutulan diğer bileşenleri uygun çözücü sistemleriyle yıkayarak kartuştan uzaklaştırmak hedeflenmiştir. Yıkama işlemi 6 basamakta tamamlanmıştır. Şekil 4.39’da 1., 3. ve 5. yıkama çözeltilerine ait kromatogramlar görülmektedir.

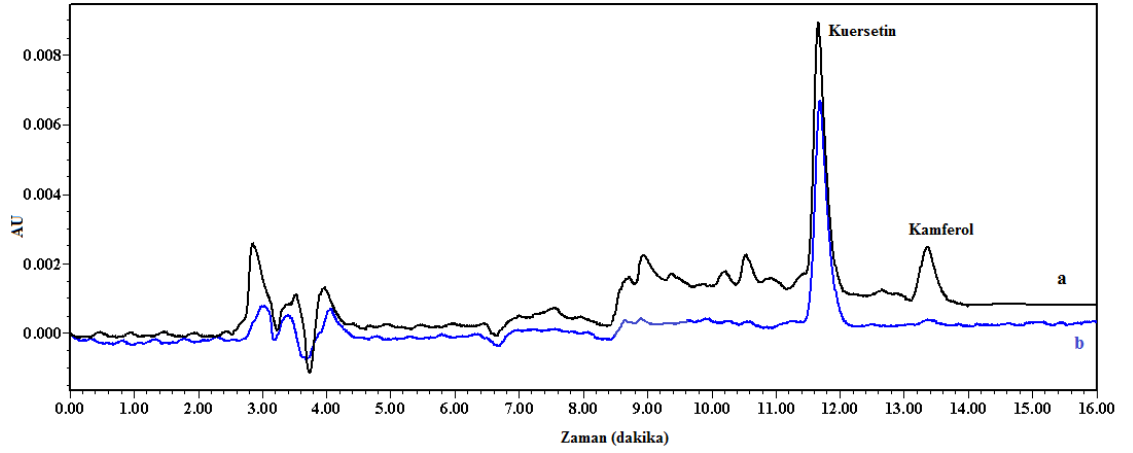


Şekil 4.39: Kırmızı soğan kabuğu ekstraktının KUE-MISPE yıkama kromatogramları.

a: Yıkama 1 (5 mL ACN) ; b: Yıkama 3 (4 mL H₂O); c: yıkama 5: {4 mL ACN: H₂O} (50:50, v/v)}.

Elüsyon aşaması ise sırasıyla 8 mL ve 3 mL MeOH:HAc (4:1, v/v) karışımının iki basamakta $0,5 \text{ mL dak}^{-1}$ akış hızıyla kartuştan geçirilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.40'da elüsyon kromatogramları görülmektedir.

Şekil 4.39 ve 4.40'dan da görüldüğü gibi yıkama aşamalarıyla KUE ve KAM dışındaki bileşenler pratikçe tamamen uzaklaştırılmış ve kırmızı soğan kabuğu ekstraktından kuersetin toplam % 58 oranında geri kazanılmıştır. Kamferol aynı flavonoid sınıfından olduğu dolayısıyla kimyasal yapısı KUE'ye çok benzediğinden KUE ile birlikte % 56 oranında elüe olmuştur. Tablo 4.21'de kırmızı soğan kabuğu ekstraktı için MISPE sonuçları görülmektedir.



Şekil 4.40: Kırmızı soğan kabuğu ekstraktının KUE-MISPE elüsyon kromatogramları.

a: Elüsyon 1; b: Elüsyon 2; Belirleme dalga boyu: 290 nm.

Şekil 4.40'ta görüldüğü gibi hidroksibenzoik asit türevi, klorojenik asit, kuersetin glikoziti polimerden yıkama adımlarıyla uzaklaştırılmış, kuersetin elüsyon sonunda polimerden geri kazanılmıştır. Sadece flavonol sınıfından olduğu ve kimyasal formülü kuersetine çok benzediğinden kamferol, kuersetinin yanında elüe olmuştur. Tablo 4.21'de kırmızı soğan kabuğu ekstraktı için MISPE sonuçları görülmektedir.

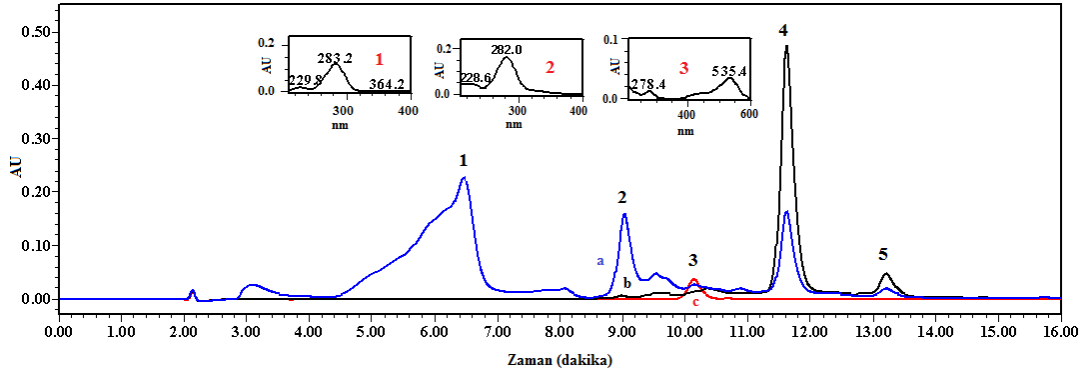
Tablo 4.21: Kırmızı soğan kabuğu ekstraktı için KUE-MISPE sonuçları.

| Aşamalar | KUE miktarı (mmol) | KAM miktarı (mmol) |
|-----------------------------|---|---|
| Yüklenen | $2,85 \times 10^{-4}$ | $3,85 \times 10^{-5}$ |
| Tutulan | $2,80 \times 10^{-4}$ | $3,85 \times 10^{-5}$ |
| Elüsyon 1 Geri kazanılan | $1,22 \times 10^{-4}$ (% 43) ^a | $2,15 \times 10^{-5}$ (% 56) ^a |
| Elüsyon 2 | $0,44 \times 10^{-5}$ (% 15) ^a | - |

^a: % Geri Kazanım.

4.8.3. Kırmızı Soğan Kabuğu Ekstraktı Hidrolizatı için KUE-MISPE Uygulaması

Buharlaştırıldıktan sonra ACN:DMSO (98:2, v/v)'de çözülmüş ve nemi giderilmiş kırmızı soğan kabuğu ekstraktı hidrolizatından 1,3 mL alınıp 3 mL'lik SPE kartuş içindeki 100 mg KUE-MIP'e 0,3 mL dak⁻¹ hızla yüklendi. Şekil 4.41'de kırmızı soğan kabuğu ekstraktı hidrolizatının kromatogramı görülmektedir. Şekil 4.42'de hidrolizatın yükleme öncesi ve sonrası kromatogramları karşılaştırılmaktadır.

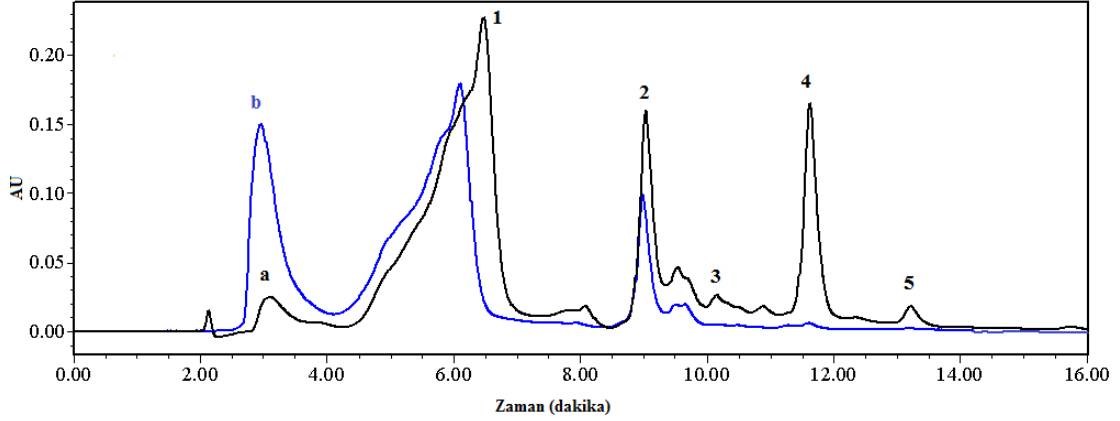


Şekil 4.41: Kırmızı soğan kabuğu ekstraktı hidrolizatının 290 nm (a), 360 nm (b) ve 520 nm (c) 'de kromatogramları.

1 ve 2: Katesin türevi; 3: Antosiyanidin türevi; 4: Kuersetin; 5: Kamferol.

Şekil 4.41'de görüldüğü gibi kırmızı soğan kabuğu ekstrakt hidrolizatında katesin türevleri, antosiyanin türevi, kuersetin ve kamferol bulunmaktadır. Kromatogramda görülen 1. ve 2. piklerin hangi bileşiklere ait olduğuna PDA spektrumları ve literatür bilgilerinden yararlanılarak karar verilmiştir (Sakakibara ve diğ. 2003). 360 nm'de kuersetin ve türevlerinin, 520 nm'de antosiyanidinlerin absorpsiyon maksimumları olduğu ve 290 nm ise hidrolizatın içindeki diğer bileşenlerin absorpladığı dalgaboyu

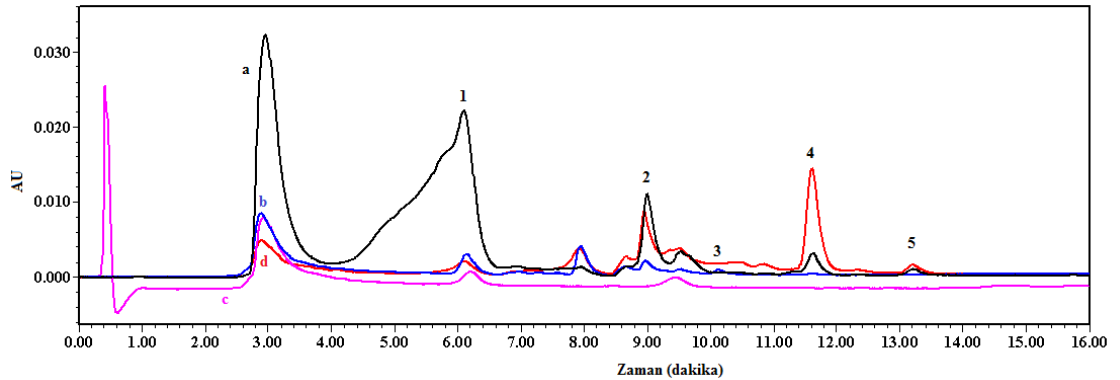
olduğundan, kromatogramlar bu üç dalgaboyunda verilmiştir. Tüm kromatogramlar 290 nm'ye göre yorumlanarak gerekli hesaplamalar yapılmıştır. Şekil 4.42'de soğan kabuğu ekstrakt hidrolizatının kartuşa yüklemeden önceki ve sonraki kromatogramları görülmektedir.



Şekil 4.42: Kırmızı soğan kabuğu ekstraktı hidrolizatının KUE-MISPE yüklenme öncesi (a) ve sonrası (b) kromatogramları.

Belirleme dalga boyu: 290 nm.

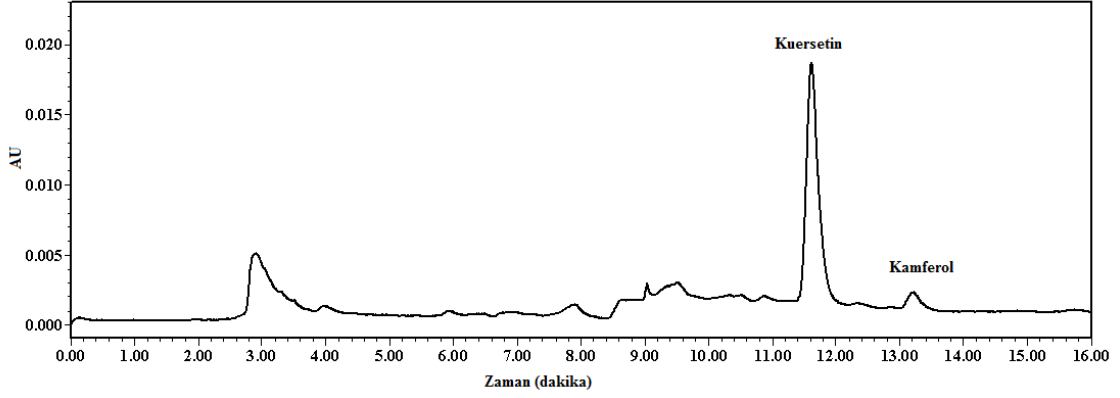
Şekil 4.42'de görüldüğü gibi kolonda kuersetinle birlikte diğer bileşenler de bir miktar tutulmuştur. Kuersetin dışındaki bileşenler de fenolik yapıya sahip olduklarından bu tutulma, beklenen bir durumdur. Kuersetin dışında non-spesifik tutulan diğer bileşenleri uygun çözücü sistemleriyle yıkayarak kartuştan uzaklaştırmak hedeflenmiştir. Yıkama işlemi 6 basamakta tamamlanmıştır. Şekil 4.43'te 1., 2., 4. ve 5. yıkama çözeltilerine ait kromatogramlar görülmektedir.



Şekil 4.43: Kırmızı soğan kabuğu ekstraktı hidrolizatının KUE-MISPE yıkama kromatogramları.

a: yıkama 1 (6 mL ACN); b: Yıkama 2 (8 mL H₂O); c:yıkama 4 [4 mL ACN:H₂O (40:60, v/v)]; d: Yıkama 5 [1 mL ACN:H₂O, (50:50, v/v)]. Belirleme dalga boyu: 290 nm.

Şekil 4.43'te görüldüğü gibi hidroksibenzoik asit ve antosiyanidin türevleri, klorojenik asit ve kuersetin glikoziti MIP'den yıkama adımlarıyla uzaklaştırılmıştır. Kuersetin ve aynı flavonoid sınıftan olan kamferol, 8 mL MeOH:HAc (4:1, v/v) elüsyon çözeltisiyle birlikte ve yakın yüzdelerle geri kazanılmıştır (Şekil 4.44). Tablo 4.22'de kırmızı soğan kabuğu ekstraktı hidrolizatı için MISPE sonuçları görülmektedir.



Şekil 4.44: Kırmızı soğan kabuğu ekstraktı hidrolizatı KUE-MISPE elüsyon kromatogramı.

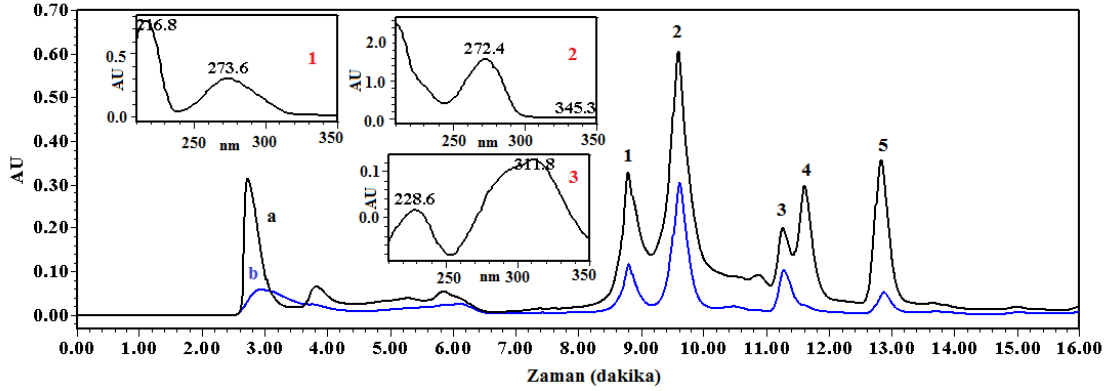
Tablo 4.22: Kırmızı soğan kabuğu ekstraktı hidrolizatı için KUE-MISPE sonuçları.

| Aşamalar | KUE miktarı (mmol) | KAM miktarı (mmol) |
|----------------|---|---|
| Yüklenen | $3,41 \times 10^{-4}$ | $3,41 \times 10^{-5}$ |
| Tutulan | $3,32 \times 10^{-4}$ | $3,32 \times 10^{-5}$ |
| Geri kazanılan | $2,84 \times 10^{-4}$ (% 86) ^a | $2,73 \times 10^{-5}$ (% 82) ^a |

^a: % Geri kazanım

4.8.4. Siyah Çay Ekstraktı Hidrolizatı için KUE-MISPE Uygulaması

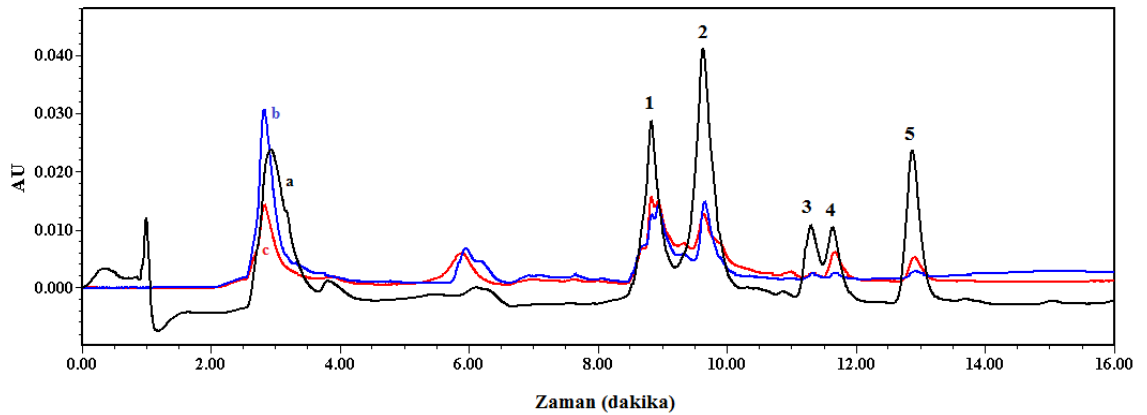
Buharlaştırıldıktan sonra ACN:DMSO (98:2, v/v)'de çözülmüş ve nemi giderilmiş siyah çay ekstraktı hidrolizatından 1,3 mL alınıp 3 mL'lik SPE kartuş içindeki 100 mg KUE-MIP'e 0,3 mL dak⁻¹ hızla yüklendi. Şekil 4.45'te hidrolizatın yükleme öncesi ve sonrası kromatogramları karşılaştırılmaktadır.



Şekil 4.45: Siyah çay ekstraktı hidrolizatının KUE-MISPE yükleme öncesi (a) ve sonrası (b) kromatogramları.

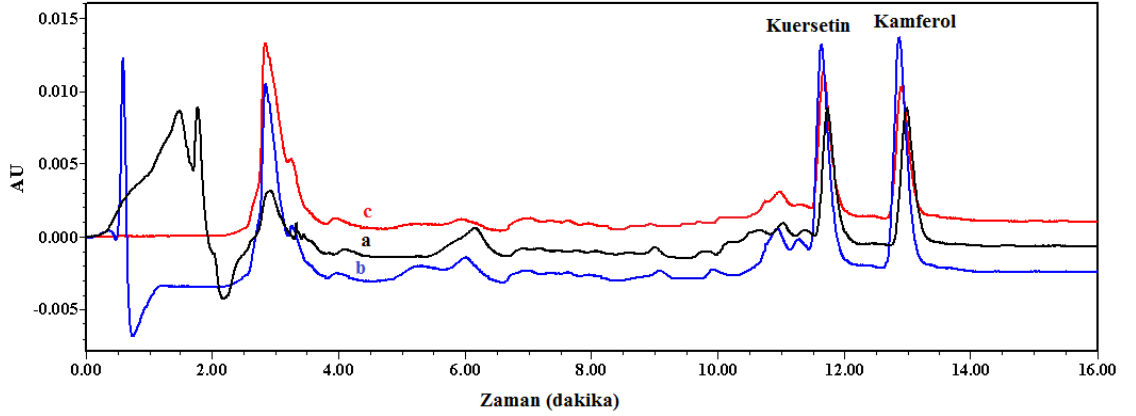
1, 2 ve 3: Kateşin türevleri, 4: Kuersetin, 5: Kamferol; Belirleme dalga boyu: 290 nm.

Şekilden de görüldüğü gibi siyah çay ekstraktı hidrolizatında kateşin türevleri, kuersetin ve kamferol bulunmaktadır. Kromatogramda görülen 1., 2. ve 3. piklerin hangi bileşiklere ait olduğuna PDA spektrumları ve literatür bilgilerinden yararlanılarak karar verilmiştir (Sakakibara ve diğ. 2003; de Rijke ve diğ., 2006). Hidrolizat kartuşa yüklenince en fazla kuersetin ve kamferol olmak üzere diğer bileşenler de polimer tarafından bir miktar adsorplanmıştır. Ancak kuersetin ve kamferol dışındaki bileşiklerin adsorpsiyonunun non-spesifik olduğu düşünüldüğü için bu bileşenlerin yıkama adımlarıyla polimerden uzaklaştırılması hedeflenmiştir. Bunun için polimer 3 basamakta yıkanmıştır. Şekil 4.46'da yıkama adımlarına ait kromatogramlar görülmektedir. Şekil 4.47'de ise MeOH:HAc (4:1, v/v) karışımıyla gerçekleştirilen elüsyon kromatogramları görülmektedir.



Şekil 4.46: Siyah çay ekstraktı hidrolizatının KUE-MISPE yıkama kromatogramları.

a: Yıkama 1 {4 mL ACN}, b: Yıkama 2 {4 mL H₂O}, c: Yıkama 3 {8 mL ACN:H₂O (40:60, v/v)}.



Şekil 4.47: Siyah çay ekstraktı hidrolizatının KUE-MISPE elüsyon kromatogramları.

a: Elüsyon 1 {8 mL MeOH:CH₃COOH (4:1, v/v)}, b: Elüsyon 2 {3 mL MeOH:CH₃COOH (4:1, v/v)}, c: Elüsyon 3 {2 mL MeOH:CH₃COOH (4:1, v/v)}.

Şekil 4.46 ve 4.47'den görüldüğü üzere siyah çay ekstraktı hidrolizatının kateşin türevleri yıkamayla uzaklaştırılabilirken kuersetin ve kamferol birlikte geri kazanılmıştır. Tablo 4.23'te siyah çay ekstrakt hidrolizatına ait MISPE sonuçları görülmektedir.

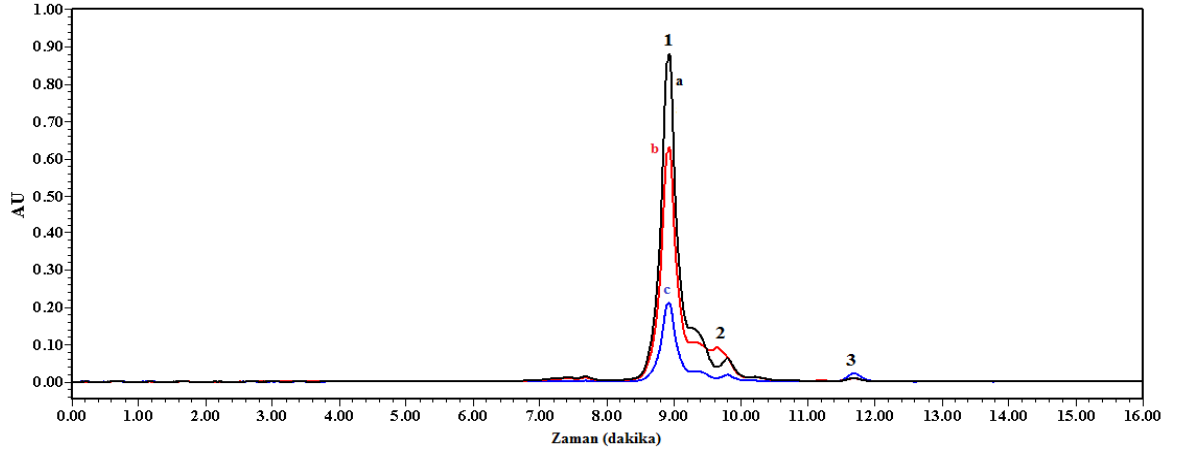
Tablo 4.23: Siyah çay ekstrakt hidrolizatı için KUE-MISPE sonuçları.

| Aşamalar | KUE miktarı (mmol) | KAM miktarı (mmol) |
|--------------------------|---|---|
| Yüklenen | 4,07x10 ⁻⁴ | 8,20x10 ⁻⁴ |
| Tutulan | 4,02x10 ⁻⁴ | 7,26x10 ⁻⁴ |
| Elüsyon 1 | 1,40x10 ⁻⁴ (% 35) ^a | 1,72x10 ⁻⁴ (% 24) ^a |
| Geri kazanılan Elüsyon 2 | 0,81x10 ⁻⁴ (% 20) ^a | 1,01x10 ⁻⁴ (% 14) ^a |
| Elüsyon 3 | 0,40x10 ⁻⁴ (% 10) ^a | 0,43x10 ⁻⁴ (% 6) ^a |

^a: % Geri kazanım

4.8.5. Yeşil Kahve Çekirdeği Ekstraktı için KUE-MISPE Uygulaması

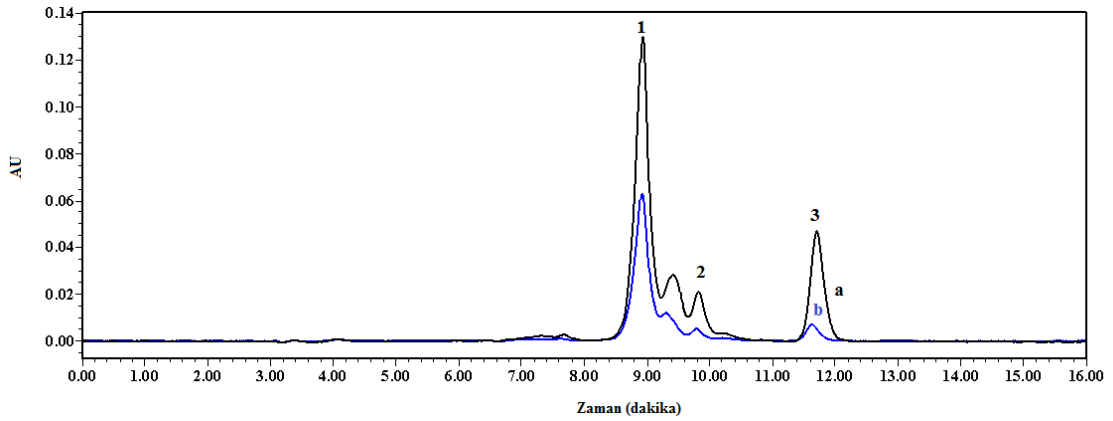
Buharlaştırıldıktan sonra ACN:DMSO (98:2, v/v)'de çözülmüş ve nemi giderilmiş yeşil kahve çekirdeği ekstraktından 6 mL alınıp 3 mL'lik SPE kartuş içindeki 100 mg KUE-MIP'e 0,3 mL dak⁻¹ hızla yüklendi. Şekil 4.48'de yeşil kahve çekirdeği ekstraktının kromatogramı görülmektedir. Şekil 4.49'da ekstraktın yükleme öncesi ve sonrası kromatogramları karşılaştırılmaktadır.



Şekil 4.48: Yeşil kahve çekirdeği ekstraktının 320 nm (a), 290 nm (b), ve 360 nm (c) 'de kromatogramları.

1: Klorojenik asit; 2: Kafein; 3: Kuersetin.

Şekil 4.49'da görüldüğü gibi yeşil kahve çekirdeği ekstraktında klorojenik asit, kafein ve çok düşük derişimde kuersetin bulunmaktadır. Hangi pikin kafein olduğuna PDA spektrumu ve literatür bilgilerinden yararlanılarak karar verilmiştir (Belay ve diğ., 2008). 360 nm'de kuersetin ve türevlerinin maksimumu olduğu, 290 nm ise ekstraktın içindeki diğer bileşenlerin de absorpladığı dalgaboyu olduğundan, kromatogramlar bu iki dalgaboyunda verilmiştir. Ancak yeşil kahve çekirdeği ekstraktı çok düşük derişimde kuersetin içerdiği ve ekstraktan kuersetinin ayrılması hedeflendiği için kuersetinin maksimum absorpsiyonuna yakın bir dalga boyu olan 360 nm'de çalışılmıştır.

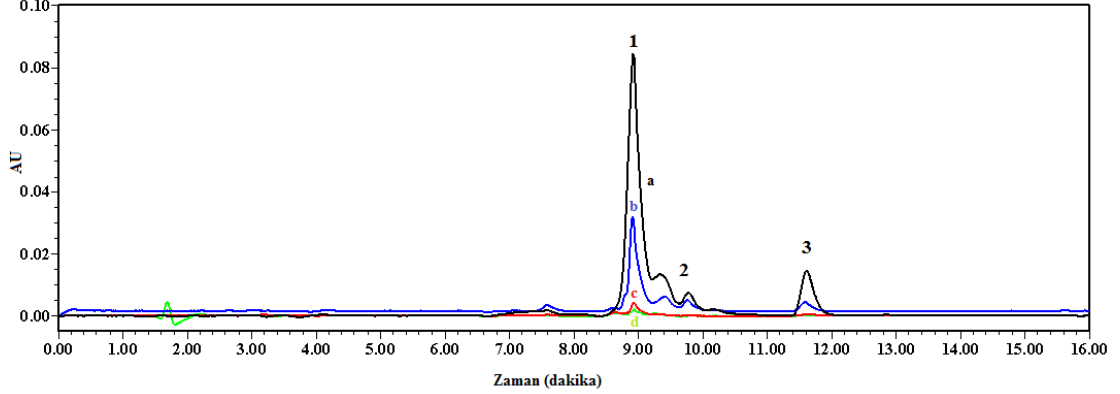


Şekil 4.49: Yeşil kahve çekirdeği ekstraktının KUE-MISPE yükleme öncesi (a) ve sonrası (b) kromatogramları.

Belirleme dalga boyu: 360 nm.

Görüldüğü gibi kolonda en fazla tutulan kuersetinin yanında diğer bileşenler de bir miktar tutulmuştur. Polimerde kuersetin dışında tutulan diğer bileşenler non-spesifik

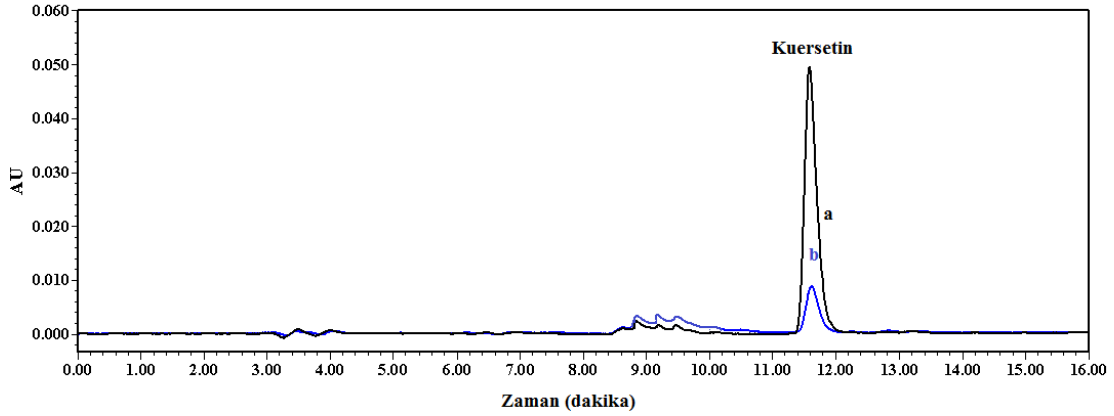
tutulduğundan bu maddeleri uygun çözücü sistemleriyle yıkayarak kartuştan çıkarmak hedeflenmiştir. Yıkama 3 basamakta tamamlanmıştır. Şekil 4.50’de yıkama 2, 3, 4 ve 7’ ye ait kromatogramlar görülmektedir.



Şekil 4.50: Yeşil kahve çekirdeği ekstraktı için KUE-MISPE yıkama kromatogramları.

a: yıkama 2 {30 mL H₂O} ; b: yıkama 3 { 10 mL ACN: Su karışımı (30:70, v/v)}; c: yıkama 4 {30 mL ACN: Su karışımı (20:80, v/v)}; d:yıkama 7 {30 mL H₂O}.

MISPE son adımı olan elüsyon işlemi her defasında 2 mL MeOH:HAc (4:1, v/v) eklenmesiyle toplam 2 basamakta (yaklaşık 0,5 mL/dak hızla) gerçekleştirildi. Şekil 4.51’de elüsyon çözeltilerine ait kromatogramlar görülmektedir.



Şekil 4.51: Yeşil kahve çekirdeği ekstraktı için KUE-MISPE elüsyon kromatogramları.

a: Elüsyon 1 {2 mL MeOH: CH₃COOH (4:1, v/v)} ; b: Elüsyon 2 { 2 mL MeOH: CH₃COOH (4:1, v/v)}.

Şekil 4.50 ve 4.51’den görüldüğü gibi yıkamaların sonucunda kuersetin dışındaki diğer bileşenlerin kartuştan uzaklaştırıldığı ve yeşil kahve çekirdeği ekstraktında çok düşük derişimde bulunan kuersetinin toplam % 65 verimle geri kazanılmıştır.

Tablo 4.24'te yeşil kahve çekirdeği ekstraktı için MISPE sonuçları görülmektedir.

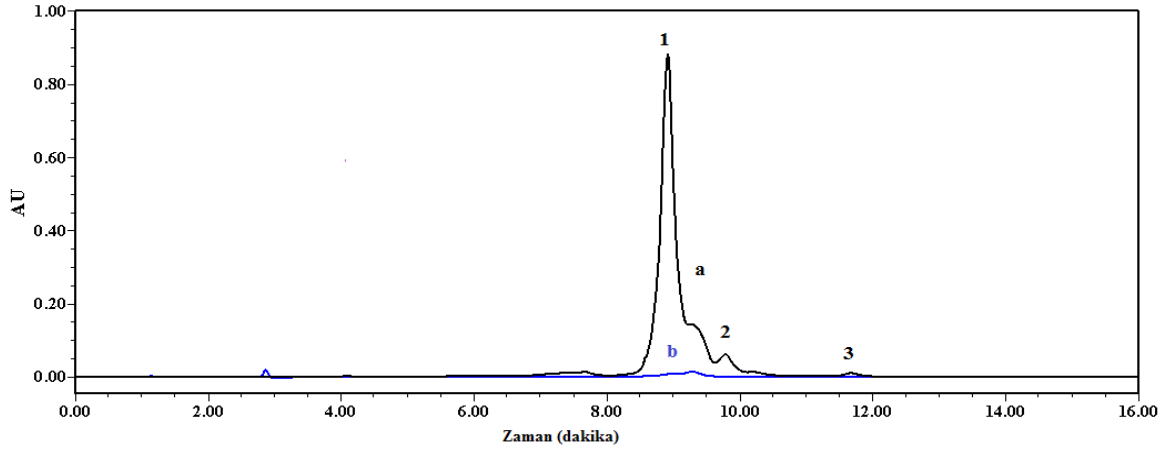
Tablo 4.24: Yeşil kahve çekirdeği ekstraktı için KUE-MISPE sonuçları.

| Aşamalar | KUE miktarı (mmol) |
|----------------------------|---|
| Yüklenen | $1,62 \times 10^{-4}$ |
| Tutulan | $1,23 \times 10^{-4}$ |
| Elüsyon1 Geri kazanılan | $0,66 \times 10^{-4}$ (% 54) ^a |
| Elüsyon 2 | $0,13 \times 10^{-4}$ (% 11) ^a |

^a: % Geri Kazanım

4.8.6. Yeşil Kahve Çekirdeği Ekstraktı için KA-MISPE Uygulaması

Buharlaştırıldıktan sonra ACN:DMSO (98:2, v/v)'de çözülmüş ve nemi giderilmiş yeşil kahve çekirdeği ekstraktı ACN ile 1:4 oranında seyreltildikten sonra 3,5 mL'si 3 mL'lik SPE kartuş içindeki 100 mg 1:4:16 KA-MIP'e 0,3 mL dak⁻¹ hızla yüklendi. Şekil 4.48'de yeşil kahve çekirdeği ekstraktının kromatogramı görülmektedir. Şekil 4.52'de ekstraktın yükleme öncesi ve sonrası kromatogramları karşılaştırılmaktadır. Klorojenik asidin maksimum adsorpsiyonuna yakın olan ve kuersetinin de dedekte edildiği 320 nm, belirleme dalga boyu olarak seçilmiştir.

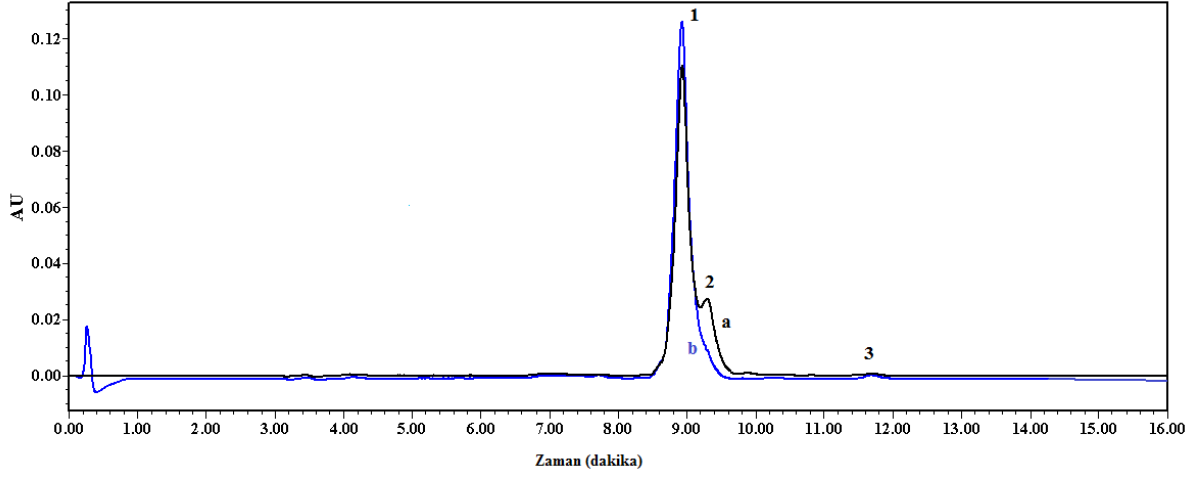


Şekil 4.52: Yeşil kahve çekirdeği ekstraktının KA-MISPE yükleme öncesi (a) ve sonrası (b) kromatogramları.

Belirleme dalga boyu: 320 nm.

Görüldüğü gibi kolonda klorojenik asidin yanında diğer bileşenler de tutulmuştur. KA-MIP'de klorojenik asit dışındaki bileşenler spesifik olarak tutulmadığından uygun

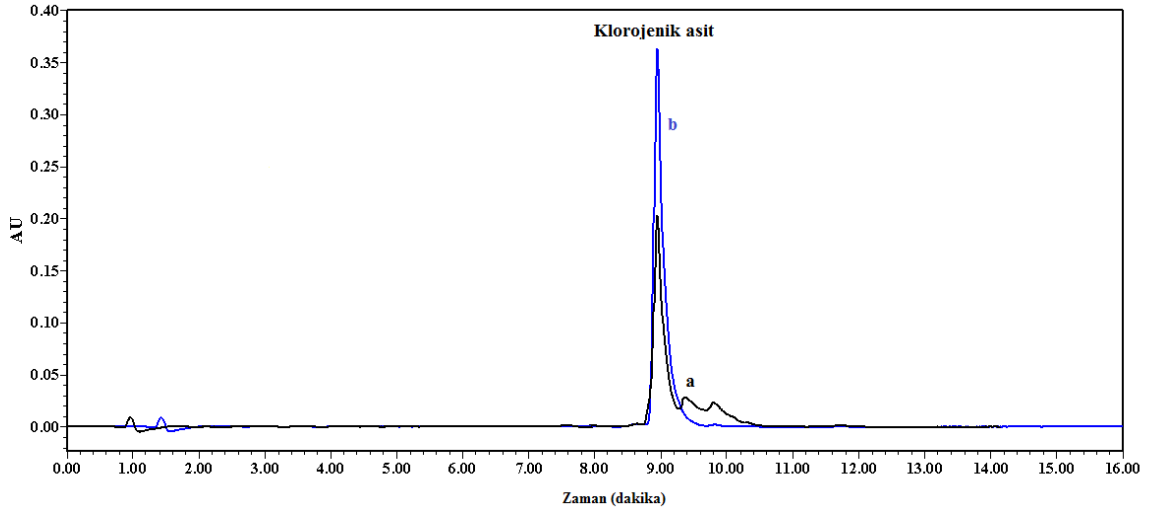
çözücü sistemleriyle yıkayarak kartuştan çıkarılmaları hedeflenmiştir. Şekil 4.53'te kolondan alınan yıkama çözeltilerinin kromatogramları görülmektedir.



Şekil 4.53: Yeşil kahve çekirdeği ekstraktının KA-MISPE yıkama kromatogramları.

a: Yıkama 1 (12 mL ACN); b: Yıkama 2 (8 mL ACN).

Klorojenik asidin MeOH:HAc (4:1, v/v) karışımıyla elüsyonuna ait kromatogramlar Şekil 4.54'te görülmektedir.



Şekil 4.54: Yeşil kahve çekirdeği ekstraktının KA-MISPE elüsyon kromatogramları.

a: Elüsyon 1 {3 mL MeOH:HAc (4:1, v/v)}; b: Elüsyon 2 {2 mL MeOH:HAc (4:1, v/v)}.

Şekil 4.53 ve 4.54'te görüldüğü gibi klorojenik asit, kafein ve kuersetinden ayrılmış ve % 42 verimle saf halde elde edilmiştir. Tablo 4.25'te kahve çekirdeği ekstraktı için KA-MISPE sonuçları görülmektedir.

Tablo 4.25: Yeşil kahve çekirdeği ekstraktı için KA-MISPE sonuçları

| Aşamalar | KLA miktarı (mmol) |
|-----------------------------|---|
| Yüklenen | $3,11 \times 10^{-3}$ |
| Tutulan | $3,01 \times 10^{-3}$ |
| Elüsyon1 | $5,22 \times 10^{-4}$ (% 17) ^a |
| Geri kazanılan Elüsyon 2 | $7,48 \times 10^{-4}$ (% 25) ^a |

^a: % Geri Kazanım

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Belirli bir molekülü (veya onun bir türevini) kimyasal olarak tanıma özelliğine sahip kalıp içeren polimerik katı malzemeler olan MIP'ler düşük maliyetleri, yüksek mekanik dayanıklılıkları, ısıya ve basınca olan dirençleri, fiziksel sağlamlıkları, asitler, bazlar, metal iyonları ve organik çözücüler gibi ekstrem şartların varlığında kararlılıkları gibi üstünlükleri ve yüksek depolama dayanıklılıkları nedeniyle (Haupt, 2003; Yan ve Ramström, 2005) son yıllarda ilgi çeken araştırma konuları arasında yer almaktadır. (Yan ve Row, 2006; Mahony ve diğ., 2005; Ramström ve Ansell, 1998; Wei ve Mizaikoff, 2007; Cheong ve diğ., 2013; Theodoridis ve diğ., 2006; Vasapollo ve diğ., 2011; Turiel ve Esteban, 2010; Chourasiya ve diğ., 2012; Curcio ve diğ., 2012; Li ve diğ., 2013; Pakade ve diğ., 2012; Valero-Navarro ve diğ., 2011; Zhu ve diğ., 2011; Chen ve diğ., 2011 ve 2012).

Bu tez çalışmasında flavonoidlerin flavon sınıfının en aktif bileşeni olan ve antioksidan, antiviral, antiinflamatuvar ve antitümör özellikleri gibi biyolojik aktivitesi sebebiyle pek çok biyolojik aktif takviyeler ve medikal preparatlarda kullanılan KUE'nin (Song ve diğ., 2009) ve fenolik asitlerin hidroksisinnamik asit sınıfında yer alan ve iltihabı (inflamasyon) yavaşlatan böylece serbest radikallerin zararlı etkilerine ve endotelial hasara karşı koruma gibi biyolojik önemli etkileri olan bir antioksidan KA'nın (Maurya ve Devasagayam, 2010) izolasyonu ve derişiklendirilmesi için KUE ve KA baskılı ayrı ayrı MIP'ler hazırlanmış ve bitkisel örnek ve atıklara uygulanmıştır.

Sentezlenen KA ve KUE baskılı MIP'ler içinde en uygun polimerleri belirlemek için uygun monomer ve gözenek oluşturucu çözücü cins ve miktarları ile kalıp molekül, çapraz bağlayıcı ve başlatıcı miktarlarının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

KUE baskılı polimer sentezi için en uygun

- ✓ Monomer, 4-VP
- ✓ Gözenek oluşturucu çözücü, aseton
- ✓ Kalıp:monomer:çapraz bağlayıcı (KUE:4-VP:EDMA) oranı, 1:4:20 olarak belirlenmiştir.

KUE-MIP ve NIP için KUE adsorpsiyonu (geri bağlanması) adsorpsiyon üzerine zaman, çözücü, derişim etkileri incelenmiş ve en uygun adsorpsiyon süresi olarak 6 saat ve en uygun adsorpsiyon çözücüsü olarak da ACN: DMSO (98: 2, v/v) belirlenmiştir. Derişim etkisinde ise derişim arttıkça MIP ve NIP arasındaki adsorpsiyon farkının diğer deyişle baskılama faktörünün (BF) arttığı görülmüştür. KUE-MIP ile yapılmış çeşitli çalışmaların karşılaştırılması Tablo 5.1’de görülmektedir.

Tablo 5.1: KUE-MIP ile ilgili literatür bilgileri ile çalışmamızın karşılaştırılması

| Kaynak | Mon.-Çap. Bağ.-Por. Çöz. | Kalıp:Mon:Çap.Bağ. mol oranı | Geri Bağla(n)ma Çözücüsü | Baskılama Faktörü |
|---------------------------|--|------------------------------|---|-----------------------|
| Xie ve diğ., 2001 | AA-EDMA-THF | 1:5:50 | MeOH | 3,57 (HPLC kolonunda) |
| Weiss ve diğ., 2002 | 4-VP-EDMA-Aseton | 1:8:40 | ACN:H ₂ O:HAc (80:10:10,v/v/v) | 1,0 (HPLC kolonunda) |
| Theodoridis ve diğ., 2006 | 4-VP-EDMA-DMSO:ACN (2:3, v/v) | 1:5:20 | MeOH:HCOOH (99:1, v/v) | 1,44 (HPLC kolonunda) |
| Hong ve Chen, 2013 | MAA-TRIM-MeOH | 1:5:25 | MeOH | 1,27 |
| Song ve diğ., 2009 | AA-EDMA-THF | 1:7:47 | MeOH | 1,20 |
| Pakade ve diğ., 2013 | 4-VP-EDMA-THF:H ₂ O:MeOH (6:3:1, v/v/v) | 1:10:46 | MeOH:H ₂ O (7:3, v/v) | 2,0 (HPLC kolonunda) |
| López ve diğ., 2012 | 4-VP-EDMA-Aseton:ACN (3:1, v/v) | 1:4:20 | Aseton: ACN (3:1, v/v) | 4,6 |
| Curcio ve diğ., 2012 | MAA-EDMA-MeOH:H ₂ O (1:1, v/v) | 1:16:25 | EtOH: H ₂ O (5:5, v/v) | 2,27 |
| Xia ve diğ., 2006 | MAA-DEGDA-DMF | 7:140:13,6 | ACN | - |
| Molinelli ve diğ., 2002 | 4-VP-EDMA-Aseton | 1:8:40 | ACN | 1,62 |
| Çalışmamız | 4-VP-EDMA-Aseton | 1:4:20 | ACN:DMSO (98:2, v/v) | 2,83 |

Tablo 5.1’de görüldüğü gibi bazı çalışmalarda BF değeri daha yüksek bulunmuş olmakla birlikte sentez için kullanılan ayıraçlar, bunların mol oranları, polimerizasyon teknikleri, geri bağla(n)ma çözücüleri ve hesaplama yöntemleri bizim çalışmamızdan

farklıdır. Örneğin tabloda parantez içinde HPLC kolonunda yazan çalışmalarda polimerler, HPLC kolonunda sentezlenmiş ve adsorpsiyon denemeleri kolon içerisinde gerçekleştirilmiştir.

Bizim çalışma koşullarımızda ortamdaki nem miktarı KUE adsorpsiyonunu etkilediğinden, adsorpsiyon denemeleri sırasında polimerin ve uygulama yapılacak örneklerin kuru olmasına dikkat edildi. Bazı çalışmalarda ise KUE adsorpsiyonu için su içeren çözücü karışımları kullanılmıştır. Bu çalışmaların bir kısmı kullandıkları polimerizasyon yönteminden dolayı nemden etkilenmemekte bir kısmı ise etkilenmekte olmasına rağmen sulu karışım kullanmaktadırlar. Nemden etkilenen adsorpsiyon çalışmalarında ortamda suyun bulunması, bağlanma hidrojen bağı esasına dayandığı için adsorpsiyonun spesifikliğini etkilemektedir. Dolayısıyla elde edilen baskılama faktörleri çalışmanın doğruluğunu azaltmaktadır.

Çalışmamızda KUE-MIP için statik ve dinamik adsorpsiyon kapasitesi hesaplamaları yapılmıştır. Bu çalışmalarda en uygun adsorpsiyon çözücüsü olarak ACN:DMSO (98:2, v/v) çözücü karışımı kullanılmıştır. Dinamik kapasite, kolon denemeleri yapılarak kopma (breakthrough) eğrisi çizilmesiyle belirlenmiştir. Bu şekilde KUE adsorpsiyon miktarı 7×10^{-4} mmol (946 μg KUE / g polimer) olarak bulunmuştur. Statik kapasite, KUE-MIP ve NIP için batch adsorpsiyon testi uygulanmasıyla belirlenmiştir. Bu yöntemle KUE adsorpsiyon miktarı $5,88 \times 10^{-4}$ mmol (794 μg KUE / g polimer) olarak hesaplanmıştır. MIP ve NIP' e ait Freundlich ve Langmuir adsorpsiyon izotermi sabitleri hesaplanmıştır. Polimerlerin Freundlich izotermine daha uygun olduğu görülmüştür.

1:4:20 KUE-MIP ve NIP için fenolik bileşiklerin seçimlilik denemeleri, ayrı ayrı tartılan polimerlere 40 μM flavonollerden Kuersetin (KUE) ve rutin (RT), flavanollerden kateşin (KAT), hidroksisinnamik asitlerden kafeik asit (KA) ve hidroksibenzoik asitlerden vanilik asit (VA) çözeltileri ile tek tek batch testi uygulamasıyla gerçekleştirilmiştir. Polimerler tarafından adsorbe edilen fenolik bileşiklerin miktar sıralaması aşağıdaki gibidir:

- ✓ MIP'deki adsorpsiyon sıralaması (μmol / g polimer); KUE (3,33) > KA (1,55) > RT (0,868) > KAT (0,714) > VA (0,416)

- ✓ NIP'deki adsorpsiyon sıralaması ($\mu\text{mol} / \text{g}$ polimer); KA (1,61) > VA (1,31) > KUE (0,92) > KAT (0,584) > RT (0,475).

Buradan da görüldüğü gibi kuersetinin MIP üzerindeki adsorpsiyonu ve seçiciliği diğer fenolik bileşiklere göre daha fazladır. Rutin, kuersetinin şekerli formu olduğundan şeker yapısı sterik engel oluşturmuş ve bu sebeple MIP ve NIP'te daha az adsorplanmıştır. Kateşin de flavonoid yapısında olduğundan polimerlerde bir miktar adsorplanmıştır. Ancak MIP ve NIP'deki adsorpsiyon miktarı birbirine çok yakın olduğu için kateşinin MIP'de kalıba girmediği sadece yapısındaki hidroksil grupları ile polimer yüzeyinde hidrojen bağı yaptığı düşünülmüştür. Kafeik asit ve vanilik asit, sırasıyla hidroksisinnamik asit ve hidroksibenzoik asit yapısındadır. Ancak yapılarındaki hidroksil grupları sebebiyle polimer kalıbına girmeden yüzeye hidrojen bağı yaparak tutuldukları söylenebilir. Bu durumda kateşin, kafeik asit ve vanilik asidin KUE-MIP tarafından adsorpsiyonunun non-spesifik etkileşimlere dayanmakta olduğu sonucuna varılmıştır.

KUE-MIP ve NIP'lerin yapı analizleri FTIR-ATR spektrumları alınarak gerçekleştirilmiş ve MIP ve NIP arasında belirgin bir fark görülmemiştir. Polimer morfolojilerinin incelenmesinde ise SEM görüntüleri alınmış ve burada da MIP ve NIP arasında çok belirgin bir farklılık görülmemekle beraber MIP'in, daha yoğun gözenekler ile daha homojen yapıya sahip olduğu görülmüştür. Çünkü yığın polimerizasyonu sonucunda elde edilen polimerik yapılar küresel yapıya ve gözenekli yüzeylere sahiptirler. Polimer yüzeyinin gözenekli yapıya sahip olması yüzey alanını artırır ve bu durum polimerin özellikle kromatografik uygulamalarda dolgu malzemesi olarak kullanımında üstünlük sağlar. Yapıdaki gözenekler polimerin aynı zamanda yüksek iç yüzey alanına sahip olmasına neden olur. Sonuçta kütle aktarımını zorlaştıran yüzey ve difüzyon dirençleri azalır ve kütle aktarımı nispeten kolaylaşır. (Song ve diğ., 2009)

KUE-MIP'lerin kullanılmasıyla MISPE denemeleri gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda iki adet sentetik karışım ve doğal örnekler kullanılmıştır.

Sentetik karışımlara KUE-MIP ile yapılan MISPE uygulamalarında,

- ✓ Gallik asit-kafeik asit-kateşin-rutin-kuersetin'den oluşan sentetik karışımdan % 73 verimle KUE ve % 23 verimle RT geri kazanımları sağlanmıştır.

- ✓ Floridzin-mirisetin-kuersetin' den oluşan diğer sentetik karışımda ise % 68 verimle KUE ve % 30 verimle MR geri kazanımı sağlanmıştır.

Daha önceki iki çalışmada (Yin-Zhe ve Kyung Ho, 2007; López ve diğ., 2012) kateşinin ön-derişiklendirilmesi ve geri kazanımı için KUE baskılı polimerler kullanılmıştır. Bizim çalışmamızda ise kateşin, flavonol yapısından olmadığı için KUE-MIP üzerinde adsorplanmasının non-spesifik olduğu düşünülmüş ve KUE-MISPE işleminde kateşin yıkanarak polimerden uzaklaştırılmıştır.

Doğal örneklerle KUE-MIP ile yapılan MISPE uygulamalarında,

- ✓ Isırgan otu ekstrakt hidrolizatından % 87 verimle KUE,
- ✓ Kırmızı soğan kabuğu ekstraktından % 58 verimle KUE ve % 55 verimle KAM,
- ✓ Kırmızı soğan kabuğu ekstraktı hidrolizatından % 86 verimle KUE ve % 82 verimle KAM,
- ✓ Siyah çay ekstraktı hidrolizatından % 66 verimle KUE ve % 43 verimle KAM,
- ✓ Yeşil kahve çekirdeği ekstraktından % 65 verimle KUE,

geri kazanımları sağlanmıştır.

Literatürde KUE-MISPE ile çeşitli bitkisel ürünlerden (beyaz ve kırmızı şarap, yeşil çay, ginkgo yaprakları, *Moringa Oleifera*, *Cacumen Platycladus*, *Herba Lysimachiae*) KUE geri kazanımı yüzdeleri %55-98 aralığında değişmektedir (Molinelli ve diğ., 2002; Xie ve diğ., 2001; Chen ve diğ., 2013; Pakade ve diğ., 2012; Theodoridis ve diğ., 2006; Song ve diğ., 2009). Ayrıca Theodoridis ve diğ. (2006) ve Song ve diğ. (2009), bizim çalışmamızda olduğu gibi KUE'yi RT ile beraber geri kazanmışlardır.

KA baskılı polimer sentezi için en uygun

- ✓ Monomer, 4-VP
- ✓ Gözenek oluşturucu çözücü, THF
- ✓ Kalıp:monomer:çapraz bağlayıcı (KA:4-VP:EDMA) oranı, 1:4:16 olarak belirlenmiştir.

KA-MIP ve NIP için KA adsorpsiyonu (geri bağlanması) üzerine zaman, çözücü, derişim etkileri incelenmiş ve en uygun adsorpsiyon süresi olarak 6 saat ve en uygun adsorpsiyon çözücüsü olarak da ACN belirlenmiştir. Derişim etkisinde ise 400 µM'ın

altındaki derişimlerde NIP tarafından adsorplanan KA miktarı MIP'den düşükken, 400 μM 'ın üzerindeki derişimlerde NIP'nin adsorpladığı KA miktarı MIP'nin adsorpsiyona yaklaşmakta ve hatta daha yüksek derişimlerde MIP adsorpsiyonunu geçmektedir. Bunun sebebinin KA'nın asetonitrildeki çözünürlüğünün düşük olması, bu nedenle, yüksek derişimlerde KA'nın zamanla çökmesi olduğu düşünölmüştür. Dolayısıyla yüksek derişimlerde, çözeltilde ölçölen KA absorbanlarının polimerin KA'yı bağlamasıyla ilişkilendirilemeyeceği sonucuna varılmıştır. Bu sebeplerden dolayı adsorpsiyon çalışmalarında 400 μM 'ın altındaki derişimler kullanılmıştır. Adsorpsiyon denemelerinde 1:4:16 polimerinin baskılama faktörü 2,02 olarak bulunmuştur.

KA-MIP' te KA ve KLA için statik ve dinamik adsorpsiyon kapasitesi hesaplamaları yapılmıştır. Dinamik kapasite hesabı için ACN ortamında kolon denemeleri yapılarak kopma (breakthrough) eğrisi çizilmiştir. Elde edilen dinamik kapasite bulgularına göre KA için $5,70 \times 10^{-3}$ mmol (1027 μg KA/g polimer) ve KLA için ise $9,05 \times 10^{-4}$ mmol (3207 μg KLA/g polimer) kapasite hesaplanmıştır. Statik kapasite hesaplaması için KA-MIP ve NIP'de KA ve KLA için kesikli temas (batch) adsorpsiyon metodu uygulanmış ve adsorpsiyon kapasitesinin KA için $3,72 \times 10^{-3}$ mmol (670 μg KA /g polimer) ve KLA için $3,98 \times 10^{-4}$ mmol (1412 μg KL A /g polimer) olarak belirlenmiştir. MIP ve NIP' e ait Freundlich ve Langmuir adsorpsiyon izotermi sabitleri hesaplanmıştır. Polimerlerin Freundlic izotermine Langmuir izoterminden daha fazla uyduğu görölmüştür.

KA-MIP VE NIP ile batch testi denemeleriyle seçimlilik çalışmaları yapılmıştır. Bunun için 80 μM hidroksisinnamik asit sınıfından KA, RA, SA, FA, KLA, p-KUA; hidroksibenzoik asit sınıfından GA, VA, 4-HBA, 3,4-diHBA ve flavonoid sınıfından KAT standartları kullanılarak ayrı ayrı KA-MIP ve NIP'ler ile yapılan batch testi sonucunda adsorbe edilen miktar sıralaması aşağıdaki gibidir:

- ✓ MIP'deki adsorpsiyon sıralaması ($\mu\text{mol/g}$ polimer); RA (7,90) > KLA (7,65) > KA (6,65) > GA (5,37) > 3, 4-diHBA (4,30) > KAT (3,46) > 4-HBA (2,24) > SA (1,86) > VA (1,72) > p-KUA (1,70) > FA (1,26).
- ✓ NIP'deki adsorpsiyon sıralaması ($\mu\text{mol/g}$ polimer); KLA (7,15) > RA (6,78) > GA (4,36) > KA (3,76) > 3,4-diHBA (3,28) > KAT (2,51) > 4-HBA (1,92) > FA (0,90) > VA (0,86) > SA (0,55) > p-KUA (0,35) şeklinde dir.

Hidroksisinnamik asit yapısında olan FA adsorpsiyonuna bakıldığında yapı olarak KA'ya benzemesine rağmen fenil grubunda 3-metoksi yapısı bulunmasının sterik engel oluşturup hidrojen bağı yapma etkinliğini azalttığı, bu sebeple MIP ve NIP'de adsorpsiyonunun çok yüksek olmadığı görülmektedir. KLA ise KA'nın kuinik asit esteri olduğundan MIP kalıbına girmesi için sterik engel oluşturması beklenmekte, ancak çok fazla hidroksil grubu içerdiği için hem MIP hem de NIP tarafından yüksek oranda adsorplanmaktadır. RA ise KA'nın fenil esteri olması ve çok fazla hidroksil grubu içermesinden dolayı KA-MIP ve NIP'te oldukça yüksek miktarda adsorplanmıştır. Yüksek miktarda adsorplanan KLA ve RA'nın MIP ve NIP arasındaki adsorpsiyon farkı KA'ya göre düşük olduğundan bu bileşiklerin adsorpsiyonu KA kadar özgül değildir. SA ise fenil halkasındaki 3,5-dimetoksi grubunun sterik engellemesi nedeniyle MIP ve NIP'de daha az adsorplanmaktadır. *p*-KUA de KA'dan farklı olarak fenil halkasında sadece 4-hidroksi yapısı içerdiğinden MIP ve NIP'de adsorpsiyonu düşüktür. Hidroksibenzoik asit yapısında olan GA ve 3,4-diHBA, KA'ya göre daha küçük molekül yapısında olduğundan ve KA gibi 3,4-dihidroksi yapısı içerdiğinden polimerde tutulma oranı yüksektir. VA ve 4-HBA'nın KA yapısıyla benzer tek bir kalıba bağlanma noktası olduğundan polimer tarafından adsorpsiyonu düşüktür. Flavonoid yapısında olan KAT'ın ise KA ile 3,4-dihidroksifenil yapısı ortak olduğu için polimer tarafından bir miktar adsorplandığı görülmüştür.

KA-MIP ve NIP'lerin yapı analizleri ATR spektrumları alınarak gerçekleştirilmiş ve MIP ve NIP arasında belirgin bir fark olmadığı görülmüştür. Bu durum KA ve polimerik örneklerin yapılarındaki benzerlikten kaynaklanmaktadır. Polimer morfolojilerinin incelenmesinde ise SEM görüntüleri alınmış ve burada da MIP ve NIP arasında çok önemli bir farklılık görülmemiştir. Birçok makrogözenek ve akış-kanalları bu polimerlerin ağ iskeletleri içinde bulunmaktadır. Bu makro gözenekler ve kanallar hareketli fazın polimer içinden düşük akış direnci ile akışını ve böylece çözünen maddenin hızlı kütle aktarımını sağlar. Ayrıca düşük geri basınç, yüksek akış hızıyla çalışmaya olanak verir. Polimerizasyon sıcaklığı, çözücü tipi ve bileşim polimerin gözenek özelliklerini etkileyen en önemli üç faktördür (Zhu ve diğ., 2010).

KA-MIP'lerin kullanılmasıyla sentetik karışım ve yeşil kahve çekirdeği ekstraktı için MISPE denemeleri gerçekleştirilmiştir. KA-MIP kullanılarak 4-hidroksi benzoik asit-

vanilik asit-*p*-kumarik asit-kafeik asit-ferulik asit'ten oluşan sentetik karışım için MISPE uygulamasında % 49 verimle KA geri kazanımı sağlanmıştır.

Yeşil kahve çekirdeği ekstraktından ise KA-MIP kullanılarak yapılan MISPE uygulamasında % 41 verimle KLA geri kazanımı sağlanmıştır.

Literatürde KA-MIP'lerin kullanılmasıyla yapılan çok az sayıda MISPE uygulaması bulunmaktadır. Örneğin, Zhu ve diğ. (2010)'nin yaptıkları çalışmada *Salicornia Herbacea* bitkisinden monolitik KA-MISPE uygulamasıyla yaklaşık % 75 verimle KA, 3,4-diHBA ve FA'dan oluşan üç organik asidin birlikte geri kazanımı sağlanmıştır. Michailof ve diğ. (2008) yaptıkları çalışmada zeytinyağı fabrikası atıklarının sadece hidroksisinnamik ve hidroksibenzoik asitleri içeren ekstraktından KA geri kazanımı sağlamışlar ancak geri kazanım yüzdesi ile ilgili bir bilgi vermemişlerdir. Li ve diğ. (2013) mantar ekstraktlarından KA-MISPE yöntemiyle % 52 verimle KA ve % 85 verimle KA fenil esteri geri kazanımı sağlamışlar. Li ve diğ. (2005) *Eucommia ulmodies* yaprak ekstraktlarını C₁₈ kolondan geçirip monolitik KA-MISPE uygulamasıyla KLA geri kazanmışlardır.

6. KAYNAKLAR

- Abu-Amsha, R., Croft, K. D., Puddey, I. B., Proudfoot, J. M., Beilin, L. J., 1996, Phenolic content of various beverages determines the extent of inhibition of human serum and low density lipoprotein oxidation in vitro: identification and mechanism of action of some cinnamic acid derivatives from red wine, *Clinical Science*, 91, 449-458.
- Aherne, S. A., O'Brien, N. M., 2002, Dietary Flavonols: Chemistry, Food Content, and Metabolism, *Nutrition*, 18, 75-81.
- Al-Sereitia, M. R., Abu-Amerb, K. M. , Sena, P, 1999, Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials, *Indian Journal of Experimental Biology*, 37, 124-131.
- Ansell, R. J., Mosbach, K., 1997, Molecularly imprinted polymers by suspension polymerisation in perfluorocarbon liquids, with emphasis on the influence of the porogenic solvent, *Journal of Chromatography A*. 787, 55-66.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S., 2006, Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses, *Food Chemistry*, 99, 191–203.
- Belay, A., Ture, K., Asfaw, A., 2008, Measurement of caffeine in coffee beans with UV/Vis spectrometer, *Food Chemistry*, 108(1), 310-315.
- Bergmann, N. M., Peppas, N. A., 2008, Molecularly imprinted polymers with specific recognition for macromolecules and proteins, *Progress in Polymer Science*, 33 - 271–288.
- Boots A, W., Haenen, G. R.M.M., Bast, A., 2008, Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical, *European Journal of Pharmacology*, 585, 325-337.
- Caro, E., Marce', R.M., Borrull, F., Cormack, P.A.G., Sherrington, D.C., 2006, Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of compounds from environmental and biological samples, *Trends in Analytical Chemistry*, 25 (2),143-154.
- Cadenas, E., Packer, L., 2002, *Handbook of Antioxidants*, Marcel Dekker, New York-Basel, 0-8247-0547-5.
- Chen, F.-F., Wang, G.-Y., Shi, Y.-P. , 2011, Molecularly imprinted polymer microspheres for solid-phase extraction of protocatechuic acid in *Rhizoma homalomenae*, *Journal of Separation Science*, 34, 2602-2610.

- Chen, Z., Wang, M., Fu, Y., Yu, H., Di, D., 2012, Preparation of Quercetin Molecularly Imprinted Polymers, *Designed Monomers and Polymers*, 15, 93–111.
- Chen, J. H., Ho, C.-T, 1997, Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2374-2378.
- Cheong, W. J., Yang, S. H., Ali, F., 2013, Molecular imprinted polymers for separation science: A review of reviews, *Journal of Separation Science*, 36, 609-628.
- Cheung, L.M., Cheung, P.C.K., Ooi, V. E.C., 2003, Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts, *Food Chemistry*, 81, 249–255
- Chiou, M.S., Li, H.Y., 2002, Equilibrium And Kinetic Modeling of Adsorption of Reactive Dye on Cross-Linked Chitosan Beads, *Journal Of Hazardous Materials*, 93(2), 233-248.
- Chourasiya, A., Upadhahay, A., Shukla, R. N., 2012, Isolation of quercetin-from the leaves of *Azadirachta indica* and anti-diabetic study of the crude extracts, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 25 (25), 179-181.
- Cook, N. C., Samman, S., 1996, Flavonoids –Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources, *Nutritional Biochemistry*, 7, 66-76.
- Cools, K., Chope, G. A., Terry, L. A., 2010, Fate of Flavonoids in the Outer Skins of Onion (*Allium cepa* L.) Throughout Curing, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 11709–11715.
- Cormack, P.A.G., Elorza, A. Z., 2004, Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation, *Journal of Chromatography B*, 804,173–182.
- Corzo-Martínez , M., Corzo, N., Villamiel, M., 2007, Biological properties of onions and garlic, *Trends in Food Science and Technology*, 18, 609-625.
- Curcio, M. , Cirillo, G., Parisi, O. I., Iemma, F., Picci, N., Puoci, F., 2012, Quercetin-Imprinted Nanospheres as Novel Drug Delivery Devices, *Journal of Functional Biomaterials*, 3, 269-282.
- De Rijke, E., Out, P., Niessen, W. M. A., Ariese, F., Gooijer, C., Brinkman, U. A. Th., 2006, Analytical separation and detection methods for flavonoids, *Journal of Chromatography A*, 1112, 31-63.
- Farah, A., Monteiro, M., Donangelo, C.M., Lafa, S., 2008, Chlorogenic Acids from Green Coffee Extract are Highly Bioavailable in Humans, *The Journal of Nutrition Biochemical, Molecular, and Genetic Mechanisms*, 2309-2315.
- Furniss, B.S., Hannaford, A. J., Smith, P. W. G., Tatchell, A. R., 1989, *VOGEL's Textbook of Practical Organic Chemistry*, 405-406.

- García-Calzón, J.A., Díaz –García, M.E., 2007, Characterization of binding sites in molecularly imprinted polymers, *Sensors and Actuators*, 123, 1180–1194.
- Guo, T.Y., Xia, Y.Q., Hao, G.J., Song, M.D., Zhang, B.H., 2004, Adsorptive separation of hemoglobin by molecularly imprinted chitosan beads, *Biomaterials* 25, 5905–5912.
- Gülçin, İ., Küfrevioğlu, Ö. İ., Oktay, M., Büyükkuroğlu, M. E., 2004, Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.), *Journal of Ethnopharmacology*, 90, 205–215
- Haupt, K., 2001, Molecularly imprinted polymers in analytical chemistry, *Analyst*, 126, 747–756.
- Haupt, K., 2003, Imprinted Polymers: The next generation, *Analytical Chemistry*, 376–383.
- Heim, K.E., Tagliaferro, R., Bobilya, D. J., 2002, Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572-584.
- Hertog, M. G. L., Hollman P. C. H., Venema, D. P., 1992a, Optimization of quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1591-1598.
- Hertog, M. G. L., Hollman P. C. H., Katan, M. B., 1992b, content of anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly in the Netherlands, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 2379-2383.
- Hennion, M.-C., 1999, Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 856, 3-54.
- Henczkowski, M., Kopacz, M., Nowak, D., Kuźniar, A., 2001, Infrared Spectrum analysis of some flavonoids, *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, 58(6), 415-420.
- Hong, Y., Chen, L., 2013, Extraction of quercetin from Herba Lysimachiae by molecularly imprinted-matrix solid phase dispersion, *Journal of Chromatography B*, 941, 38– 44.
- Jin, Y., Row, K. H., 2007, Adsorption Isotherms of Quercetin and Catechin Compounds on Quercetin-MIP, *Chemical Research in Chinese Universities*, 23 (4), 412-416.
- Kan, X., Zhao, Q., Zhang, Z., Wang, Z., Zhu, J.-J., 2008, Molecularly imprinted polymers microsphere prepared by precipitation polymerization for hydroquinone recognition, *Talanta*, 75, 22–26.
- Karaman, Ş., 2008, *Türkiye’de yetiştirilen bazı elma çeşitlerinin toplam antioksidan kapasitelerinin ve antioksidan özellik gösteren başlıca bileşenlerinin karşılaştırılması*, Yüksek Lisans, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

- Komiyama, M., Takeuchi, T., Mukawa, T., Asanuma, H., 2003, *Molecular Imprinting From Fundamentals to Applications*, Willey-VCH Verlag GmbH&Co., Germany, 147 p.
- Kudrinskaya, V. A., Dmitrienko, S. G., Zolotov, Y. A., 2009, Synthesis and Study of Sorption Properties of Molecularly Imprinted Polymers for Quercetin, *Moscow University Chemistry Bulletin*, 64 (3), 124-129.
- Laferrière, M., Sanrame, C. N., Scaiano, J. C., 2004, A Remarkably Long-Lived Benzyl Carbanion, *Organic Letters*, 6 (6), 873-875.
- Lasáková, M., Jandera, P., 2009, Molecularly imprinted polymers and their application in solid phase extraction, *Journal of Separation Science*, 32, 799 – 812.
- Li, N., Ng, T. B., Wong, J. H., Qiao, J. X., Zhang, Y. N., Zhou, R., Chen, R. R., Liu, F., 2013, Separation and purification of the antioxidant compounds, caffeic acid phenethyl ester and caffeic acid from mushrooms by molecularly imprinted polymer, *Food Chemistry*, 139, 1161–1167.
- Li, H., Nie, L., Yao, S., 2004, Adsorption Isotherms and Sites Distribution of Caffeic Acid-Imprinted Polymer Monolith from Frontal Analysis, *Chromatographia*, 60, 425-431.
- Li, P., Rong, F., Yuan, C., 2003, Morphologies and binding characteristics of molecularly imprinted polymers prepared by precipitation polymerization, 2003, *Polymer International*, 52, 1799–1806.
- Li, H., Liu, Y., Zhang, Z., Liao, H., Nie, L., Yao, S., 2005, Separation and purification of chlorogenic acid by molecularly imprinted polymer monolithic stationary phase, *Journal of Chromatography A*, 1098, 66–74.
- López, M. d. M. C., Pérez, M. C. C., García, M. S. D., Vilariño, J. M. L., Rodríguez, M. V. G., Losada, L. F. B., 2012, Preparation, evaluation and characterization of quercetin-molecularly imprinted polymer for preconcentration and clean-up of catechins, *Analytica Chimica Acta*, 721, 68– 78.
- Lu, Y., Li, C., Liu, X., Huang, W., 2002. Molecular Recognition Through the Exact Placement of Functional Groups on Non-Covalent Molecularly imprinted Polymers. *Journal of Chromatography A*, 950, 89-97.
- Mahony, J.O., Nolan, K., Smyth, M.R., Mizaikoff, B., 2005, Molecularly imprinted polymers—potential and challenges in analytical chemistry, *Analytica Chimica Acta*, 534, 31–39.
- Makris, D. P., Boskou, G., Andrikopoulos, N. K., 2007, Recovery of antioxidant phenolics from white vinification solid by-products employing water/ethanol mixtures, *Bioresource Technology*, 98, 2963–2967.

- Martín-Esteban, A., 2001, Molecularly imprinted polymers: new molecular recognition materials for selective solid-phase extraction of organic compounds, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 370, 795–802.
- Maurya, D. K., Devasagayam, T. P. A., 2010, Antioxidant and prooxidant nature of hydroxycinnamic acid derivatives ferulic and caffeic acids, *Food and Chemical Toxicology*, 48, 3369-3373.
- Mayes, A. G., Mosbach, K., 1997, Molecularly imprinted polymers: useful materials for analytical chemistry?, *Trends in Analytical Chemistry*, 16 (6), 321-332.
- Michailof, C., Manesiotis, P., Panayiotou, C., 2008, Synthesis of caffeic acid and p-hydroxybenzoic acid molecularly imprinted polymers and their application for the selective extraction of polyphenols from olive mill waste waters, *Journal of Chromatography A*, 1182, 25–33.
- Molinelli, A. , Weiss, R, Mizaikoff, B., 2002, Advanced Solid Phase Extraction Using Molecularly Imprinted Polymers for the Determination of Quercetin in Red Wine, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1804-1808.
- Mosbach, K., Ramström, O., 1996, The Emerging Technique of Molecular Imprinting and Its Future Impact on Biotechnology, *Bio/technology*, 14, 163-170.
- Moskaug, J. Ø., Carlsen, H., Myhrstad, M., Blomhoff, R., 2004, Molecular imaging of the biological effects of quercetin and quercetin-rich foods, *Mechanisms of Ageing and Development*, 125, 315-324.
- Mukhtar, H., Ahmad, N., 2000, Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health, *American Society for Clinical Nutrition*, 71, 1698-1702.
- Naidu, M. M., Sulochanamma, G., Sampathu, S. R., Srinivas, P., 2008, Studies on extraction and antioxidant potential of green coffee, *Food Chemistry*, 107, 377–384.
- Nicolescu, T.-V., Sârbu, A., Ghiurea, M., Donescu, D., 2011, Influence of crosslinker/porogen ratio upon imprinted polymer parameters, *UPB Scientific Bulletin Series B*, 73 (1), 163-172.
- Ng, J.C.Y., Cheung, W.H., McKay, G., 2003, Equilibrium studies for the sorption of lead from effluents using chitosan, *Chemosphere*, 52, 1021–1030.
- Nuutila, A. M., Puupponen-Pimia, R., Aarni, M., Oksman-Caldentey, K.-M., 2003, Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity, *Food Chemistry*, 81, 485-493.
- Odabası, M., Denizli, A., 2001. Polyhydroxyethylmethacrylate Based Magnetic DNA-Affinity Beads for Anti-DNA Antibody Removal from Systemic Lupus Erythematosus Patient Plasma, *Journal of Chromatography B*, 760, 137-148.

- O'Mahony, J., Molinelli, A., Nolan, K., Smyth, M.R Mizaikoff, B., 2006, Anatomy of a successful imprint: Analysing the recognition mechanisms of a molecularly imprinted polymer for quercetin, *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 1383–1392
- Pakade, V., Cukrowska, E., Lindahl, S., Turner, C., Chimuka, L., 2013, Molecular imprinted polymer for solid-phase extraction of flavonol aglycones from *Moringa oleifera* extracts, *Journal of Separation Science*, 36, 548–555.
- Pakade, V., Lindahl, S., Chimuka, L., Turner, C., 2012, Molecularly imprinted polymers targeting quercetin in high-temperature aqueous solutions, *Journal of Chromatography A*, 1230, 15– 23.
- Ramström O., Ansell, R.J., 1998, Molecular Imprinting Technology: Challenges and Prospects for the Future, *Chirality*, 10-195–209.
- Ramström, O., Skudar, K., Haines, J., Patel, P., Brüggeman, O., 2001, Food analyses using molecularly imprinted polymers, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2105-2114.
- Richelle, M., Tavazzi, I., Offord, E., 2001, Comparison of the Antioxidant Activity of Commonly Consumed Polyphenolic Beverages (Coffee, Cocoa, and Tea) Prepared per Cup Serving, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3438-3442.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G., 1996, Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology & Medicine*, 20, 933-956.
- Rushton, G. T., Karns, C. L., Shimizu, K. D., 2005, A critical examination of the use of the Freundlich isotherm in characterizing molecularly imprinted polymers (MIPs), *Analytica Chimica Acta*, 528, 107–113.
- Sakakibara, H., Honda, Y., Nakagawa, S., Ashida, H., Kanazawa K., 2003, Simultaneous Determination of All Polyphenols in Vegetables, Fruits, and Teas, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 571-581.
- Sambe, H., Hoshina, K., Moaddel, R., Wainer, I. W., Haginaka, J., 2006, Uniformly-sized, molecularly imprinted polymers for nicotine by precipitation polymerization, *Journal of Chromatography A*, 1134, 88–94.
- Scheweitz, L., Andersson, L. I., Nilsson, S., 1998, Molecular imprint-based stationary phases for capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A*, 817, 5-13.
- Schieber, A., Stintzing F.C., Carle, R., 2001, By-products of plant food processing as a source of functional compounds—recent developments, *Trends in Food Science & Technology*, 12, 401–413.

- Shimoda, H., Seki, E., Aitani, M., 2006, Inhibitory effect of green coffee bean extract on fat accumulation and body weight gain in mice, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6 (9),1-9.
- Simon, R., Collins, M. E., Spivak, D. A., 2007, Shape selectivity versus functional group pre-organization in molecularly imprinted polymers, *Analytica Chimica Acta*, 591, 7-16.
- Song, X., Li, J., Wang, J., Chen L., 2009, Quercetin molecularly imprinted polymers: Preparation, recognition characteristics and properties as sorbent for solid-phase extraction, *Talanta*, 80, 694–702.
- Spivak, D. A., 2005, Optimization, evaluation, and characterization of molecularly imprinted polymers, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 1779 – 1794.
- Świsłocka, R., 2013, Spectroscopic (FT-IR, FT-Raman, UV absorption, ¹H and ¹³C NMR) and theoretical (in B3LYP/6-311++G** level) studies on alkali metal salts of caffeic acid, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 100, 21-30.
- Theodoridis, G., Lasáková, M., Škeříková, V., Tegou, A., Giantsiou, N., Jandera P., 2006, Molecular imprinting of natural flavonoid antioxidants: application in solid-phase extraction for the sample pretreatment of natural products prior to HPLC analysis, *Journal of Separation Science*, 29, 2310 – 2321.
- Toldy, A., Atalay, M., Stadler, K., Sasvária, M., Jakus, J., Jung K.J., Chung, H. Y., Nyakas, C., Radák, Z., 2009, The beneficial effects of nettle supplementation and exercise on brain lesion and memory in rat, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 20, 974–981.
- Tsunemori, H., Araki, K., Uezu, K. Goto, M., Furusaki, S., 2002, Surface imprinting polymers for the recognition of nucleotides, *Bioseparation* 10, 315–321.
- Tunc, Y., Hasırcı, N., Yesilada, A., Ulubayram, K., 2006, Comonomer effects on binding performances and morphology of acrylate-based imprinted polymers, *Polymer*, 47, 6931-6940.
- Turiel, E., Martín-Esteban, A., 2010, Molecularly imprinted polymers for sample preparation: A review, *Analytica Chimica Acta*, 668, 87–99.
- Tütem, E., Apak, R., Ünal, Ç. F., 1998, Adsorptive removal of chlorophenols from water by bituminous shale, *Water Research*, 32(8), 2315-2324
- Umpleby, R. J., Baxter, S. C., Bodea, M., Jr., J. K. B., Shaha, R. N., Shimizu, K. D., 2001a, Application of the Freundlich adsorption isotherm in the characterization of molecularly imprinted polymers, *Analytica Chimica Acta*, 435, 35–42.

- Umpleby, R. J., Baxter, S. C., Chen, Y., Shah, R. N., Shimizu, K. D., 2001b, Characterization of Molecularly Imprinted Polymers with the Langmuir-Freundlich Isotherm, *Analytical Chemistry*, 73, 4584-4591.
- Vasapollo, G., Sole, R. D., Mergola, L., Lazoi, M. R., Scardino, A., Scorrano, S., Mele G., 2011, Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective, *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 5908-5945.
- Valero-Navarro, Á., Gómez-Romero, M., Fernández-Sánchez, J. F., Cormack, P. A.G., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez A., 2011, Synthesis of caffeic acid molecularly imprinted polymer microspheres and high-performance liquid chromatography evaluation of their sorption properties, *Journal of Chromatography A*, 1218, 7289–7296.
- Vlatakis, G., Andresson, L. I., Müller, K., Mosbach, K., 1993, Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting, *Nature (London)*, 361, 645-647.
- Wei, S., Mizaikoff, B., 2007, Recent advances on noncovalent molecular imprints for affinity separations, *Journal of Separation Science*, 30, 1794-1805.
- Weiss, R., Molinelli, A., Jakusch, M., Mizaikoff, B., 2002, Molecular imprinting and solid phase extraction of flavonoid compounds, *Bioseparation* 10, 379–387.
- Wulff, G., Sarhan, A., 1972, Use of polymers with enzyme-analogous structures for the resolution of racemates, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 11(4), 341.
- Wulff, G., 1995, Molecular Imprinting in Cross-Linked Materials with the Aid of Molecular Templates- A Way towards Artificial Antibodies, *Angewandte Chemie International Edition in English*, 34, 1812-1832.
- Xia, Y., Guo, T., Song, M., Zhang, B., Zhang, B., 2006, Selective separation of quercetin by molecular imprinting using chitosan beads as functional matrix, *Reactive & Functional Polymers*, 66, 1734–1740.
- Xie, J., Zhu, L., Luo, H., Zhou, L., Li, C., Xu, X., 2001, Direct extraction of specific pharmacophoric flavonoids from ginkgo leaves using a molecularly imprinted polymer for quercetin, *Journal of Chromatography A*, 934, 1–11.
- Xie, J.C., Zhu, L. L., Xu, J. J., 2003, Preparative separation and determination of matrine from the Chinese medicinal plant *Sophora flavescens* Ait by molecularly imprinted solid-phase extraction, *Analytical Chemistry*, 375, 264-269.
- Yalçın, S., 2004, *Doğal ve sentetik çözeltilerden krom(III) ve krom(VI) giderilmesi, önderiştirilmesi ve türlemesi*, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Yan, M., Ramström, O., (EDS.), 2005, *Molecularly Imprinted Materials: Science and Technology*, Marcel Dekker, New York, ISBN: 0-8247-5353-4.

- Yan, H., Row, K. H., 2006, Characteristic and Synthetic Approach of Molecularly Imprinted Polymer, *International Journal of Molecular Sciences*, 7, 155-178.
- Yang, C. S., Landau, J. M., 2000, Effects of Tea Consumption on Nutrition and Health, *Recent Advances in Nutritional Sciences*, 130, 2409-2412.
- Yin-Zhe, J., Kyung Ho, R., Adsorption Isotherms of Quercetin and Catechin Compounds on Quercetin-MIP, 2007, *Chemical Research in Chinese Universities*, 23(4), 412-416.
- Yoshida, M., Uezu, K., Goto, M., Furusaki, S., 2000, Surface Imprinted Polymers Recognizing Amino Acid Chirality, *Journal of Applied Polymer Science*, 78 (4), 695-703.
- Youn, J., Lee, K.-H., Won, J., Huh, S.-J., Yun, H.-S., Cho, W.-G., Paik, D.-J., Beneficial effects of rosmarinic acid on suppression of collagen induced arthritis, 2003, *The Journal of Rheumatology*, 30 (6), 1203-1207.
- Zhu, T., Li, S., Row, K. H., 2011, Molecularly Imprinted Monolithic Material for the Extraction of Three Organic Acids from *Salicornia herbacea* L, *Journal of Applied Polymer Science*, 121, 1691-1696.
- Zhou, W. Shan, J., Wang, S., Ju, W., Meng, M., Cai, B., Di, L., 2014, Simultaneous determination of caffeic acid derivatives by UPLC–MS/MS in rat plasma and its application in pharmacokinetic study after oral administration of *Flos Lonicerae–Fructus Forsythiae* herb combination, *Journal of Chromatography B*, 949-950, 7-15.

7. ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

| | |
|--------------------|--------------------------|
| Adı Soyadı | Şeyda KARAMAN ERSOY |
| Uyruğu | T.C. |
| Doğum tarihi, Yeri | 01.02.1983, Kadıköy |
| Telefon | 0530 515 16 86 |
| E-mail | seydakaraman83@gmail.com |
| Web adres | |

Eğitim

| Derece | Kurum/Anabilim Dalı/Programı | Yılı |
|---------------|--|------|
| Doktora | İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü / Kimya Anabilim Dalı / Analitik Kimya Programı | 2014 |
| Yüksek Lisans | İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü / Kimya Anabilim Dalı / Analitik Kimya Programı | 2008 |
| Lisans | İ.Ü Mühendislik Fakültesi / Kimya Bölümü | 2005 |
| Lise | Maltepe Kadir Has Anadolu Lisesi | 2001 |

Makaleler / Bildiriler

Makaleler

- 1- Ş. Karaman, E. Tütem, K. Sözgen Başkan, R. Apak, "Comparison of total antioxidant capacity and phenolic composition of some apple juices", *Food Chemistry*, 120, 1201-1209 (2010)

- 2- Ş. Karaman, E. Tütem, K. Sözgen Başkan, R. Apak, "Comparison of total antioxidant capacity and phenolic composition of peel and flesh of some apple varieties with combined HPLC-CUPRAC assay", *Journal of Food Composition and Analysis*, 93 (4), 867-875 (2011)
- 3- M. Özyürek, K. Güçlü, E. Tütem, K. S. Başkan, E. Erçağ, S. E. Çelik, S. Baki, L. Yıldız, Ş. Karaman, R. Apak, "A Comprehensive Review of CUPRAC Methodology", *Analytical Methods*, 1-38. (2011)
- 4- L. Alpsoy, H. Sahin, Ş. Karaman "Anti-oxidative and anti-genotoxic effects of methanolic extract of Mentha pulegium on human lymphocyte culture", *Toxicology and Industrial Health*, 27(7), 547-654 (2011)
- 5- L. Alpsoy, I. Uzonur, M. S. Sakcali, Ş. Karaman, "Antioxidant and antimutagenic activities of Viscum album fruit ethanolic extract in human lymphocytes", *African Journal of Biotechnology*, 9 (17), 2539-2543 (2010)
- 6- I. Uzonur, G. Akdeniz, Z. Katmer, Ş. Karaman Ersoy, "RAPD-PCR and REAL-TİME PCR hrm based genetic variation evaluations of *Urtica Dioica* parts, ecotypes and evaluations of morphotypes in turkey, *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 10 (2), 232-245 (2013).
- 7- S.Isik, A.Karagoz, Ş. Karaman, C.Nergiz, Proliferative and apoptotic effects of olive extracts on cell lines and healthy human cells, *Food Chemistry*, 134 (1), 29-36 (2012)

Bildiriler

- 1- K. Sözgen, L. Yıldız, Ş. Karaman, E. Tütem ve R. Apak, "Derivative spectrophotometric determination of naringin in grapefruit juice", 5th Aegean Analytical Chemistry Days", 5-8 Ekim, Selanik-Yunanistan, Abstract, 112. (2006)
- 2- K. Sözgen, L. Yıldız, Ş. Karaman, E. Tütem ve R. Apak, "Derivative spectrophotometric determination of hesperidin in orange juice", 5th Aegean Analytical Chemistry Days", 5-8 Ekim, Selanik-Yunanistan, Abstract, 111. (2006)
- 3- Ş. Karaman, E. Tütem, K. Sözgen Başkan ve R. Apak, "Comparison of total antioxidant capacities and of principle constituents having antioxidant capabilities of some apple varieties", 6th Aegean Analytical Chemistry Days, 9-12 Ekim, Denizli-Türkiye, Abstract. (2008)
- 4- Ş. Karaman, E. Tütem, K. Sözgen Başkan ve R. Apak, "Comparison of total antioxidant capacities and of principle constituents having antioxidant capabilities of some apple juices", 6th Aegean Analytical Chemistry Days, 9-12 Ekim, Denizli-Türkiye, Abstract. (2008)
- 5- G. Akdeniz, Ş. Karaman, S. Şulekoğlu, F. Koyuncu¹, İ. Uzonur, "Isırgan otu bitkisinin (*Urtica Dioica*) Türkiye'de bölgesel antioksidan kapasitesi toplam fenolik içeriği ve moleküler düzeydeki farklılıklarının RAPD-PZR yöntemiyle tesbitine yönelik bir çalışma", *1. Ulusal Palandöken Toksikoloji Sempozyumu* (2010)
- 6- Ş. Karaman, Ç. Küçükçoban, E. Tütem, K. S. Başkan, R. Apak, "TEAC (trolox

equivalent antioxidant capacity) coefficients of some anthocyanins and anthocyanidins according to CUPRAC and ABTS methods”, *Workshop on Antioxidant Measurement Assay Methods* (2010)

7- Ş. Karaman, E. Tütem, K. S. Başkan, R. Apak, C. Nergiz, “Total antioxidant capacities and phenolic contents of some selected herbal plants” *Workshop on Antioxidant Measurement Assay Methods* (2010)

8- Ş. Karaman Ersoy, E. Tütem, K. Sözgen Başkan, R. Apak, C. Nergiz, Adsorption Characteristics, Selectivity and Usage of Caffeic Acid Imprinted Polymers, *44th IUPAC Chemistry Congress*. (2013)

9- Ş. Karaman Ersoy, E. Tütem, K. Sözgen Başkan, R. Apak, C. Nergiz Adsorption Characteristics, Selectivity and Usage of Quercetin Imprinted Polymers, *44th IUPAC Chemistry Congress*. (2013)

10-Ş. Karaman, E. Tütem, K. S. Başkan, R. Apak, C. Nergiz, “Bazı Bitki Örneklerinin Toplam Fenolik İçeriklerinin ve Antioksidan Kapasitelerinin Tayin Edilmesi”, *5. Ulusal Analitik Kimya Kongresi*, (2010) (sözel bildiri)