

**MANYETİK SİLİKA BAZLI BORAT AFİNİTE
KROMATOĞRAFİSİ SORBENTLERİNİN SENTEZİ VE
KROMATOĞRAFİK PERFORMANSLARININ İNCELENMESİ**

**SYNTHESIS OF MAGNETIC SILICA BASED BORONATE
AFFINITY CHROMATOGRAPHY SORBENTS AND
INVESTIGATION OF THEIR CHROMATOGRAPHIC
PERFORMANCE**

ÇAĞIL ZEYNEP SÜNGÜ

Prof. Dr. S. ALİ TUNCEL
Tez Danışmanı

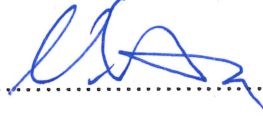
Doç.Dr. SELİS ÖNEL
İkinci Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

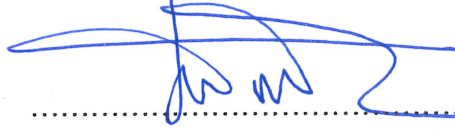
2018

ÇAĞIL ZEYNEP SÜNGÜ' nün hazırladığı “**Manyetik Silika Bazlı Borat Afinitelik Kromatografisi Sorbentlerinin Sentezi ve Kromatografik Performanslarının İncelenmesi**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI'** nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

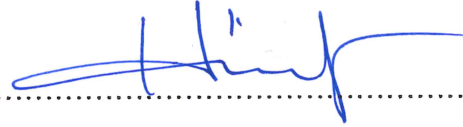
Prof. Dr. Nihal AYDOĞAN
Başkan



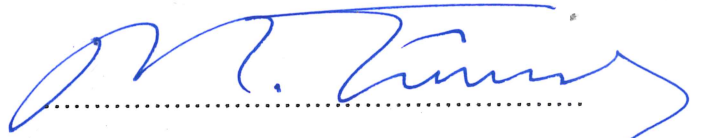
Prof. Dr. S. Ali TUNCEL
Danışman



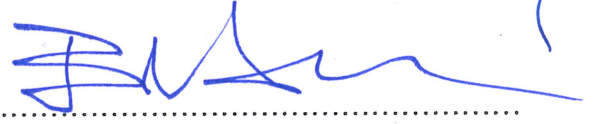
Prof. Dr. Hülya YAVUZ ERSAN
Üye



Prof. Dr. Mustafa TÜRK
Üye



Dr. Öğr. Üyesi. Orhan Erdem HABERAL
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü



Her zaman sevgiyle yanımda olan canım aileme...

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

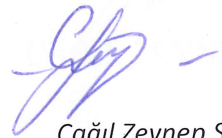
- Tezimin/Raporumun 11/06/2021 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

- Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**

- Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

20 / 06 / 2018



Çağıl Zeynep Süngü


ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yamadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

12/ 06/ 2018


ÇAĞIL ZEYNEP SÜNGÜ

ÖZET

MANYETİK SİLİKA BAZLI BORAT AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ SORBENTLERİNİN SENTEZİ VE KROMATOĞRAFİK PERFORMANSLARININ İNCELENMESİ

Çağl Zeynep SÜNGÜ

Yüksek Lisans, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. S. Ali TUNCEL

Haziran 2018, 81 sayfa

Tez kapsamında β -nikotinamid adenin dinükleotid (β -NAD), çekirdek-kabuk polimerizasyonu yöntemiyle normal ve manyetik özelliğe sahip monodispers-gözenekli silika mikroküreler üzerine moleküler olarak baskılanmıştır. Bu amaçla etilen glikol dimetakrilat çapraz bağlayıcı olarak kullanılmıştır. Her iki sorbent türü için alkali pH değerinde β -NAD, fenilborik aside yüksek bağlanma afinitesi göstermiş ve diol ile borik asit grupları arasında tersinir borat esteri oluşumu yoluyla baskılama sağlanmıştır. Molekül baskılama işleminin ardından β -NAD, mikrokürelerin yüzeyinden lauril sülfat-asetik asit çözeltisi ile uzaklaştırılmıştır. Kontrol grubu olarak, molekül baskılama yapılmayan normal ve manyetik silika mikroküreler, β -NAD molekülü kullanılmadan aynı yöntemle hazırlanmıştır. Molekül baskılanan ve baskılanmayan silika mikrokürelerin boyutu, morfolojisi ve gözeneklilik özellikleri Taramalı Elektron Mikroskobu, Geçirimli Elektron Mikroskobu, Fourier Transform Infrared Spektroskopisi ve Azot Adsorpsiyon Desorpsiyon Yöntemi ile analiz edilmiştir. β -NAD baskılanmış, normal ve

manyetik silika mikrokürelerin sorbent olarak kullanımıyla, borat afinite kromatografisi yöntemi kullanılarak, hedef molekül izolasyon davranışı incelenmiştir. İlk olarak, izolasyon davranışı kesikli sistemde hedef molekül derişimi, sorbent türü ve derişimi değiştirilerek çalışılmıştır. Kesikli sistemde, normal ve manyetik silika mikroküreler için 2.30-3.38 aralığında değişen molekül baskılama faktörü değerleri elde edilmiştir. Ardından β -NAD baskılanmış monodispers silika mikroküreler mikrokolonda sabit faz olarak kullanılmış ve sürekli sistemde mikro-borat afinite kromatografisi ile β -NAD izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, geliştirilen molekül baskılanmış sorbentin sürekli sistemde, mikro-borat afinite kromatografisi yöntemiyle diol grubu içeren biyomoleküllerin izolasyonunda başarıyla kullanılabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: oligonükleotid, molekül baskılama, borik asit, mikrokromatografi, borat afinite kromatografisi.

ABSTRACT

SYNTHESIS OF MAGNETIC SILICA BASED BORONATE AFFINITY CHROMATOGRAPHY SORBENTS AND INVESTIGATION OF THEIR CHROMATOGRAPHIC PERFORMANCE

Çağıl Zeynep SÜNGÜ

Master of Science, Bioengineering Department

Advisor: Prof. Dr. S. Ali TUNCEL

June 2018, 81 pages

In this study, β -nicotinamide adenine dinucleotide (β -NAD) was molecularly imprinted onto plain and magnetic silica microspheres in the monodisperse-porous form, by core-shell polymerization method. For this purpose, ethylene glycol dimethacrylate was used as crosslinking agent. For both sorbent species, at alkali pH values, β -NAD showed high binding affinity against phenylboronic boronic acid group and the molecular imprinting was achieved by cyclic boronate ester formation between diol and boronic acid moieties. Following to imprinting, β -NAD was removed from the imprinted microspheres with lauryl sulfate-acetic acid solution. As a control group, bare and magnetic silica microspheres were prepared by the same method without using β -NAD molecule as the template. Molecularly imprinted and non-imprinted silica microspheres were analyzed in terms of their size, morphology, the porous properties through Scanning Electron Microscopy, Transmission Electron Microscopy, Fourier Transform Infrared Spectroscopy and nitrogen adsorption-desorption method. The target

molecule isolation behavior was investigated by using borate affinity chromatography with β -NAD-imprinted, bare and magnetic silica microspheres as the sorbents. First, the isolation behavior was investigated by changing the target molecule concentration, sorbent type and concentration in the batch system. The imprinting factors ranging between 2.30-3.38 for bare and magnetic silica microspheres were obtained in batch system. Subsequently, β -NAD-imprinted monodisperse silica microspheres were used as a stationary phase in a microcolumn and β -NAD isolation was carried out by borate affinity micro-chromatography in the continuous system. The results showed that the developed sorbent could be successfully used in the continuous system for the isolation of biomolecules containing diol groups by micro-borate affinity chromatography.

Keywords: oligonucleotide, molecular imprinting, boronic acid, microchromatography, boronate affinity chromatography.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez sürecinde, bana laboratuvarında çalışma olanağını sağlayan ve bu süre zarfında kişisel gelişimime katkı sağlayan ve akademik altyapımın oluşmasına çok şey katan, en zor anlarımda engin birikimi ve tecrübesiyle yol gösteren Saygıdeğer Hocam, Tez Danışmanım Prof. Dr. Ali Tuncel'e;

Yüksek lisans çalışmalarım esnasında, bana her anlamda destek olan, laboratuvarımı açan ve beni sürekli motive eden sevgili hocam Doç. Dr. Selis Önel'e;

Tez çalışmalarımın ilerlemesinde, yoğun laboratuvar programına rağmen benden ilgisini ve desteğini hiç esirgemeyen, bir an olsun beni yalnız bırakmayan, çoğu zaman geç saatlere kadar laboratuvarda benimle kalarak destek olan değerli hocam Dr. Çiğdem Kip'e;

Yüksek lisans serüvenim boyunca kendilerinden hayata dair çok şey öğrendiğim mutlu günümde, kötü günümde hep benimle olan bana hep sevgiyle yaklaşan beni koruyup kollayan sevgili Hatice ve Serpil ablalarıma;

Yüksek lisans hayatım boyunca aynı laboratuvarı paylaştığım, yeri geldiğinde beni eğlendiren yeri geldiğinde espirileriyle beni stres ortamından çıkararak gülümseten laboratuvar arkadaşlarım Erhan Şenlik, Sercan Gökçeli' ye; Enerjisi hiç bitmeyen ve bu konuda yaklaşımlarına imrendiğim Güneş Kibar'a; Güzel dostluklarıyla laboratuvar ortamını daha eğlenceli kılan Bensu Alan ve Ebru Sağ'a; Desteği ve cana yakınlığı için Eda Ögüt'e ve birlikte güzel zamanlar geçirdiğimiz laboratuvar arkadaşlarıma;

Yüzünde gülümsemesi hiç eksik olmayan sevgili hocam Dr. Özlem Hamaloğlu' na; FT-IR analizleri boyunca yardımını ve desteğini hiç esirgemeyen Belgin Aslan'a;

Sağladığı hizmetler için Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezine;

Birbirimize olan desteğimizle en zor günleri birlikte atlattığımız, sıcacık sevgilerini hep hissettiğim “Çok Mutlu Kedili Aile” üyelerine;

Hayatım boyunca her anlamda beni destekleyen, her şeyini ortaya koyan, sevgisiyle bana moral veren canım annem Burçak Süngü ve babam Tayyar Süngü' ye; Biricik kız kardeşim İlke Süngü' ye; Ailemizin neşe kaynağı olan ve tez yazma sürecimde gece geç saatlere kadar bana eşlik eden canım kedim Puding'e;

Son bir yıldır hayatımı daha da anlamlandıran ve güzelleştiren, bütün iyi ve kötü zamanlarımda yanımda olan, bütün kalbiyle desteğini hissettiren ve ileride yaşayacağımız güzel günler için sevgili Murat Akdoğan' a;

En içten dileklerle teşekkürlerimi sunarım.

Çağıl Zeynep SÜNGÜ

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.Molekül Baskılama Yöntemi.....	3
2.1.1. Şablon Molekül	4
2.1.2. Monomerler ve Çapraz Bağlayıcılar.....	4
2.1.3. Gözenek Yapıcı Çözücü	6
2.1.4. Başlatıcı.....	6
2.2. Molekül Baskılama Teknikleri.....	7
2.2.1.Yığın Baskılama.....	7
2.2.2. Yüzey Baskılama.....	7
2.2.3. Çekirdek-Kabuk Metodu	8
2.3. Molekül Baskılamanın Kullanım Alanları	10
2.3.1. Analitik Ayrımlar	10
2.3.2. Sensörler	12
2.3.3. İlaç Salınımı.....	13

2.4. Nükleotid ve Nükleositlerin Molekül Baskılaması	14
2.5. β -Nikotinamid Adenin Dinükleotid.....	16
2.6. Borat Afinite Kromatografisi.....	18
2.7. Monodispers Silika Mikroküre Sentezi	21
3.DENEYSEL ÇALIŞMA	24
3.1. Molekül Baskılama İçin Destek Materyali Sentezi	24
3.1.1. Çekirdek Malzeme Olarak Kullanılan Silika Mikrokürelerin Sentezi	24
3.1.1.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	24
3.1.1.2. Monodispers Polimerik Mikrokürelerin Sentezi	25
3.1.1.2.1. Poli(glisidil metakrilat) Mikroküre Sentezi.....	25
3.1.1.2.2.Poli(metakrilik asit-co-etilen glikol dimetakrilat), Poli(MAA-co-EGDMA) Mikrokürelerin Sentezi.....	25
3.1.1.3. Monodispers-Gözenekli Silika Mikrokürelerin Sentezi.....	26
3.1.1.4. Manyetik Özellikte Monodispers-Gözenekli Silika Mikrokürelerin Sentezi.....	27
3.1.2.Normal ve Manyetik Formdaki Destek Materyallerine Molekül Baskılama Yapılması..	28
3.1.2.1. Kullanılan Malzemeler	28
3.1.2.2. Normal Silika Mikrokürelere Molekül Baskılama Yapılması.....	30
3.1.2.3. Manyetik Özelliğe Sahip Silika Mikrokürelere Molekül Baskılama Yapılması.....	31
3.2. Molekül Baskılamada Kullanılan Mikrokürelerin Karakterizasyonu	32
3.2.1. Yüzey Alan Ölçümü	32
3.2.2. Taramalı Elektron Mikroskobu	33
3.2.3. Geçirimli Elektron Mikroskobu	34
3.2.4. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi	34
3.2.5. Titreşimli Örnek Manyetometrisi Analizi	35
3.2.6. Kolon Basınç Testi	35

3.3. Molekül Baskılanmış Sorbentler ile Adsorpsiyon/Desorpsiyon Deneyleri.....	35
3.3.1. Kesikli Sistem Adsorpsiyon Deneyleri.....	36
3.3.1.1. Sorbent Derişiminin Etkisi	36
3.3.1.2. İzoterm Eldesi.....	36
3.3.1.3. Spektrofotometrik Yöntemle β -NAD Derişiminin Tayini	38
3.3.1.4. Kesikli Sistemde Tekrar Kullanılabilirlik	39
3.3.1.5. Farklı Moleküller ile Adsorpsiyon Deneyleri.....	39
3.3.2. Sürekli Sistemde Adsorpsiyon Deneyleri.....	41
3.3.2.1. Mikro-kolonda Tekrar Kullanılabilirlik Deneyleri.....	43
4. SONUÇ ve TARTIŞMALAR	44
4.1. Karakterizasyon.....	44
4.1.1. Gözeneklilik Analizi Sonuçları	44
4.1.2. Mikrokürelerin Morfolojik Analizi	48
4.1.3. Mikrokürelerin Yığın Yapısı	51
4.1.4. Mikrokürelerin FTIR-ATR Analizi	54
4.1.5. Mikrokürelerin VSM Analizi	57
4.1.6. Kolon Geri Basınç Testi	59
4.2. MIP ve NIP için β -NAD Adsorpsiyon Deneyleri.....	59
4.2.1. Kesikli Sistem Çalışmaları	60
4.2.1.1. Sorbent Derişiminin Etkisi.....	60
4.2.1.2. β -NAD Başlangıç Derişiminin Denge Adsorpsiyonu Üzerindeki Etkisi.....	62
4.2.1.3. Tekrar Kullanılabilirlik Testleri.....	65
4.2.1.4. Seçicilik	66
4.2.2. Mikroakışkan Sistemde β -NAD Adsorpsiyon Deneyleri.....	68
4.2.2.1. Kolonda Tekrar Kullanılabilirlik	69

5. SONUÇLAR.....	72
KAYNAKLAR.....	75
ÖZGEÇMİŞ.....	81



ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Molekül baskılamada sıklıkla kullanılan fonksiyonel monomerler.....	5
Çizelge 2.2. Molekül baskılamada sıklıkla kullanılan çapraz bağlayıcılar.....	6
Çizelge 2.3. Molekül baskılama ve borat afinite yönteminde sıklıkla kullanılan monomerler....	20
Çizelge 2.4. Molekül baskılama ve borat afinite kromatografisi yönteminde sıklıkla kullanılan çapraz bağlayıcılar.....	21
Çizelge 3.1. Molekül baskılama sorbent sentezi sırasında kullanılan temel kimyasallar.....	29
Çizelge 4.1. Silika mikroküreler, MIP ve NIP için özgül yüzey alanı, gözenek hacmi ve ortalama gözenek boyutu.....	46
Çizelge 4.2. Manyetik silika, MMIP ve MNIP için özgül yüzey alanı, gözenek hacmi ve ortalama gözenek boyutu değerleri.....	47
Çizelge 4.3. Silika mikroküreler ve MIP için ortalama boy ve değişim katsayısı değerleri.....	49
Çizelge 4.4. Manyetik silika ve MMIP için ortalama boy ve değişim katsayısı değerleri.....	51

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 2.1. Molekül baskılamada kullanılan çekirdek- kabuk yöntemi..	10
Şekil 2.2. Geleneksel katı faz mikro ekstraksiyon yöntemi.	11
Şekil 2.3. RNA'da bulunan riboz ve DNA'da bulunan deoksiriboz arasındaki fark olarak ribozun 2'-karbonunda bir hidroksil grubuna sahip olması.	15
Şekil 2.4. β -Nikotinamid adenin dinükleotid' in molekül yapısı.	17
Şekil 2.5. Stöber yöntemine ait reaksiyon gösterimi.....	22
Şekil 3.1. Monodispers gözenekli silika mikroküre sentezinin aşamaları.....	27
Şekil 3.2. Silika mikroküreler üzerine TMSPM' nin kovalent olarak bağlanması.	30
Şekil 3.3. Farklı başlangıç derişimlerinde β -NAD adsorpsiyon ortamlarının hazırlanması.....	37
Şekil 3.4. MIP ve MMIP seçimlilik davranışının belirlenmesi için kullanılan analitler.	40
Şekil 3.5. Mikro-borat afinite kromatografisi deney düzeneği.....	41
Şekil 4.1. Silika, MIP ve NIP mikroküreler için azot adsorpsiyon/ desorpsiyon yöntemi ile elde edilen gözenek boy dağılım eğrileri	45
Şekil 4.2. Manyetik silika, MMIP ve MNIP mikroküreler için azot adsorpsiyon/ desorpsiyon yöntemi ile elde edilen gözenek boy dağılım eğrileri.....	47
Şekil 4.3.A), C), E) Silika mikroküreler ve B), D), F) MIP için yüzey morfolojisi, ortalama boy ve boy dağılımını gösteren SEM görüntüleri. Büyütme oranı: (A-B): 2000X, (C-D) 20000X, (E-F) 77000X.....	48
Şekil 4.4.A), C), E) Manyetik silika ve B), D), F) MMIP için yüzey morfolojisi, ortalama boy ve boy dağılımını gösteren SEM görüntüleri. Büyütme oranı: (A-B): 2000X, (C-D) 17000X, (E-F) 60000X.....	50

Şekil 4.5. A) Silika mikroküreler ve B) MIP için karşılaştırmalı TEM görüntüleri.....	52
Şekil 4.6. MIP için mikroküre üzerinde seçilen bölgeye göre elde edilen EDX sonuçları.	52
Şekil 4.7. A) Manyetik özelliğe sahip silika kaplı silika mikroküreler ($\text{SiO}_2@\text{Mag SiO}_2$), B) Manyetik özelliğe sahip silika kaplı silika mikrokürelerin molekül baskılanmış formu (MMIP).	53
Şekil 4.8. MMIP için mikroküre üzerinde seçilen bölgedeki EDX analizi	54
Şekil 4.9. (A) β -NAD baskılanmış normal silika, (B) β -NAD baskılanıp uzaklaştırılmış silika mikrokürelerin FTIR-ATR spektrumları.....	55
Şekil 4.10. (A) β -NAD baskılanmış manyetik silika, (B) β -NAD baskılanıp uzaklaştırılmış manyetik silika mikrokürelerin FTIR-ATR spektrumları.....	56
Şekil 4.11. A) Silika kaplı manyetik silika mikroküreler ($\text{SiO}_2@\text{MagSiO}_2$), B) TMSPM bağlı-silika kaplı manyetik silika mikroküreler ($\text{TMSPM}@\text{SiO}_2@\text{MagSiO}_2$), C) MMIP, D) MNIP için ait titreşimli örnek manyetometresi ile elde edilen manyetizasyon doygunluk eğrileri.....	58
Şekil 4.12. MIP ve NIP ile dolgulanmış mikrokolon için geri-basıncın hareketli faz akış hızı ile değişimi. Kolon: 50 mm x300 μm i.ç., Hareketli faz: %10 SDS/ % 10 asetik asit içeren sulu çözelti.....	59
Şekil 4.13. Normal formdaki MIP ve NIP için sorbent miktarının β -NAD denge adsorpsiyonu ve molekül baskılama faktörü (IF) üzerindeki etkisi. IF değerleri grafik üzerinde kırmızı font ile gösterilmiştir.	61
Şekil 4.14. MMIP ve MNIP için sorbent miktarının β -NAD denge adsorpsiyonu ve molekül baskılama faktörü (IF) üzerindeki etkisi. IF değerleri grafik üzerinde kırmızı font ile gösterilmiştir.....	62
Şekil 4.15. başlangıç β -NAD derişiminin molekül olarak baskılanmış ve baskılanmamış silika mikrokürelerin β -NAD denge adsorpsiyonu ve molekül baskılama faktörü (IF) üzerindeki etkisi. IF değerleri grafik üzerinde kırmızı font ile gösterilmiştir.....	63

Şekil 4.16. MMIP ve MNIP için β -NAD başlangıç derişiminin β -NAD denge adsorpsiyonuna etkisi. IF değerleri grafik üzerinde gösterilmiştir.....	64
Şekil 4.17. MIP ve NIP için tekrar kullanılabilirlik sonuçları. IF değerleri grafik üzerinde gösterilmiştir.....	65
Şekil 4.18. MMIP ve MNIP için tekrar kullanılabilirlik sonuçları. IF değerleri grafik üzerinde gösterilmiştir.....	66
Şekil 4.19. MIP ve NIP sorbentlerinin β -NAD dahil farklı hedef moleküllere karşı gösterdiği seçicilik davranışı. IF değerleri grafik üzerinde gösterilmiştir.....	67
Şekil 4.20. MMIP ve MNIP sorbentlerinin β -NAD dahil farklı hedef moleküllere karşı gösterdiği seçicilik davranışı. IF değerleri grafik üzerinde gösterilmiştir.....	68
Şekil 4.21. MIP kullanılarak oluşturulan mikro-borat afinite kromatografi sisteminde β -NAD mikrokolon çıkış derişiminin zamanla değişimi. Adsorpsiyon koşulları: Besleme akış hızı: 2 μ L/dak, Mobil faz: pH 8.5, 25 mM HEPES tamponu, Oda sıcaklığı.....	69
Şekil 4. 22. MIP için mikro-borat afinite kromatografi sisteminde mikrokolon çıkışında β -NAD derişiminin zamanla değişimi. Adsorpsiyon koşulları: β -NAD derişimi: 0.05 mg/ mL, Mobil faz akış hızı: 2 μ L/dak, Mobil faz: pH 8.5, 25 mM HEPES tamponu, Oda sıcaklığı.....	70
Şekil 4. 23. MIP için mikro-borat afinite kromatografi sisteminde adsorpsiyon veriminin deney sayısı ile değişimi (%). Adsorpsiyon koşulları: β -NAD derişimi: 0.05 mg/mL, Besleme akış hızı: 2 μ L/ dak, Mobil faz: pH 8.5 25 mM HEPES tamponu, Oda sıcaklığı.....	71

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

μm	Mikrometre
mm	Milimetre
g	Gram
mg	Miligram
mL	Mililitre
μl	Mikrolitre
rpm	Dakikadaki dönme hızı (Rate per minute)
mM	Milimolar
M	Molar
W	Watt
D_n	Sayıca ortalama çap
N_i	D_i çap değerine sahip kürelerin sayısı
D_i	Küre çap değeri
CV	Boy dağılımı için değişim katsayısı
N_T	Toplam küre sayısı
dak	Dakika
nm	Nanometre
A_0	Adsorpsiyon ortamında başlangıç absorbans
A_f	Adsorpsiyon sonrası absorbans
q	Denge adsorpsiyon değeri (mg hedef molekül/ g sorbent)
C_0	Başlangıç hedef molekül derişimi (mg hedef molekül/ mL)
V	Adsorpsiyon çözeltisi hacmi (mL)
m_a	Sorbent kütlesi (g)

Q_{MIP}	Molekül baskılanmış sorbentin denge adsorpsiyon değerini
Q_{NIP}	Molekül baskılanmamış sorbentin denge adsorpsiyon değerini
θ	β -NAD adsorpsiyon verimi
$M_{\beta-NAD, Y\u00fcklenen}$	Mikrokolona y\u00fcklenen β -NAD miktarı (mg)
$M_{\beta-NAD, Adosrplanmayan}$	Adsorpsiyon sırasında toplanan \u00f6rne\u011fin β -NAD miktarı (mg)
Q	Adsorpsiyon ortamı akı\u015f hızı (μ l/dak)
t	Adsorpsiyon ortamı akı\u015f s\u00fcresi (dak.)
V_A	Adsorpsiyon sırasında toplanan \u00f6rne\u011fin hacmi (μ l)
C_A	Adsorpsiyon sırasında toplanan \u00f6rne\u011fin β -NAD deri\u015fimi (mg/ μ l)
s	Saniye

Kısaltmalar

β -NAD	β -Nikotinamid adenin din\u00fckleotid
RNA	Ribon\u00fckleik asit
HPLC	Y\u00fcksek Performanslı sıvı kromatografisi (High performance liquid chromatography)
TLC	\u00dcsce tabaka kromatografisi (Thin layer chromatography)
CE	Kapiler elektroforez (Capillary electrophoresis)
BAC	Borat afinite kromatografisi (Boronate affinity chromatography)
MIT	Molek\u00fcl baskılama teknolo\u011fisi (Molecular imprinting technology)

VPBA	4- vinilfenilboronik asit
DMAPMA	4-dimetilaminopropil metakrilamid
EGDMA	Etilen glikol dimetakrilat
MAA	Metakrilik asit
THF	Tetrahidrofuran
DMF	N, N-dimetilformamid
AIBN	Azobisisobutironitril
UV	Mor ötesi (Ultra Violet)
QCM	Kuvars kristal mikrobalans (Quartz Crystal Microbalance)
SPE	Katı faz ekstraksiyonu (Solid phase extraction)
SPME	Katı faz mikroekstraksiyon (Solid phase microextraction)
DNA	Deoksiribonükleik asit
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid
FAD	Flavin adenin dinükleotid
PARP	Poli(ADP-riboz) polimeraz
NADP	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
APBA	3-Aminofenilboronik asit
DFFPBA	2,4-difloro-3-formilfenilboronik asit
HPBA	4-Hidroksifenilboronik asit
MBA	N,N'-metilenbis akrilamid
PEGDA	Poli (etilen glikol) diakrilat
TEOS	Tetraetil ortosilikat
GMA	Glisidil metakrilat
TBAI	Tetrabütül amonyum iyodür
EB	Etilbenzen
PVP-K-30	Polivinilpirolidon K-30
SDS	Sodyum dodesil sülfat (lauril)
HCl	Hidroklorik asit

PVA	Polivinil alkol
BPO	Benzoil peroksit
NaOH	Sodyum hidroksit
EtOH	Etil alkol
Iso-PrOH	İzopropil alkol
TMSPM	3-trimetoksisililpropil metakrilat
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetan sülfonik asit
MAG SiO ₂ @ SiO ₂	Silika kaplı manyetik özelliğe sahip silika mikroküreler
MIP	β-NAD baskılanmış monodispers silika mikroküreler
NIP	β-NAD baskılanmamış monodispers silika mikroküreler
MMIP	Manyetik özelliğe sahip ve β-NAD baskılanmış monodispers silika mikroküreler
MNIP	Manyetik özelliğe sahip ve β-NAD baskılanmamış monodispers silika mikroküreler
BET	Brunauer, Emmett ve Teller
SEM	Taramalı elektron mikroskobu (Scanning electron microscope)
TEM	Geçirimli electron mikroskobu (Transmission electron microscope)
EDX	Enerji yayımlı X-Işını Analizi
FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (Fourier transform infrared spectroscopy)
VSM	Titreşimli örnek manyetometrisi (Vibrating Sample Magnetometer)
IF	Molekül baskılama faktörü

1. GİRİŞ

Nükleositler, nükleotidler, oligonükleotidler, sakkaridler, glikoenzimler ve glikoproteinler gibi vücudun temel yapıtaşlarını oluşturan biyomoleküllerin yapısında cis-diol grubu bulunmaktadır [1-4]. Örneğin RNA molekülü birçok nükleotidin birleşmesinden oluşmaktadır. Modifiye edilmiş nükleositlerin anormal seviyesinin, kanser oluşumundan diyabete ve Alzheimer hastalığına kadar bir sürü hastalıkla ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu bağlamda, biyolojik sıvılarda modifiye nükleositlerin belirlenmesi son yıllarda araştırmacıların da büyük ilgisini çekmektedir [5]. Kanser hastalığı, günümüzdeki en önemli sağlık problemlerinden biridir. Kanserın erken teşhisi ve tedavisinde, kanda bulunan tümör belirteçlerinin tayin edilmesi oldukça önem taşımaktadır. Kanser hücrelerinin yüzeyinde bulunan glikoproteinlerin yapısındaki değişiklikler, kanserin evresi ve ilerleyişi hakkında bilgi sağlamaktadır [6-9]. Bu nedenle hastalıkların teşhisinde, cis-diol molekülünün tespiti oldukça önemlidir [10]. Son yıllarda, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (High Performance Liquid Chromatography- HPLC), İnce Tabaka Kromatografisi (Thin Layer Chromatography-TLC) ve Kapiler Elektroferez (Capillary Electrophoresis CE) yöntemleri biyomoleküllerin tespiti ve ayrımı için kullanılmaktadır [2]. Bu yöntemlere ek olarak borat afinite kromatografisi (Boronate Affinity Chromatography-BAC), cis-diol içeren bileşiklerin spesifik izolasyonuna ve ayrılmasına izin veren eşsiz bir afinite kromatografi yöntemidir. Bu yöntemin ana prensibi, alkali sulu bir çözeltide boronik asit ve cis-diol içeren molekül arasında kovalent kompleksin oluşması ve ortam asidik olunca da, aradaki bağın ayrışmasına dayanmaktadır [11].

Molekül baskılama teknolojisi (Molecular Imprinting Technology-MIT), çeşitli uygulama alanlarında ideal malzemeler olarak kullanılabilen, belirli bir analiz için önceden belirlenmiş bir seçicilik ve özgüllüğe sahip yapay reseptörler tasarlamak için kullanılan yöntemlerden biridir. Molekül baskılama işlemi, bir hedef molekül şablonun etrafında bir çapraz bağlayıcı ve polimerde seçici tanıma bölgelerinin oluşturulması esasına dayanır. Baskılanan hedef molekül, daha sonra sorbent üzerinden uzaklaştırılarak molekül boşluklara sahip sorbentler elde edilmektedir. Molekül baskılanmış polimer yüksek stabilitesi, yüksek tanıma kabiliyeti, düşük maliyeti ve tekrarlı kullanılabilirliğinden dolayı tercih edilmektedir. Molekül baskılanmış yapıların yüksek uygulama potansiyelleri olmasına rağmen, makromoleküllerin

değişken yapıları ve büyük boyutlara sahip olmasından dolayı, bu moleküllerin baskılanması zordur. Bununla beraber çekirdek-kabuk yöntemiyle, kütle transferi ve desorpsiyon sınırlamalarının üstesinden gelmek mümkündür. Bu yöntemde, merkezde bir çekirdek malzeme bulunmaktadır. Bu çekirdek etrafında fonksiyonel monomerler ve çapraz bağlayıcılar kullanılarak polimerizasyon gerçekleştirilmektedir. Polimerizasyon sırasında, çekirdeğin etrafında polimer kabuğu oluşmaktadır. Çekirdekte bulunan malzeme, genellikle silika veya polimerden oluşmaktadır [12-17].

Tez kapsamında cis-diol grubu içeren β -nikotinamid adenin dinükleotid (β - NAD), molekül baskılama yöntemi kullanılarak izole edilmiştir. β -NAD molekülü, metabolitler arasında hidrojen ve elektron transferinde görevli, çok önemli bir koenzimdir. β - NAD, bütün canlı hücrelerde bulunmakta olup, iki nükleotidden oluşmaktadır. Bunlardan biri adenin diğeri de nikotinamid kısmıdır [18, 19]. Normal ve manyetik formda molekül baskılanmış sorbentler, silika mikroküreler üzerinde şablon olarak seçilen β -NAD molekülü varlığında sentezlenmiştir. Bu sentezlerde 4-vinilfenilboronik asit (VPBA) ve 4-dimetilaminopropil metakrilamid (DMAPMA) fonksiyonel monomer ve etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) ise çapraz bağlayıcı olarak kullanılmıştır. Sentez sonrasında, β -NAD molekülü ortam pH'ı değiştirilerek sorbent mikroküre yüzeyinden uzaklaştırılmıştır. Molekül baskılanmış sorbentler ile β -NAD molekülünün izolasyon deneyleri, hem sürekli sistemde hem de kesikli sistemde yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Molekül Baskılama Yöntemi

Yeni analitik tekniklerin araştırılmasında molekül baskılanmış polimerler, cazip özelliklere sahip sorbentler olarak kullanılmaktadır [20]. Doğada bulunan tanıma işlemlerini taklit edebilen sentetik malzemelerin tasarımı, son yıllarda oldukça önem verilen çalışma alanlarından biridir. Molekül baskılama tekniği ile doğal sistemlere benzer şekilde, molekül tanıma kabiliyetine sahip malzemeler oluşturulabilir. Bu nedenle molekül baskılama yöntemi son yıllarda aktif bir araştırma alanı haline gelmiştir. Molekül baskılanmış polimer sentezi, amino asitler, proteinler, nükleotid türevleri, ilaçlar ve yiyecekleri içeren, biyolojik ve kimyasal molekülleri tanıyabilen umut verici bir teknik olarak kabul edilmektedir [12]. Glikoproteinler, glikanlar ve monosakkaritler vücutta çok düşük derişimlerde ve çok daha yüksek derişimde bulunan benzer moleküller ile birlikte bulunmaktadır. Bu nedenle, bu biyomolekülleri spesifik olarak tanımlamak önemlidir. MIT, karmaşık örneklerden şablon molekülün spesifik ekstraksiyonu alanında yaygın bir uygulama potansiyeli sunmaktadır [12, 14, 16]. Ayrıca, uygulama alanları arasında, ayırma ve saflaştırma, kataliz, kimyasal sensörler ve ilaç salımı bulunmaktadır.

Molekül baskılanmış polimer sadece üç boyutlu yapısı yüzünden değil, aynı zamanda polimerik ağıın boşluklarındaki spesifik bağlanma gruplarını oluşturması nedeniyle, hedef moleküle afinite ve seçiciliği sağlar [21]. Molekül baskılama yöntemi, fonksiyonel ve çapraz bağlayıcı monomerlerin bir kalıp molekül eşliğinde polimerizasyonu ile oluşmaktadır [20]. Yöntemde şablon (baskılanacak hedef molekül) çapraz bağlayıcı olmadan önce fonksiyonel monomerle etkileşir, ardından polimerizasyon işlemi ile çapraz bağlayıcı kullanılarak polimerik matriste sabitlenir [22]. Ortaya çıkan baskılanmış malzemede şablon için yapısal ve kimyasal hafıza bulunur. Şablon molekül yapıdan uzaklaştırıldığında bile bu malzemedeki seçicilik sayesinde malzeme, şablon molekülün bulunduğu karışıma atıldığı zaman, şablon tekrar malzemeye bağlanmaktadır. [20] Molekül baskılama kavramına uyan yapay tanıma malzemeleri, Dickey'in 1955'teki öncü çalışmasına dayanmaktadır [23, 24]. 1970'lerin başında Wulff ve Klotz molekül baskılama kavramını tanıtmıştır. Organik polimerlerde baskı şablonlarıyla resmedilen bu kavram, moleküler boşlukları hassas bir şekilde tasarlamak için yeni ufuklar açmıştır [23, 25, 26]. 1993 yılında ise Mosbach ile gerçek bir atılım

gerçekleştirmiştir. Mosbach'ın yaptığı çalışmada molekül baskılanmış yapının biyosensörlerde antikorların yerini alabildiğini kanıtlayan radyo-etiketli bir ligand bağlama deneyi gerçekleştirilmiştir [23, 27]. Tipik bir molekül baskılanmış polimer sentez protokolü, polimerizasyon başlatıcısı ve bir çözücü içinde şablon molekül, fonksiyonel monomer ve çapraz bağlayıcı içermektedir [28].

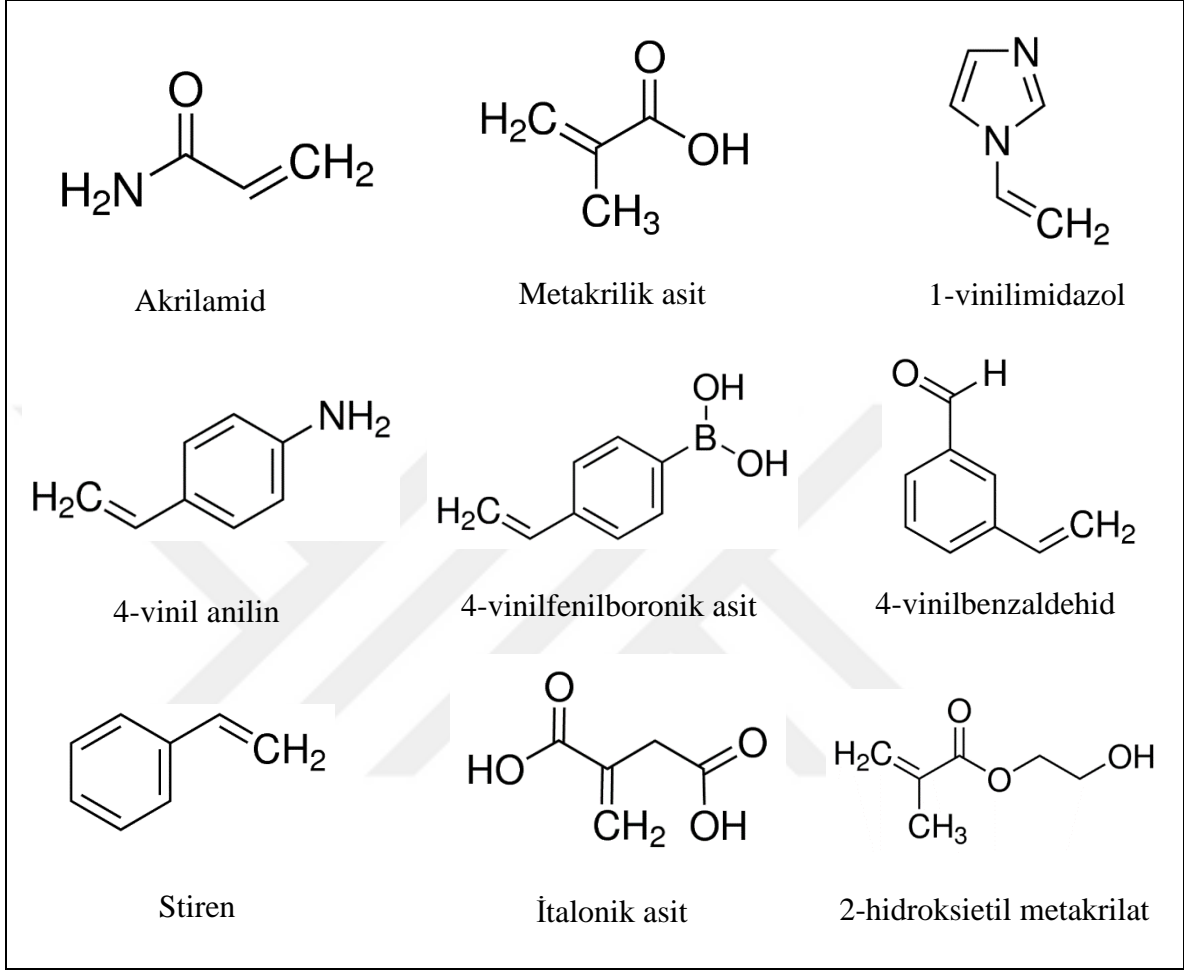
2.1.1. Şablon Molekül

Hedef molekülün polimere bağlanması ve polimer tarafından tanınması için etkileşim alanlarının sayısı ve şablonun şekli önemlidir [22]. Genel olarak, bir ideal şablon molekülü şu özellikleri taşımalıdır. İlk olarak polimerizasyonu önlemeyen fonksiyonel gruplar içermelidir, ikinci olarak polimerizasyon reaksiyonu sırasında mükemmel bir kimyasal kararlılık sergilemeli, ve fonksiyonel monomerlerle kompleks oluşturabilen fonksiyonel gruplar içermelidir [28]. Günümüzde küçük moleküllerin baskılanması rutin haline gelmişken, büyük makromoleküllerin (proteinler, hücreler, vb.) baskılanması üzerinde yapılan çalışmalar geliştirilmektedir. Büyük moleküllerin baskılanmasındaki zorluk, büyük şablonların daha rijid yapıda olması ve bu nedenle bağlanma boşluklarının oluşturulmasının daha zor olmasıdır [29].

2.1.2. Monomerler ve Çapraz Bağlayıcılar

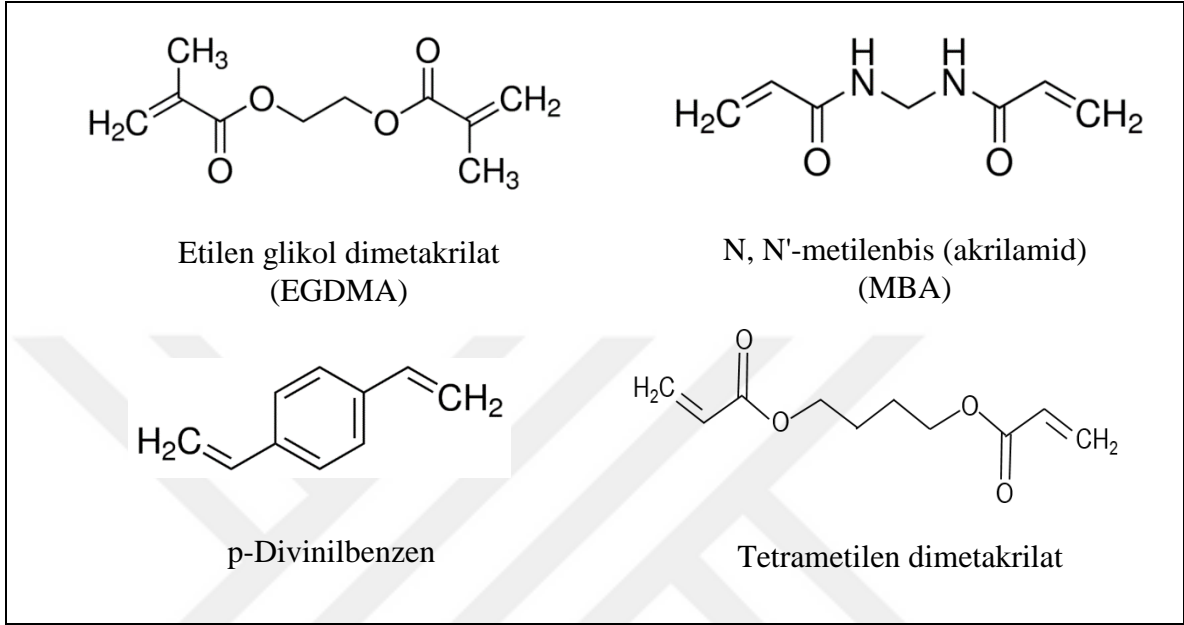
Molekül baskılamada fonksiyonel monomerin rolü, fonksiyonel gruplar sağlayarak şablonla bir kompleks oluşturmaktır [28]. Baskılı malzemelerin sentezlenmesi için en iyi monomerler, şablon-monomer etkileşimlerinin gücü ve yapısı göz önüne alınarak seçilmektedir [22]. Metakrilik asit (MAA), hidrojen bağ verici ve alıcı özellikleri nedeniyle “evrensel” bir fonksiyonel monomer olarak kullanılmaktadır. Genel olarak, fonksiyonel bir monomer iki tip birimden oluşur. Biri tanıma birimi, diğeri de vinil veya alkoksisilan gibi polimerleşebilir bir birimdir [28]. Çizelge 2. 1’ de molekül baskılamada sıklıkla kullanılan monomerler gösterilmektedir.

Çizelge 2. 1. Molekül baskılamada sıklıkla kullanılan fonksiyonel monomerler.



Polimerizasyon işleminde, şablon moleküllerin etrafındaki fonksiyonel monomerleri sabitlemek için bir çapraz bağlayıcı kullanılır, böylece şablonların çıkarılmasından sonra, yüksek çapraz bağlı bir katı polimer elde edilir. Çapraz bağlayıcının türü ve miktarı, molekül baskılanmış polimerin seçicilik ve bağlanma kapasitesini etkiler. Genellikle, çok düşük çapraz bağlayıcı miktarı, düşük çapraz bağlama derecesi nedeniyle kararsız mekanik özellikler ile sonuçlanmaktadır. Çok yüksek miktarda çapraz bağlayıcı molekül baskılanmış polimerin birim kütlesi başına tanıma alanlarının sayısını azaltır [28]. Çizelge 2. 2' de sıklıkla kullanılan çapraz bağlayıcılardan bazı verilmektedir.

Çizelge 2. 2. Molekül baskılamada sıklıkla kullanılan çapraz bağlayıcılar.



2.1.3. Gözenek Yapıcı Çözücü

Gözenek yapıcı çözücü polimerizasyon işleminde gözenek oluşturucu madde olarak görev yapar [28]. Gözenek yapıcı çözücü, özgül yüzey alanı ve ortalama gözenek boyutu gibi polimerin morfolojik özelliklerini etkiler [30]. İlk olarak, şablon molekül, başlatıcı, monomer ve çapraz bağlayıcı, porojen içinde çözünür olmalıdır. İkincisi gözenek yapıcı çözücü, polimerik yapıda moleküllerin taşınımı için yeterli gözeneklilik özelliklerini sağlamalıdır. Üçüncü olarak yüksek seçiciliğe sahip molekül baskılanmış polimer elde etmek için, çözücü düşük polariteye sahip olmalıdır [29]. Genellikle, molekül baskılanmış polimer sentezi için kullanılan gözenek yapıcı çözücüler, 2-metoksietanol, metanol, tetrahidrofuran (THF), asetonitril, dikloroetan, kloroform, N, N-dimetilformamid (DMF) ve toluen'dir [28].

2.1.4. Başlatıcı

Molekül baskılanmış polimerlerin büyük çoğunluğu, serbest radikal polimerizasyonu, fotopolimerizasyon ve elektropolimerizasyon ile hazırlanmaktadır. Serbest radikal polimerizasyonu, çok çeşitli fonksiyonel gruplar ve şablon yapıları için termal veya fotokimyasal olarak başlatılabilmektedir. Peroksi bileşiklerinin yanı sıra, azo bileşikleri de

başlatıcı olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır [28]. Bir başlatıcının radikallere bozunması, kimyasal yapısına bağlı olarak ısı, ışık ve kimyasal/elektrokimyasal araçlar dahil olmak üzere bir çok yolla tetiklenip, kontrol edilebilmektedir [29]. Sıklıkla tercih edilen azobisisobutironitril (AIBN) en uygun olarak 50-70°C' lik bozunma sıcaklıklarında kullanılabilir gibi, aynı zamanda fotoliz (UV) yoluyla da kullanılabilir [28, 29].

2.2. Molekül Baskılama Teknikleri

2.2.1. Yığın Baskılama

Uygun bir sentez yönteminin seçimi, arzu edilen özelliklere sahip molekül baskılanmış polimer üretimi için kritik öneme sahiptir. Genellikle molekül baskılanmış polimer hazırlanması, serbest radikal polimerizasyonu veya sol-jel yöntemi ile yapılmaktadır. En yaygın kullanılan yöntem, bir serbest radikal polimerizasyonu türü olan yığın polimerizasyondur [28]. Bu yöntem, molekül baskılanmış polimer sentezinde kullanılan ilk yöntemdir [31]. Yığın polimerizasyonu sonrasında küçük parçacıklar elde etmek için mekanik öğütme ve eleme işlemleri gerekir. Ancak bu durum, doğrudan mikroküre eldesine dayalı molekül baskılanmış polimer formuna kıyasla daha düşük bir bağlanma kapasitesine neden olur [28]. Yığın polimerizasyonunda şablon molekül doğrudan monomer içeren ortama eklenir. Bu nedenle, yöntemde etkileşim alanı sadece malzemenin yüzeyinde mevcut değildir, şablon molekül aynı zamanda matrisin tüm kütlesi içinde dağılır [32]. Yığın polimerizasyonu küçük moleküllerin baskılanmasında daha çok kullanılmaktadır. Aynı zamanda makromoleküller içinde kullanılır. Fakat proteinlerin baskılanması ile ilgili yapılan çalışmalarda görülmüştür ki, yığın polimerizasyonunda yaşanan polidispersite malzeme üzerindeki bağlanma noktalarını kısıtlamaktadır [33]. Buna ek olarak, malzemenin morfolojisine bağlı olarak, şablon molekül matrise derin bir şekilde gömülür, bu da desorpsiyonun zor olmasına neden olur. Sonuç olarak büyük moleküllerde, seçicilik ve difüzyon sınırlamaları nedeniyle yığın baskılama yöntemi çok tercih edilmez [34].

2.2.2. Yüzey Baskılama

Yüzey baskılama tekniğinde, bağlanma yerleri yüzeye sabitlenmiştir. Bu yüzden yüzey baskılı polimerlerde, kayda değer seçici bağlanma ve daha hızlı kütle aktarımı elde edilebilir. Silika, yüzey baskılama malzemeleri için iyi bir destek materyalidir çünkü yüzeyindeki silanol grupları (Si-OH) kolayca modifiye edilebilir ve ayrıca iyi bir mekanik ve termal

stabiliteye sahiptir [35]. Aynı şekilde yüzey baskılama yoluyla molekül baskılanmış kabuk, demir, silika ve kitosan yüzeylere kaplanabilir [36]. Yüzey baskılamada substratın yüzeyinde, yüksek afiniteye sahip tanıma yerleri oluşturulmaktadır. Burada, baskı molekülü/polimer arasında yığın baskılamada bir problem olan difüzyon kısıtlaması yoktur. Aynı şekilde baskılama sonrası şablon molekülün ortamdaki uzaklaştırılması da daha kolay olmaktadır. Bu nedenle bu teknik, özellikle proteinler dahil olmak üzere biyomoleküllerin baskılanması için yaygın bir uygulamadır. Yüzey baskılamada, geleneksel baskılama tekniklerine kıyasla şablon molekülü daha az kullanılır çünkü yüzey baskılama tekniğinde şablon molekül sadece yüzey kaplama aşamasında kullanılmaktadır [33, 37].

Yüzey baskılama tekniği kullanılarak biyomimetik sensörler hazırlanmaktadır. Bu teknik ile pahalı ve özel ekipmanlara ihtiyaç duyulmadan mikro ve nano ölçekli desenler hazırlanabilir. Yöntemin genel şeklinde, 30 nm ila 100 µm arasında değişen nano veya mikro ölçekli desenler, bir polimerik damga kullanılarak katı substrat üzerinde oluşturulmaktadır. Molekül baskılanmış ince filmler, altın kaplı kuvars kristal mikrobalsans (QCM) üzerinde doğrudan oluşturulabilir. Bu yaklaşımla, molekül baskılanan filminin kalınlığı 50 nm'nin altında olacak şekilde kontrol edilebilir. Hedef analitlerin seçici olarak tanınması, alttaki kuvars kristal rezonatörüyle tespit edilir. Sensör çok kısa bir tepki süresine sahiptir [29]. Fakat sensör tasarımında yüzey baskılama tekniğinin en büyük dezavantajı, baskılanan alanların sayısının az olması nedeniyle yığın baskıya kıyasla daha düşük hassasiyet olasılığıdır. Yüzey baskılı polimerler, proteinler, mikroorganizmalar ve hücreler de dahil olmak üzere farklı tipte analitler için yaygın olarak kullanılmaktadır [37].

2.2.3. Çekirdek- Kabuk Metodu

Günümüzde birçok molekül baskılanmış polimer sentez metodu bulunmaktadır. Molekül baskılanmış polimerlerin birçok avantajı olmasına rağmen hala bazı problemler bulunmaktadır. Örneğin, düşük bağlama kapasitesi, düşük kütle transferi ve mikroküreden şablonun zor uzaklaştırılması en yaygın problemler arasında gösterilmektedir. Çekirdek-kabuk baskı teknolojisi ile yukarıdaki dezavantajların üstesinden gelinebilmesi hedeflenmiştir [38]. Çekirdek-kabuk parçacıklar ilginç morfolojisi ve tasarlanabilen yüzey özellikleri nedeniyle biyomedikal alanda taşıyıcı ve destek materyali olarak kullanılmaktadır [39]. Şekil 2. 1 'de çekirdek-katman formundaki molekül baskılanmış polimer parçacığı ve

özellikleri gösterilmektedir. Molekül baskılanmış polimerin bağlanma alanları yüzey tabakasında bulunur, böylece şablon moleküllerini hızla tanıyabilir [38]. Bu metot ile sentezlenen molekül baskılanan yapı daha büyük özgül yüzey alanı ve daha hızlı kütle transferi nedeniyle ilgi görmüştür. Genellikle çekirdek malzemesi olarak silika, polistiren ve titanyum dioksit kullanılmaktadır [2, 17]. Çekirdek malzemenin etrafında fonksiyonel monomerler kullanılarak ince bir polimerik katman oluşturulur [2, 17].

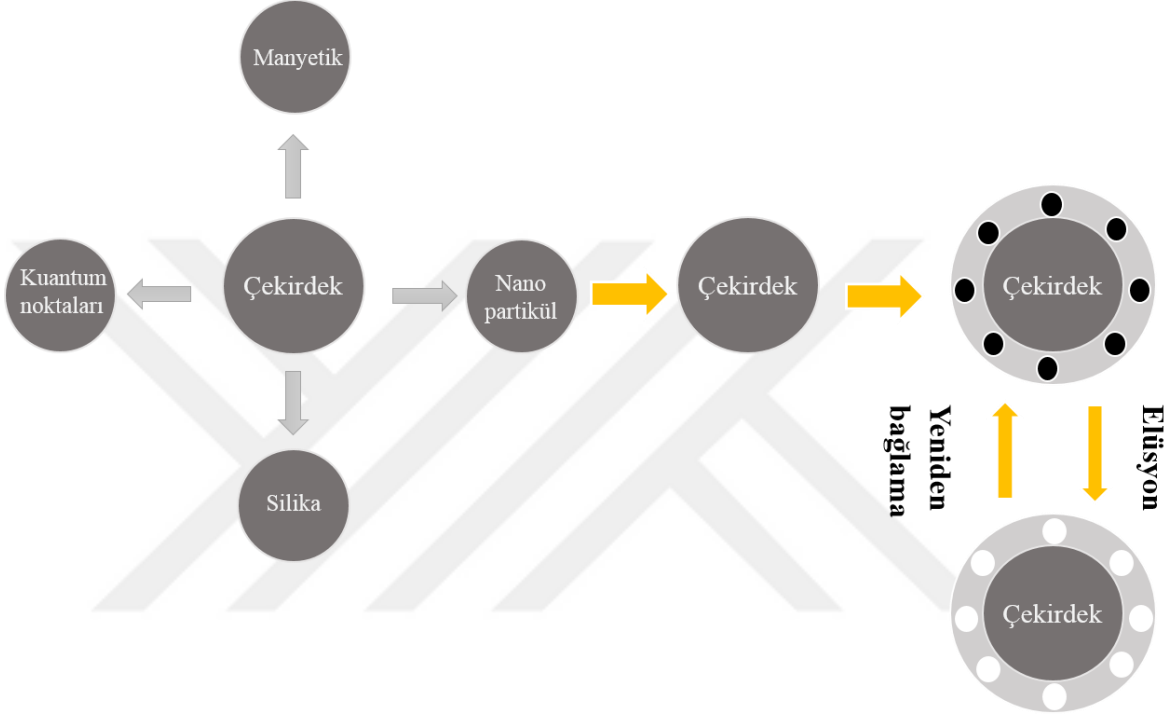
Geleneksel molekül baskılanmış mikrokürelerle karşılaştırıldığında çekirdek-kabuk formundaki baskılanmış mikrokürelerin birçok avantajı vardır. Bunlar aşağıda sıralanmıştır.

- Sentez yöntemi basittir.
- Bağlanma yerleri molekül baskılanmış kabuğunun içerisinde olmasına rağmen, baskılanmış kabuğunun yeterince ince olması durumunda, baskı alanlarının oluşturulmasından sonra şablon tamamen çıkartılabilir.
- Şablon molekülleri, yeniden bağlanma aşamasında bağlanma alanlarına kolayca ulaşabilir.

Çekirdek-kabuk metodu, nanopartikül formundaki molekül baskılama uygulamalarında da sıklıkla kullanılmaktadır. Bu metot, sorbent analizlerinde, kimyasal sensörlerde ve ilaç salımında molekül baskılanmış polimer nanopartiküllerin uygulanmasını kolaylaştırmaktadır [40]. Manyetik nanopartiküllerin, son zamanlarda biyolojik uygulamalar için hem görüntüleme hem de tümör tedavisi için uygun bir materyal olduğu bilinmektedir. Aynı zamanda bu nanopartiküller kullanıldığında, dışardan bir manyetik alan uygulanarak hedef molekülün yapıdan izole edilmesi veya ekstraksiyonu yapılabilmektedir. Bu özellikleri sayesinde ilaç ve biyolojik molekülün ayırımında kullanılabilirler. Manyetik çekirdek-kabuk formundaki sorbentlerde çekirdek materyali olarak çoğunlukla süperparamanyetik partiküller bulunmaktadır. Silika biyouyumlu ve kolay fonksiyoneleştirilmesi nedeniyle uygulamalar için oldukça fazla tercih edilmektedir. Bu nedenle süperparamanyetik partiküllerin etrafı silika kabuk ile kaplanmaktadır [41, 42].

Çekirdek-kabuk formunda sentezlenen molekül baskılanmış polimerler, geleneksel yöntemlerle baskılanmış polimerlere göre üstün olmasına karşın hala bazı sınırlamalar içermektedir. Makromoleküllerin baskılanması için çalışmalar hala devam etmektedir. Çekirdeğin etrafında oluşturulan polimer katmanı için monomer ve çapraz bağlayıcı dengesi

iyi yapılmalıdır. Buna bağlı olarak molekül baskılanmış polimer katmanı kalınlığı iyi ayarlanmalı ve partikül üzerinde yeterli bağlanma alanları olmalıdır. Çekirdek-kabuk formundaki molekül baskılanmış polimer ile hedef molekül arasındaki etkileşim iyice anlaşılmalı ve uygun bir fonksiyonel monomer seçilmelidir [42].



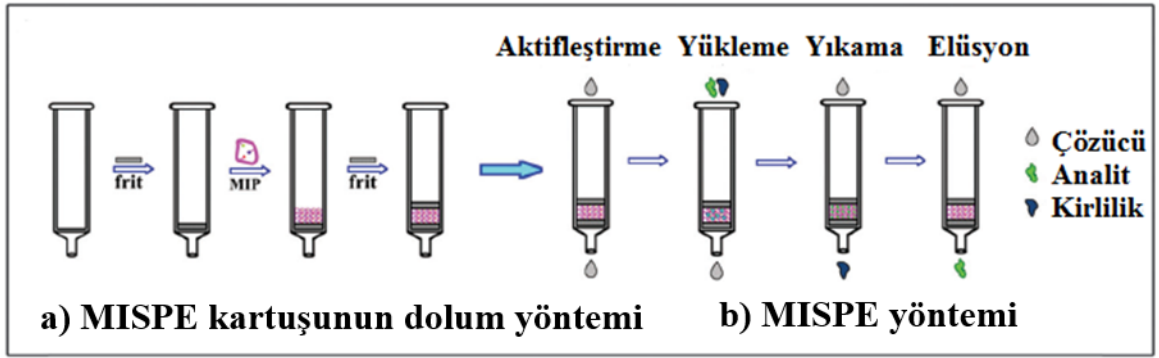
Şekil 2. 1. Molekül baskılamada kullanılan çekirdek-kabuk yöntemi [42].

2.3. Molekül Baskılamının Kullanım Alanları

2.3.1. Analitik Ayrımlar

Molekül baskılanmış polimerler en çok, katı faz ekstraksiyonu (SPE) ve katı faz mikroekstraksiyon (SPME) yoluyla örnek deriştirme ve ayırma için afinite bazlı ayırma ortamı olarak kullanılmaktadır [43]. SPE, analitik kimyada molekül baskılanmış polimerlerin önemli uygulama alanlarından biridir [22]. Yığın baskılanmış polimer partikülleri, monodispers mikroküreler ve monolitler, SPE uygulamalarında kullanılan yaygın molekül baskılanmış polimer formlarıdır. Katı-faz ekstraksiyonu için molekül baskılanmış polimerler, hem çevrimiçi hem de çevrimdışı yöntemlere uygulanabilir. SPE ve molekül baskılamının birlikte kullanıldığı teknikler, analitik hedefe ve akış rejimine bağlı olarak mini-kolon, disk, membran veya kartuşlar şeklinde kullanılmaktadır [22, 44]. SPE kartuşları

eldesinde, hazırlanan molekül baskılanmış polimer önce boş kartuşa doldurulur. Şekil 2.2a’ da SPE kartuşuna doldurma yöntemi gösterilmektedir. Doldurulan SPE kartuşu, uygun çözücülerle koşullanır ve aktive edilir. Daha sonra sulu veya organik faz formunda hedef analit içeren örnek, kartuşa eklenir. Ardından adsorbe edilen analit uygun bir başka çözücü ile molekül baskılanmış polimerden uzaklaştırılır ve toplanır. Şekil 2.2’de molekül baskılama temelinde çalışan bir SPE’e ait genel yöntem gösterilmektedir. Bu işlemde, molekül baskılanmış polimer sentezi, örnek yükleme, yıkama ve elüsyon çözücülerini işlem performansını belirleyen önemli faktörlerdir [28]. Bazı ticari formlar, farklı moleküllerin ekstraksiyonu için kullanılmaktadır [44].



Şekil 2. 2. Geleneksel katı faz mikro ekstraksiyon yöntemi. [28]

Sıvı Kromatografisi, molekül baskılamanın geleneksel uygulamalarından biridir. Bunun için molekül baskılanmış polimerler, genellikle yığın polimerizasyonu ile sentezlenir, mekanik olarak öğütülür, elenir ve daha sonra kromatografik bir kolona doldurulur [12, 22]. Ancak mekanik işlem, nispeten geniş boy dağılımı olan düzensiz parçacıklara yol açar ve partiküllerin kolona doldurulmasında sorun oluşturabilir. Bu nedenle son zamanlarda metal veya kapiler kolonlar içerisinde monolit formundaki molekül baskılanmış kolonlar hazırlanmaktadır. Birçok biyomolekül ve ilaç kiral izomeri gösterir. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisinde (HPLC-High Performance Liquid Chromatography) molekül baskılanmış polimer, kiral sabit faz (MIP-CSP) olarak sıklıkla kullanılmaktadır [12]. Kromatografik kiral ayırmada, kiral sabit faz olarak kullanılan molekül baskılanmış polimerlerin en büyük avantajları, hedef molekül için yüksek afinite ve seçicilikleridir, buna ek olarak maliyetleri de oldukça düşüktür [45]. Bu alanda ilk çalışmalar 1985 yılında

Mosbach grubu tarafından yapılmıştır. Bu çalışmalarda molekül baskılanmış sorbent, sıvı kromatografi'de aminoasit türevlerini ayırmak için sabit faz olarak kullanılmıştır. Sonraki yıllarda molekül baskılanmış polimerlerin, HPLC'de kiral sabit faz olarak kullanılması yaygınlaşmıştır [12, 22]. Molekül baskılama tekniği, HPLC'de kiral ayırma farklı geometrik formlardaki sabit fazlar ile yapılmaktadır. En çok kullanılanlar, molekül baskılanmış polimerik mikroküreler, monolitler ve membranlardır. Monolitik formdaki molekül baskılanmış polimer, kapiler kolonların analitik kullanımında, geleneksel yığın baskılanmış polimere göre daha verimlidir. Monodispers formdaki baskılanmış mikroküreler ve kompozit baskılanmış mikroküreler, büyük ölçekli ayırma prosesleri için uygundur [44]. Kromatografik ayırmada kullanılan membran matrisler, standart kesikli formdan farklı olarak, sürekli formda ayırma işleminin yapılabilmesini sağlar. Bir hedef analitin seçici bağlanmasını hedefleyen, molekül olarak baskılanmış membranlarla ilgili çalışmalar literatürde mevcuttur [22].

2.3.2. Sensörler

Spesifik molekül tanıma biyosensör uygulamalarında oldukça sık kullanılmaktadır. Bu amaçla antikorlar, yüksek seçicilikleri ve hedef bileşiğe karşı duyarlılıkları nedeniyle biyosensörlerde tanıma elemanı olarak kullanılmaktadır. Fakat antikorların yüksek maliyetleri, yüksek pH, sıcaklık ve basınç gibi zorlayıcı koşullar altındaki düşük kararlılıkları nedeniyle kullanım zorlukları vardır. Molekül baskılanmış polimerler, “ yapay antikorlar” olarak adlandırılır ve doğal antikorların bu dezavantajlarının üstesinden gelirler. Molekül baskılanmış polimerler şablon molekül üzerinde yüksek afinite ve seçicilik gösterirler [21]. Molekül baskılama tabanlı sensörler gerçek-zamanlı algılama ara yüzü sağlamaktadır [46]. Molekül baskılanmış polimerlerin kimyasal sensörler alanında uygulanması da son yıllarda özel bir ilgi görmüştür. Bu sensörler, klinik, biyoanalitik, süreç kontrolü ve çevre uygulamaları gibi farklı alanlar için umut verici materyaller olarak görülmektedir. Sensörler, kimyasal bilgiyi ölçülebilir sinyale dönüştüren bir tanıma elemanı ve bir dönüştürücü içeren bir cihaz olarak tanımlanır. Yakın gelecekte molekül baskılanmış sensörlerin, sıvı kromatografisi, kütle spektrometresi, spektroskopik yöntemler gibi analitik tekniklerle rekabet edebileceği düşünülmektedir. Molekül baskılama ile üretilen sensörler, düşük üretim maliyeti, kolay saklama, uzun kullanım ömrü ve kritik koşullarda uygulanabilme kapasitesi gibi avantajlar sunmaktadır. Bu tür uygulamalar için molekül baskılanmış polimerler hem

tanıma hem de sinyal üretme özelliklerine sahiptir [28]. Elde edilen sensörün duyarlılığı, afiniteden doğrudan etkilenir. Bu nedenle, molekül baskılı yüzeylerin yüksek yüzey/hacim oranına sahip, mikro veya nanometre boyutlarında kullanılması tercih edilmektedir. Molekül baskılama tabanlı bir sensörün hazırlanmasında yer alan bir diğer kritik özellik, polimerin dönüştürücü ile nasıl birleştirileceğidir. Bu amaçla çeşitli metotlar geliştirilmiştir: (i) Elektropolimerizasyon, (ii) önceden sentezlenen polimerlerin eklenmesi, (iii) iletken malzemeler, (iv) molekül baskılanmış polimer ve bağlayıcı içeren kompozit membranların tasarımı ve polimerizasyonu, (v) tekli katmanların kendiliğinden birleşmesi. Bunun yanında çıkış algılama sinyalleri sinyal üretme (transdüksiyon) mekanizmasına göre 3 tiptir. Bunlar, elektrokimyasal, optik ve piezoelektrik sinyaller olarak sınıflandırılmaktadır [47]. Kullanılan transdüserler ise sırasıyla elektrotlar, optik transponderler ve piezoelektrik kristallerdir. Genel olarak analitik tespitlerde molekül baskılama-tabanlı sensörler için, yanıt süresi, doğrusal dinamik aralık, tespit edilebilirlik, hassasiyet, seçicilik ve tekrar kullanılabilirlik gibi temel parametrelere dikkat edilmelidir [28]. Çalışmalar molekül baskılanmış yapıların daha fazla optimize edilmesi gerektiğini göstermektedir [18]. Bu alanda devam eden çalışmalara rağmen, molekül baskılanmış sensörlerin ticari gelişimi için henüz süreç tamamlanmış değildir [12].

2.3.3. İlaç Salımı

Biyomateryal alanındaki son gelişmeler, geliştirilmiş yüzey ve yığın özelliklerine sahip olan polimerlerin molekül tasarımına dayanmaktadır [22]. İlaçlar, uzun bir süre boyunca ve/veya belirli fizyolojik koşullar altında salımları için tasarlanan polimer matrisi içinde dağılmaktadır. Fakat bu tür sistemlerin hala belirli sorunları vardır ve bu nedenle de geliştirilmesi gerekmektedir. Biyoaktif moleküllere güçlü ve seçici bağlanma kabiliyetleri nedeniyle molekül baskılanmış matrisler ilaç taşıyıcı malzeme olarak alternatif malzemelerdir [12, 48]. İlaç salımı uygulamaları için molekül baskılanmış yapıların spesifik özellikleri olmalıdır. Bunun için baskılanmış molekül boşluklar, şablonun yokluğunda yapının korunması için kararlı olmalıdır. Bu boşluklar, şablonun serbest bırakılması ve yeniden alınması arasındaki hızlı dengenin gerçekleştirilmesini kolaylaştırmak için esnek olmalıdır [12]. Burada ilaç şablon olarak kullanılır ve molekül baskılanan matris yapısında yapay reseptörler oluşturulur. Reseptörler, sıvı ortamda ilacı seçici bir şekilde tanır ve ona güçlü bir şekilde bağlanır [49]. Molekül baskılanmış yapılar aynı zamanda biyolojik sıvılarda

bulunabilen, enzimatik ve kimyasal saldırılara ve mekanik strese direnmek için kararlı olmalıdır [12]. Bu nedenle, ilaç salımında, biyolojik sistemlerle uyumlu hidrofilik polimerlerin hazırlanması genellikle avantajlıdır. Molekül baskılanmış malzemeler, hidrojen bağları ve elektrostatik etkileşimlerin geliştirilmesi için genellikle organik çözücülerde sentezlenirler. Fakat bu organik çözücüler hücrelere zarar verebilmektedir. Baskılanmış hidrojel, polimerin ilaç yükünü serbest bırakmak için kullanılacağı koşullara uyacak şekilde modüle edilir (çöktürülür ve şişer) [12, 48]. *In vivo* uygulamada, molekül baskılanmış yumuşak kontakt lenslerden oftalmik ilaçların sürekli salımının yararlı olduğu gösterilmiştir. Bu tür lenslerin göz damlaları ile karşılaştırıldığında, pre-korneal eliminasyonu azalttığı ve terapötik düzeyi sağlama süresinin uzamasına neden olduğu ve böylece daha az miktarda ilaca ihtiyaç duyulduğu gösterilmiştir [49].

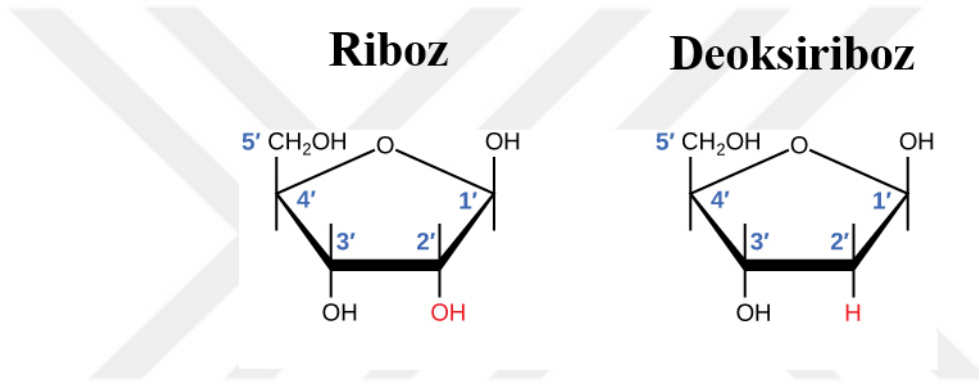
Genel olarak incelendiğinde molekül baskılanmış polimerler, elektrokimyasal sensörler, molekül tanıma, kromatografik ayırma ve analitik örnek zenginleştirme için yaygın kullanılabilir potansiyeline sahiptir, ancak ilaç taşıyıcı ve salım amaçlı olarak kullanımlarına yönelik çalışmalar henüz başlangıç aşamasındadır. Molekül baskılama tabanlı ilaç taşıyıcıları çeşitli alanlarda kullanılmasına rağmen bunların biyolojik uyumu ve ilaç salımının etkinliği yeni araştırılmaya başlanmıştır ve çalışmalar devam etmektedir [12, 48].

2.4. Nükleotid ve Nükleositlerin Molekül Baskılanması

Nükleotidler, bütün biyolojik sistemlerde bulunur ve nükleik asitlerin (RNA ve DNA) temel yapı taşlarını oluştururlar. Ek olarak, hücre sinyalizasyon ve metabolizmasında önemli rol oynar ve çok sayıda enzimatik reaksiyona katılırlar [50]. Nükleotidler bir şeker kısmından, (RNA için riboz ve DNA için ise 2-deoksiriboz) ve şeker ile bağlantılı pürin (adenin, guanin) ve pirimidin (sitozin, timin veya urasil) bazlardan oluşmaktadır. Nükleik asitlerin degradasyonundan kaynaklanan hem doğal hem de modifiye edilmiş pürin ve pirimidin nükleositleri, insan vücut sıvılarında bulunmakta ve hastalık teşhisi için izlenmektedir [51]. Biyolojik materyallerden nükleositlerin ayrılması için yüksek performanslı sıvı kromatografisi, kütle spektrometrisi, elektrokimyasal tayin ve kapiler elektroforez gibi yöntemler bulunmaktadır. Son yıllarda nükleositlerin ayrımında borat afinite kromatografisi de kullanılmaktadır. Borat afinite kromatografisindeki temel etkileşim borat ligandı ve cis-diol arasındaki esterleşme olmasına rağmen, önemli bir rol oynayabilecek bazı ikincil

etkileşimler de görülebilmektedir. Bunlara örnek olarak, hidrofobik etkileşim, iyonik etkileşim, hidrojen bağı ve yük aktarım etkileşimleri gösterilebilir [52].

Ribozun 2', 3' pozisyonda 1,2-cis-diol grubu vardır ve bu da borat ile güçlü etkileşime neden olmaktadır. Borat afinite kromatografisi, bu şekerin olduğu ribonükleotidler ve RNA gibi çeşitli bileşikleri ayırmada başarıyla kullanılmaktadır. Fakat DNA'da 2'-hidroksil bulunmadığından, borat ligandı ile esterleşme reaksiyonu vermez. Böylelikle, borat afinite kromatografisi, RNA'yı kolayca DNA'dan ayırabilmektedir. Şekil 2.3' de ribozun ve deoksiribozun yapısı gösterilmektedir [52, 53].



Şekil 2. 3. RNA'da bulunan riboz ve DNA'da bulunan deoksiriboz arasındaki fark olarak ribozun 2'-karbonunda bir hidroksil grubuna sahip olması [80].

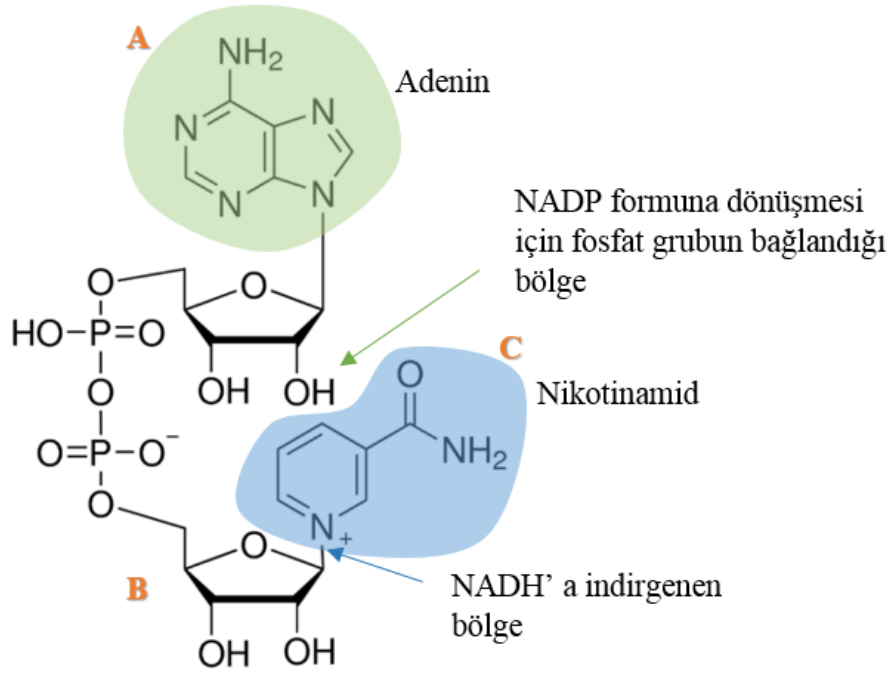
Büyük RNA moleküllerinin ve RNA oligonükleotidlerinin, 3'-ucunda sadece bir cis-diol bulunmaktadır ve bu nedenle borat ligandına bağlanmaları nispeten zayıftır. Bu durumda, uzun RNA zincirleri daha zayıf bağlanma göstermektedir. mRNA, borat afinite kromatografisi kullanılarak izole edilebilmektedir. Ayrıca, aminoasitlenmiş tRNA'nın aminoasit içermeyen tRNA'dan ayrılması için borat afinite kromatografisi kullanılabilir. Ne yazık ki borat afinite kromatografisinde gerekli olan yüksek pH, amino asit-tRNA bağı hidrolize edebilmektedir. Nikotinamid adenin dinükleotid (nicotinamide adenine dinucleotide-NAD) ve flavin adenin dinükleotid (flavin adenine dinucleotide-FAD) gibi dinükleotid kofaktörler, birden fazla erişilebilir cis-diole sahip olduklarından dolayı mononükleotidlere veya oligonükleotidlere kıyasla borat afinite kromatografisi sorbentlerine daha güçlü şekilde bağlanma kabiliyetine sahiptir. [54]

2.5. β -Nikotinamid Adenin Dinükleotid

β -Nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+), bütün canlı hücrelerde bulunan evrensel bir biyolojik moleküldür. Bu biyolojik molekül, hücre içi redoks reaksiyonunda elektron ve hidrojen atomlarının bir metabolitten diğerine transferinde görevli, en önemli elektron taşıyıcılarından biridir. 2200' den fazla türde enzim olduğu bilinmektedir, bunlardan yaklaşık 500 tanesinin oksitlenmiş formdaki nikotinamid adenin dinükleotide (NAD^+) ihtiyacı bulunmaktadır. NAD^+ 'ın oksitlenmiş formu, nikotinamid adenin dinükleotide fosfat ($NADP^+$) olarak geçmektedir [55]. NAD^+ , iki elektron ve bir proton kabul ederek, indirgenmiş formuna yani $NADH$ ' a dönüşür. $NADH$ ve NAD^+ dinükleotid çifti hücresel biyoenerjide, indirgeme-oksidasyon (redoks) reaksiyonunu sürdürmek için oldukça önemlidir [56]. Birçok önemli biyosentez reaksiyonuna katılır ve çoğunlukla dehidrojenaz olmak üzere yüzlerce enzimin kofaktörüdür [18, 57]. $NADH$ ve NAD^+ , elektrokimyasal enzim biyosensörleri ve biyoyakıt hücrelerinin geliştirilmesinde önemli rol oynamaktadır ve bunun için dehidrojenaz enzimleri kullanılmaktadır [18]. Ayrıca bir sürü hücresel işlemde de görevi bulunmaktadır. NAD^+ 'ın en önemli koruyucu işlevi travmatik yaralanma, iskemi hasarı, radyasyona bağlı immünsüpresyon, dahil olmak üzere çeşitli nörodejeneratif yaralanmalar ile aksonal dejenerasyonların başlangıcını ve uzamasını geciktirmektir [58].

NAD^+ ı substrat olarak kullanan enzimler, bazı NAD -bağımlı DNA ligazları, NAD -bağımlı oksidoredüktazlar, poli(ADP-riboz) polimeraz (PARP) ve yakın zamanda karakterize edilen Sir2p ailesidir [59]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda yaşlanma ile bağlantılı olan sirtuin molekülünün deasetilaz aktivitesi için NAD^+ ya substrat olarak ihtiyaç olduğu görülmüştür. Sirtuinler ve Sir2 proteinleri bir enzim ailesidir ve bu nedenle " NAD^+ sensörleri" olarak tarif edilmektedirler [55, 56]. Sirtuinlerin 40'tan fazla kristal yapısı, tek başına veya çeşitli ligand bağlı formlarda belirlenmiştir [60]. NAD^+ ile sirtuin arasındaki bağlantıyı inceleyen çalışmaların çoğunda beslenme ve çevresel zorluklara yanıt olarak, NAD^+ derişimlerindeki değişiklikler ile tutarlı olarak sirtuin aktivitesinde de değişiklikler olduğu gözlenmiştir [56].

NAD^+ bağlanma bölgesi, adenin bağlanması için A bölgesi, nikotinamid riboz bağlanması için B bölgesi ve nikotinamid parçası bağlanması için C bölgesi olmak üzere üç bölgeye ayrılmıştır [60]. Şekil 2. 4' te NAD^+ 'ın yapısı gösterilmektedir.



Şekil 2. 4. β -Nikotinamid adenin dinükleotid' in molekül yapısı [61].

Canlı organizmalarda meydana gelen enerji değişiminin düzenlenmesine ve mitokondriyal fonksiyonun korunmasına ek olarak NADH-NAD⁺ redoks çifti, 300'den fazla NADH' ye bağlı dehidrojenaz tarafından katalizlenen çoklu biyolojik reaksiyonlarda kritik rol oynamaktadır. NADH ve NAD⁺'ın hücre içindeki derişimini bütün hücrelerin yaşamsal sürecini koruması için oldukça önemlidir. Derişim değişiklikleri, yaşlanma, kanser, Parkinson hastalığı, diyabet ve epilepsi gibi çeşitli patofizyolojik koşullar altında enerji metabolizmasında değişiklik ile ilişkilendirilmiştir [18].

2.6. Borat Afinite Kromatografisi

Sıvı kromatografik yöntemler ve özellikle de HPLC, modern klinik laboratuvarlarında önemli bir yöntem grubudur. Genellikle ters faz, normal faz, büyüklükçe ayırma ve iyon değişim kromatografisi en yaygın sıvı kromatografi yöntemleri olarak bilinmektedir. Bunlara ek olarak başka bir sıvı kromatografisi kategorisi, "afinite kromatografisi" olarak adlandırılmaktadır. Bu yöntem ilaç bilimi ve biyoteknoloji gibi alanlarda hızla tercih edilen ayırma yöntemidir. Afinite kromatografisi, bir örnekteki spesifik analitlerin ayrılması ve analizi için "biyolojik etkileşimi" kullanan bir sıvı kromatografisi tekniği olarak tanımlanmaktadır. Bu amaçla "afinite ligandı" olarak bilinen bir bağlanma materyalinin seçimi gereklidir [62]. Afinite kromatografisi, geleneksel protein saflaştırma tekniklerinden birisidir. Kompleks yapılardan proteinleri saflaştırma esnasında işlem basamaklarının daha az olması ve alt-ayırma aşamalarında maliyetin az olması nedeniyle tercih edilmektedir [63]. Ligand analit ile etkileştirilerek oluşan kompleks kolon içindeki katı bir desteğe yerleştirilmektedir. İmmobilize edilmiş ligand koşullandıktan sonra, analitin izolasyonu veya ölçümü için kullanılabilir [62].

Ligand olarak borik asit veya borat kullanan afinite yöntemleri, klinik örneklerle başarıyla kullanılan bir grup kromatografik tekniktir [62]. Borat afinite kromatografisi, glikoproteinler, nükleositler ve sakkaridler gibi cis-diol içeren biyomoleküllerin etkin izolasyonu ve zenginleştirilmesi için kullanılan eşsiz bir tekniktir. Bu tekniğin prensibi, alkali koşullar altında (genellikle 8.5 veya daha yüksek pH) borik asit ligandı ve analitin cis-diol kısımları arasında tersinir ester oluşumuna ve ortamın asidik olarak değiştirilmesi ile esterlerin ayrışmasına dayanmaktadır [10, 64]. Bu pH-bağımlı kimya, borik asiti molekül tanıma için mükemmel bir ligand yapar. Bu durum, sakkaritler için borik asit bazlı kimyasal algılama ve nihayet 1970'lerde BAC'in keşfedilmesine yol açmıştır.

Cis-diol biyomoleküller, birçok biyolojik süreçte ve hastalık teşhisinde önemli rol oynamaktadır. Glikoproteinler, molekül tanımda, hücre içi sinyalizasyonda ve bağışıklık cevabı gibi biyolojik olaylarda önemlidir. Bazı glikoproteinler aynı zamanda kanser izlenmesinde biyoişaret olarak görev almaktadır. Nükleositler ise RNA'nın yapı taşlarıdır. Cis-diol biyomoleküllerinin ortak özelliği, genellikle çok düşük derişimde mevcut olmalarıdır. Hedef cis-diol biyomoleküllerin spesifik olarak yakalanması ve etkin bir şekilde

zenginleştirilmesi önemlidir [14, 64]. Bu alanda da devreye borat afinite kromatografisi girmektedir.

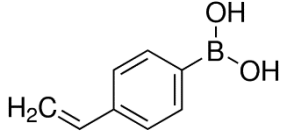
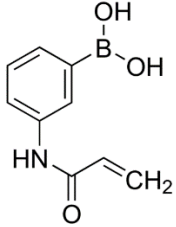
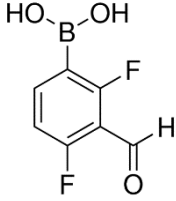
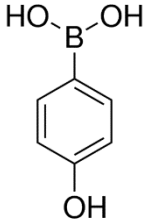
Borat afinite kromatografisi ayırma ortamının özellikleri hem borik asit ligandı, hem de destek materyali tarafından belirlenir. Genel olarak, borik asit ligandı herhangi bir aromatik borik asit veya bunun türevleri olabilir. Borik asidin pKa değeri, borat afinite kromatografisindeki izolasyon performansını etkileyen önemli bir parametredir. Genellikle, daha düşük bir pKa değeri daha güçlü bir afinite ile sonuçlanır ve bağlanma için daha düşük bir çevresel pH gerektirir. Diğer bir önemli nokta da destek materyalleridir. Uygun olmayan bir destek malzemesi, BAC kolonunun sonuçta çıkan özgünlüğünü, performansını büyük ölçüde bozabilmektedir [64]. 2006 yılından sonraki birkaç çalışmada biyolojik örnekler ile çalışmak için yeni tekniklerde üretilen borat afinite materyalleri kullanılmaya başlanmıştır. Bu materyallere örnek olarak, monolitik kolonlar, nanopartiküller, molekül baskılanmış polimerler ve mezo-gözenekli malzemeler gösterilebilir [64-66].

BAC' de kullanılan sabit fazlar iki sınıfa ayrılabilir: (1) mikroküreler ve (2) monolitik kolonlar. Nanopartiküller, mezo-gözenekli malzemeler ve molekül baskılanmış polimerler dahil olmak üzere cis-diol içeren bileşiklerin ekstraksiyonu veya yakalanması için borat afinite sorbentleri olarak birkaç yeni malzeme formatı kullanılmaktadır. Mikroküre veya kolon formundaki borat afinite sorbentleri ticari olarak temin edilebilir. Borat afinite mikrokürelerinin hazırlanması esas olarak destek materyalleri üzerine borik asit ligandının immobilizasyonuna dayanmaktadır. Önceleri destek materyali olarak selüloz, poliakrilamid, agaroz kullanılmaktaydı. Fakat bu matrislerin mekanik dayanımı nispeten düşüktü ve yüksek basınca dayanıklı değildi. Bu nedenle daha sonraları silika matrisler kullanılmaya başlanmıştır. Silika matris daha yüksek basınç altında çalışabilmektedir, bu nedenle silika bazlı borat afinite kolonları cis-diol içeren bileşikleri daha verimli ve hızlı bir şekilde ayırabilmektedir [66].

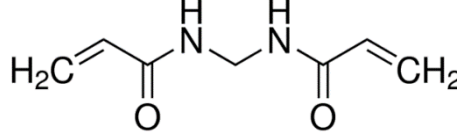
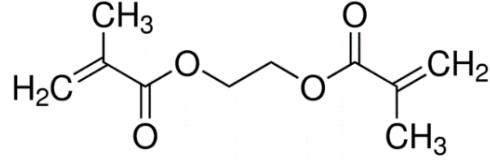
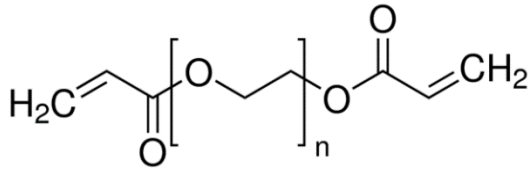
Geliştirilmiş formdaki monolitik borat afinite kolonları ile nükleosid, glikoprotein ve glikopeptid analitlerinin izolasyonu çalışılmıştır. Monolit sentezi serbest radikal polimerizasyonu ile gerçekleştirilmektedir. Genellikle polimerizasyon ısıtma veya UV etkisi ile başlatılmaktadır [64, 65]. Molekül baskılama teknolojisi, antikolar gibi bağlanma özellikleri veya enzim benzeri katalitik aktiviteleri sayesinde kimyasal algılama, ayırma ve

kataliz gibi önemli uygulamalarda kullanılmaktadır. Molekül baskılanmış polimerler yapılarında nano ölçekli molekül baskılanmış boşlukların bulunması nedeniyle, kompleks moleküllerden seçilen analitlerin ayrılması ve molekül olarak tanıma için mükemmel bir özgülük ve yüksek afinite sağlamaktadırlar. Borik asitin kolay açma/kapama reaktivitesi, molekül baskılama işlemini desteklemektedir. Dolayısıyla borik asit fonksiyonel monomerleri, cis-diol içeren bileşiklerin, özellikle makromoleküllerin baskılanması için ümit vericidir [67]. Çizelge 2.3'te molekül baskılama ve borat afinite kromatografisinde sıklıkla kullanılan borat ligandları ve Çizelge 2. 4' te ise çapraz bağlayıcıları verilmektedir.

Çizelge 2. 3. Molekül baskılama ve borat afinite yönteminde sıklıkla kullanılan monomerler.

Monomer	Kimyasal Yapısı
4-vinilfenilboronik asit (VPBA)	
3-akrilamidofenilboronik asit (AAPBA)	
2,4-difloro-3-formilfenilboronik asit (DFFPBA)	
4-Hidroksifenilboronik asit (HPBA)	

Çizelge 2. 4. Molekül baskılama ve borat afinite kromatografisi yönteminde sıklıkla kullanılan çapraz bağlayıcılar.

Çapraz Bağlayıcı	Kimyasal Yapısı
N,N'-metilenbis (akrilamid) (MBA)	
Etilen glikol dimetakrilat (EGDMA)	
Poli (etilen glikol) diakrilat (PEGDA)	

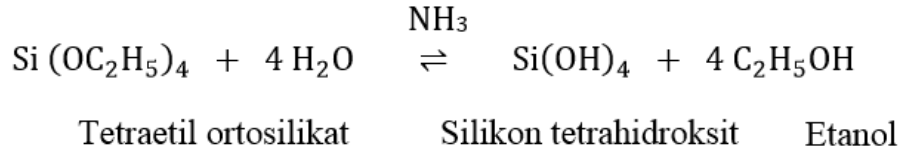
2.7. Monodispers Silika Mikroküre Sentezi

Monodispers mikroküre süspansiyonları birçok deneysel ve teorik avantaj sunmaktadır [68]. Son yirmi yılda, eczacılık, antireflektif kaplama malzemeleri, kozmetik, kromatografi ve katalizörler gibi birçok alanda yaygın uygulamaları nedeniyle silika mikrokürelere büyük önem verilmektedir. Silika kürelerin aynı zamanda stabilizör, kaplama ve bağlayıcı malzemesi olarak kullanılmaktadır [69, 70]. Farklı çaplara sahip monodispers SiO₂ mikrokürelere, mikroemülsiyon yöntemi ve sol-jel yöntemi gibi farklı yöntemler kullanılarak sentezlenmektedir. Bunlar arasında Stöber metodu, monodispers silika küreleri sentezlemek için klasik yöntem olarak bilinmektedir [70, 71].

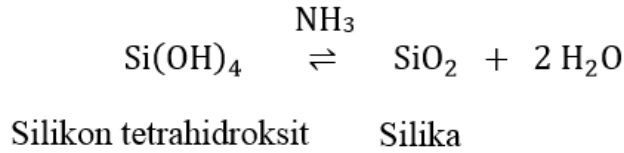
Monodispers silika mikrokürelerinin hazırlanması genellikle alkol, su ve katalizör olarak kullanılan amonyak karışımı içinde alkoksilanların hidrolizi ve kondenzasyonu ile gerçekleştirilmektedir [69]. Şekil 2.5' te hidroliz ve kondenzasyon tepkimesi

gösterilmektedir. TEOS (tetraetil ortosilikat) ve amonyak derişimlerinin, silika kürelerin büyüklüğünü kontrol eden etkin koşullar olduğu bilinmektedir. Bu yöntemde elde edilen silika kürelerin boyutu genellikle 1 µm'den azdır. 1 µm'den büyük silika mikroküreler, 1 µm altında boyutu olan monodispers çekirdek (seed) küreler kullanılarak hazırlanabilmektedir [70]. Bununla birlikte bu teknik, hedeflenen silika kürelerin büyüklüğüne ulaşmak için çoklu büyüme adımlarını içermektedir. Gözenekli silika mikroküre üretmek için genellikle organik şablon malzeme kullanılmaktadır. Şablon malzeme olarak iyonik veya non-iyonik (polimerik) yüzey aktif maddeler kullanılmaktadır [70]. Ayrıca, reaksiyon sırasında yüksek TEOS derişimi, çekirdek kürenin agregasyonuna ve ikincil küre oluşumuna neden olabilmektedir, bu da polidispers küre sentezine yol açmakta ve materyalin özelliklerini etkilemektedir. Silika yüzeyi silanol gruplarınca zengindir, bunlar adsorpsiyon ve reaksiyon yeteneğine sahiptir. Silika yüzeyinin çeşitli organik reaktiflerle kimyasal modifikasyonu, elde edilen silika mikroküreler farklı uygulamalar için kullanılmaktadır [71, 72].

Hidroliz:



Kondenzasyon:



Şekil 2. 5. Stöber yöntemine ait reaksiyonların gösterimi [73].

Silika, biyouyumlu ve inert bir malzemedir [72]. Silika nanopartiküller yüksek kimyasal ve termal kararlılığa sahiptir ve yüksek yüzey alanı sayesinde geniş kullanım alanları bulunmaktadır. Sulu ortamda, silika yüzey elektrostatik stabilizasyon yeteneği nedeniyle kürelerin dağılım eğilimini arttırmaktadır. Bu nedenle silika nanopartiküller yüksek oranda

“özünebilir” olarak kabul edilmektedir. Bu özellikleri sayesinde silika nanopartiküller, çözeltiliye dayalı biyoanaliz uygulamaları için uygundur [74].



3. DENEYSEL ÇALIŞMA

3.1. Molekül Baskılama İçin Destek Materyali Sentezi

Bu çalışmada molekül baskılanmış sorbent sentezi için, yaklaşık 5 µm boyutundaki manyetik olmayan silika mikroküreler ve manyetik silika mikroküreler destek materyali olarak kullanılmış ve bu materyaller üzerinde fonksiyonel monomerler ve çapraz bağlayıcı kullanılarak polimerizasyon yoluyla molekül baskılamanın yapıldığı polimerik katman sentezi gerçekleştirilmiştir. Molekül baskılanmış polimer sentezinde polimerizasyon, hedef molekül olan β -NAD eşliğinde gerçekleşirken, molekül baskılanmayan polimer sentezinde ortamda β -NAD bulunmamaktadır. Sorbent sentezlendikten sonra β -NAD, polimerik katmandan uzaklaştırılarak yapıda hedef molekülün boyut ve yapı özelliklerini tanıyacak moleküler boşluklar oluşturulmuştur.

3.1.1. Çekirdek Malzeme Olarak Kullanılan Silika Mikrokürelerin Sentezi

3.1.1.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Glisidil metakrilat (GMA), 4-dimetilaminopropil metakrilamid (DMAPMA), 4-vinilfenilboronik asit (VPBA), metakrilik asit (MAA), etilen glikol dimetakrilat (EGDMA), tetraetil ortosilikat (TEOS), tetrabutil amonyum iyodür (TBAI), etilbenzen (EB), polivinilpirolidon K-30 (PVP-K-30), tetrahidrofuran (THF), sodyum dodesil sülfat (lauril) (SDS), amonyak (NH_4OH), hidroklorik asit (HCl), poli(vinil) alkol (PVA), benzoil peroksit (BPO) sodyum hidroksit (NaOH), teknik etanol (EtOH) (98%), Sigma-Aldrich (A.B.D)'den temin edilmiştir. Baskılama molekülü olarak kullanılan β -NAD, Sigma-Aldrich (A.B.D)'den temin edilmiştir, yine aynı şekilde kontrol deneyleri sırasında kullanılan ribonükleik asit (RNA), sitidin, sitozin ve kafein molekülleri Sigma-Aldrich (A.B.D)'den alınmıştır. 2,2'-azobis(2-metilpropiyonitril) (AIBN), metanol ortamında yıkanarak kristalize edilmiştir. Mutlak etanol ve izopropil alkol (Iso-PrOH), Merck (Almanya). Bütün deneylerde ultra saf su kullanılmıştır. Manyetik küre yapımında kullanılan, demir (III) klorür heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ve demir (II) klorür tetrahidrat ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) tuzları, Sigma-Aldrich (A.B.D)'den temin edilmiştir. Yüksek saflıktaki azot gazı (99.9%) Linde şirketinden temin edilmiştir.

3.1.1.2. Monodispers Polimerik Mikrokürelerin Sentezi

Monodispers gözenekli silika mikrokürelerin eldesi için ilk olarak çıkış lateksi olarak kullanılan 2 µm boyutundaki gözeneksiz poli(GMA) mikroküreler sentezlenmiştir. Lateks mikroküreler çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyon yönteminde kullanılarak, silika mikrokürelerin sentezinde çıkış materyali olarak kullanılan monodispers-gözenekli formda polimerik mikroküreler elde edilmiştir.

3.1.1.2.1. Poli(glisidil metakrilat) Mikroküre Sentezi

Poli(GMA) mikroküreler, dispersiyon polimerizasyonu ile monodispers formda sentezlenmiştir [75]. Sızdırmaz özelliğe sahip, Pyrex cam'dan yapılmış, "T" reaktörün içerisine ilk olarak 30 mL mutlak etanol, ardından 0.45 g PVP K-30 stabilizörü konulmuş ve 3 mL GMA eklenmiştir. Karışım bir süre ultrasonik su banyosunda (ISO-LAB, Almanya) tutulduktan sonra içerisine 0.24 g AIBN eklenmiş ve son bir kez daha malzemelerin iyice karışması için reaktör ultrasonik su banyosunda tutulmuştur. Reaktör, sıcaklık kontrollü çalkalamalı su banyosuna (Memmert, Almanya) alınıp, 70°C'de 24 saat polimerizasyona bırakılmıştır. 24 saatin sonunda su banyosundan alınan poli(GMA) lateks önce 3 kez etanolle sonrada 3 kez distile su ile santrifüjleme-dekantasyon yöntemiyle yıkanarak reaksiyona girmeyen bileşenler uzaklaştırılmıştır. Yıkama sonrasında poli(GMA) lateks derişiminin tayini için gravimetrik yöntem kullanılmış ve lateks kullanılmak üzere distile su ortamında saklanmıştır.

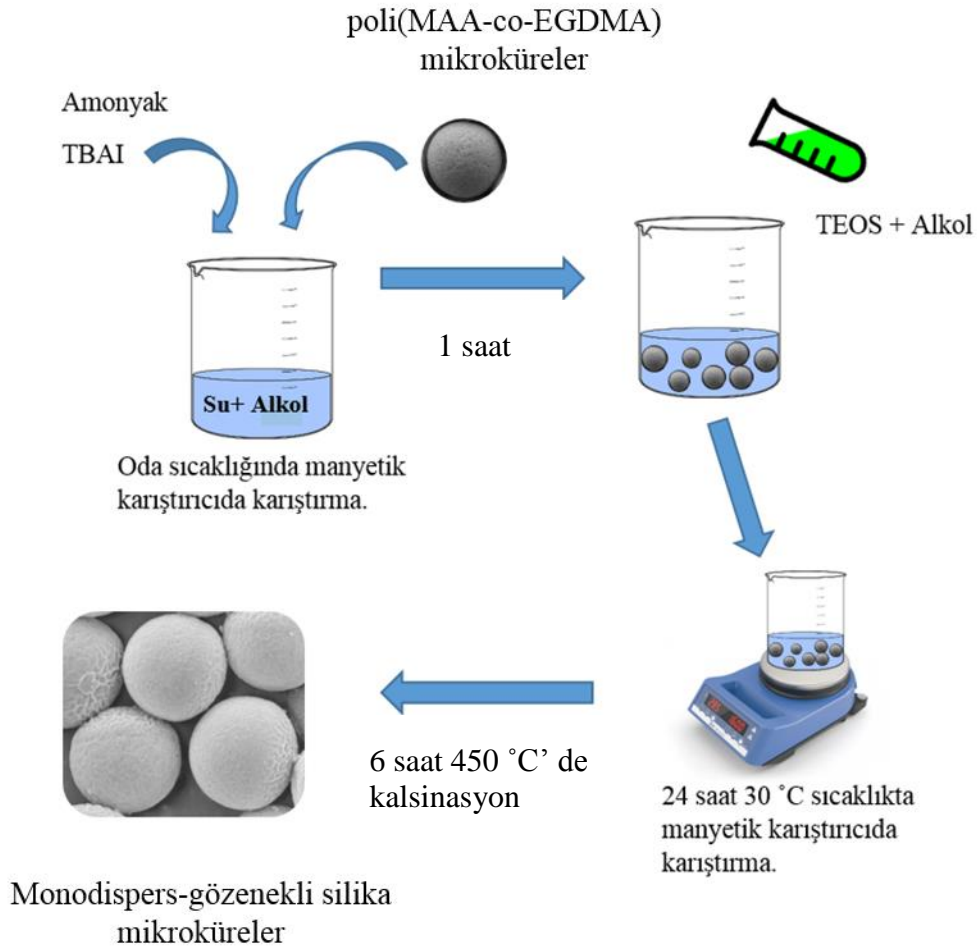
3.1.1.2.2. Poli(metakrilik asit-co-etilen glikol dimetakrilat), Poli(MAA-co-EGDMA) Mikrokürelerin Sentezi

Monodispers-gözenekli formda poli(MAA-co-EGDMA) mikroküreler, çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu ile sentezlenmiştir [76]. Bu amaçla 2 µm boyutundaki poli(GMA) lateks mikroküreler su bazlı emülsiyon ortamında önce etilbenzen ardından metakrilik asit ve etilen glikol dimetakrilat içeren monomer fazı ile şişirilip, monomer fazının lateks mikroküreler içerisinde polimerizasyonu sağlanmıştır. Çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonun ilk aşamasında 50 mL distile suyun içerisinde 0.125 g SDS çözülmüştür ardından da ortama 3.5 mL etilbenzen eklenmiştir. Karışım 12 dakika boyunca sonikatöre (Bandelin Sonopuls, Almanya) konularak, ortamın emülsiyon haline gelmesi sağlanmıştır. İşlemin son 4 dakikasında ortama 0.3 g poli(GMA) lateks mikroküreler

eklenmiş ve 4 dakika daha ultrasonikasyona maruz bırakılmıştır. Karışım manyetik karıştırıcı (IKA RO-10, Germany) üzerine konulup, 24 saat oda sıcaklığında karıştırılarak, gözenek yapıcı çözücü ile lateks mikrokürelerin denge şişme noktasına gelmesi sağlanmıştır. PVA (0.8 g), 10 mL distile su içerisinde eklenerek, ortam 48 saat boyunca karıştırılmış ve PVA'nın çözünmesi sağlanmıştır. Takip eden basamakta, 50 mL distile su içerisinde 0.125 g SDS çözülmüştür. Ortama 2 mL metakrilik asit, 4 mL EGDMA ve 0.25 g BPO eklenerek, ortam 12 dakika boyunca sonikatörde tutulmuştur. Elde edilen dispersiyon, etilbenzen ile şişirilmiş poli(GMA) mikroküreleri içeren dispersiyon üzerine eklenmiş ve ortam manyetik karıştırıcıda 24 saat süreyle karıştırılmıştır. Bu sürenin sonunda PVA çözeltisi dispersiyon ortamına eklenmiştir. Polimerizasyon, çalkalamalı su banyosunda 80 °C sıcaklıkta 24 saat süre ile yapılmıştır. Polimerizasyon sonrasında mikroküreler ilk olarak 5000 rpm' de 5 dakika süre ile çöktürülmüş, ardından da 2 kez etanol, 2 kez THF ve 2 kez etanol ile santrifüjleme-dekantasyon yöntemiyle yıkanmıştır. Son olarak etanol ile alınan mikroküreler petri kaplarına alınıp 80°C' de 24 saat kurutulmuştur.

3.1.1.3. Monodispers-Gözenekli Silika Mikrokürelerin Sentezi

Molekül baskılama için kullanılacak monodispers gözenekli formda silika mikroküreler “çok basamaklı hidroliz-kondenzasyon yöntemi” ile elde edilmiştir [76, 77]. Silika mikroküre üretimi için kalıp materyal olarak üretilen poli(MAA-co-EGDMA) mikroküreler kullanılmıştır. 0.25 g TBAI, Iso-PrOH (50 ml) ve distile su (5 ml) içerisinde çözülmüş ardından ortama 0.25 mL amonyum hidroksit eklenmiştir. Sonrasında, çok basamaklı mikrosüspansiyon yöntemi ile üretilen polimerik mikroküreler (0.4 g) ortama eklenerek, dispersiyon, oda sıcaklığında 1 saat manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılmıştır. Ardından karışmakta olan ortama %25'lik TEOS içeren Iso-PrOH çözeltisi (1.25 ml TEOS ve 5 ml Iso-PrOH) damla damla eklenmiştir. Bu işlem sonrasında çözelti, 30 °C'ye ayarlanmış manyetik karıştırıcıda 24 saat karıştırılmıştır. Böylece oluşan polimer- silika kompozit mikroküreler, 2 kez Iso-PrOH ve 2 kez de distile su ile yıkanmış ve işlem sonrasında bir gün boyunca 80°C' de etüvde kurutulmuştur. Mikroküreler son aşamada 450°C' de 6 saat boyunca kalsine edilmiş ve kompozit malzemedan polimerik kısım uzaklaştırılarak monodispers-gözenekli formda silika mikroküreler elde edilmiştir [77]. Monodispers gözenekli formda silika mikroküre sentezi Şekil 3. 1' de gösterilmektedir.



Şekil 3. 1. Monodispers gözenekli silika mikroküre sentezinin aşamaları [78].

3.1.1.4. Manyetik Özellikte Monodispers-Gözenekli Silika Mikrokürelerin Sentezi

Manyetik özelliğe sahip silika mikrokürelerin sentezinde çok basamaklı hidroliz-kondenzasyon yöntemi kullanılmıştır [76]. Yöntemde kalıp materyal olarak, manyetik özellikte poli(MAA-co-EGDMA) mikroküreler kullanılmıştır. Monodispers-gözenekli formda sentezlendikten sonra, mikroküreler, Fe^{+2} ve Fe^{+3} iyonları kullanılarak ikili çöktürme yöntemi ile manyetik özelliğe sahip olacak şekilde elde edilmiştir. İlk aşamada, 0.7 g poli(MAA-co-EGDMA) mikroküreler 100 mL distile su içerisinde azot ortamında bir süre karıştırılmıştır. Ardından ayrı bir yerde demir (III) klorür heksahidrat (0.8 g) ve demir (II)

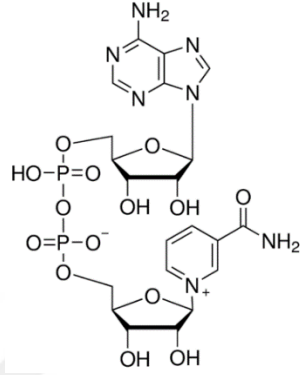
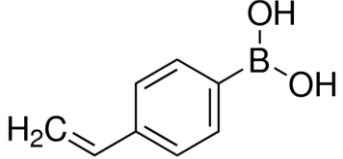
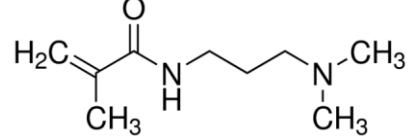
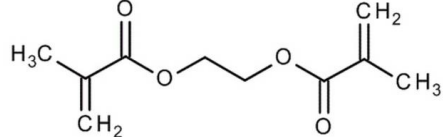
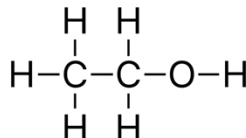
klorür tetrahidrat (0.536 g), 20 mL suda azot atmosferinde çözülmüştür. Demir tuzlarından oluşan karışım, başta hazırlanmış olan polimer dispersiyonuna eklenmiştir. Bu ortam bir süre azot geçirildikten sonra vakumlanmış ve böylelikle hem ortamda bulunan oksijen uzaklaştırılmış ve hem de demir iyonlarının mikrokürelere adsorplanması sağlanmıştır. Vakumlama işlemi bittikten sonra çözelti ısıtıcılı mekanik karıştırıcıya yerleştirilmiş ve sıcaklık 85°C'ye ayarlanmıştır. Sıcaklık dengeye gelince ortama derişik amonyak (25 ml) eklenmiştir ve böylece ortamdaki demir tuzları indirgenerek Fe₃O₄ formuna dönüşmeleri sağlanmıştır. Ortam, 1 saat boyunca 85°C'de mekanik karıştırıcıda karıştırılmış, ardından oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Manyetik özelliğe sahip mikrokürelere bir mıknatıs yardımı ile toplanarak izole edilmiştir. Mikrokürelere önce 2 kez distile su ardından 2 kez 0.1 M HCl çözeltisi ve son olarak 5 kez distile su ile yıkanmış ardından da etüvde kurutulmuştur. Manyetik özellikteki silika mikrokürelere sentezi için, monodispers gözenekli forma sahip silika mikrokürelere sentezinde uygulanan yöntem kullanılmıştır [76]. İşlem sonrasında manyetik silika mikrokürelere yıkanması santrifüj ile değil doğal mıknatıs kullanılarak yapılmıştır. Yıkanan mikrokürelere etüvde kurumaya bırakılmış ve 450°C'de 6 saat boyunca kalsine edilmiştir.

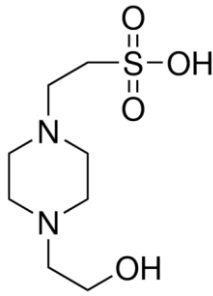
3.1.2. Normal ve Manyetik Formdaki Destek Materyallerine Molekül Baskılama Yapılması

3.1.2.1. Kullanılan Malzemeler

4-dimetilaminopropil metakrilamid (DMAPMA), 4- vinilfenilboronik asit (VPBA), etilen glikol dimetakrilat (EGDMA), 3-(trimetoksisilil)propil metakrilat (TMSPM), trietilamin (TEA), hidroklorik asit (HCl), sodyum hidroksit (NaOH), teknik etanol (EtOH) (98%) ve HEPES Sigma-Aldrich (A.B.D)'den temin edilmiştir. Baskılama molekülü olarak kullanılan β-NAD, yine aynı şekilde kontrol deneyleri sırasında kullanılan ribonükleik asit (RNA), sitidin, sitozin ve kafein molekülleri Sigma-Aldrich (A.B.D)'den alınmıştır. Asetik asit Merck (Almanya)' dan temin edilmiştir. Bütün deneylerde ultra saf su kullanılmıştır. Çizelge 3. 1 'de kullanılan malzemeler ve yapıları verilmektedir. Azot adsorpsiyon-desorpsiyon sisteminde kullanılan sıvı azot Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümünden alınmıştır.

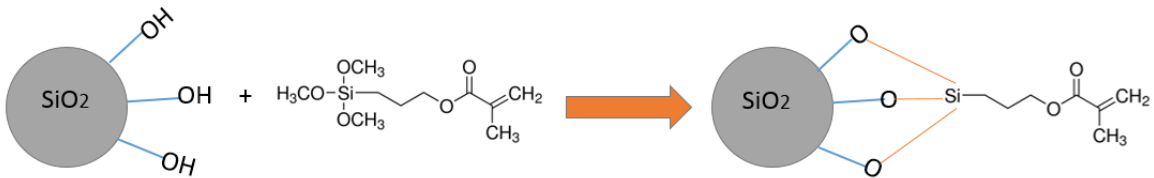
Çizelge 3. 1. Molekül baskılama sorbent sentezi sırasında kullanılan temel kimyasallar.

Kullanılan Malzeme	Fonksiyon	Kimyasal Yapısı
β -Nikotinamid adenin dinükleotid (β -NAD)	Şablon	
4-vinilfenilboronik asit (VPBA)	Monomer	
N-[3-(dimetilamino)propil]metakrilamid (DMAPMA)	Monomer	
Etilen glikol dimetakrilat (EGDMA)	Çapraz bağlayıcı	
Etil alkol	Porojen	

HEPES	Tampon	
-------	--------	---

3.1.2.2. Normal Silika Mikrokürelere Molekül Baskılama Yapılması

Molekül baskılamada çekirdek malzeme olarak kullanılan silika mikrokürelere, “çok basamaklı hidroliz-kondenzasyon yöntemi” ile sentezlenmiştir [77]. Hedef molekül olan β -NAD’ın baskılanacağı polimer tabakasına iyonik bağ veya hidrojen bağı oluşumu yoluyla bağlanması gerekmektedir. Polimer tabakasının oluşturulması için, ilk olarak silika mikrokürelere 80°C ’da 6 saat çalkalamalı su banyosunda HCl ile etkileştirilmiştir. Daha sonrasında mikrokürelere, TMSPM monomeri ile yine 80°C ’de 6 saat çalkalamalı su banyosunda etkileştirilmiştir. Böylece, silikannın hidroksil grupları ile TMSPM’nin trietoksisilan grupları, silanizasyon reaksiyonu ile bağ oluşturarak, TMSPM’nin silika yüzeye kovalent olarak bağlanması ve yüzeyde polimerleşebilir metakrilat gruplarının oluşması sağlanmıştır. Şekil 3. 2 ’ de TMSPM bağlı silika mikrokürelere şematik gösterimi verilmektedir.



Şekil 3. 2. Silika mikrokürelere üzerine TMSPM’nin kovalent olarak bağlanması [17].

Molekül baskılama sentezinde ilk olarak, 76 mg β -NAD, 10 mL HEPES çözeltisi (pH 8.5) ortamında çözülmüştür. Ardından ortama 34 mg VPBA ve 42 μL DMAPMA ve 4 mL etanol eklenmiştir. Monomerlerin ortamda iyice çözünmesi için çözelti bir süre ultrasonik banyoda

tutulduktan sonra pH'ı 8.5' a ayarlanıp, 1 saatliğine karışması için rotatorda (FINEPCR, Kore) döndürülmüştür. Ortam pH'ı ayarlarken, pH'ı düşürmek için hidroklorik asit (HCl), yükseltmek için ise sodyum hidroksit (NaOH) kullanılmıştır. 1 saatin ardından örneğin içerisine önce 20 mg SDS ardında da 100 mg TMSPM bağlı silika mikroküreler eklenmiş ve dispersiyon 3 saat rotatorda döndürülmüştür. Aynı bir yerde 500 µL EGDMA, 10 mg AIBN ve 8 mL etanol içeren çözelti hazırlanmış ve rotatordaki çözelti içerisine eklenmiştir. Son çözeltinin pH'ı kontrol edilip 8.5' a getirildikten sonra çözelti "T reaktör" içerisine konulup, 65°C' de 24 saat boyunca çalkalamalı su banyosunda polimerizasyona tabi tutulmuştur. Polimerizasyon süresi dolduktan sonra çalkalamalı su banyosundan çıkarılan reaktörün soğuması beklendikten sonra mikroküreler, 5000 rpm'de, 8 dakika santrifüjlenmiştir.

Molekül baskılama sonrası hedef molekülün uzaklaştırılması için ağırlıkça %10 asetik asit ve %10 SDS içeren desorpsiyon çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözelti kullanılarak, molekül olarak baskılanan β -NAD, mikrokürelerin etrafındaki polimerik kabuktan uzaklaştırılmıştır. Yıkama yöntemi, molekül baskılanmış mikrokürelerin üç kere yıkama çözeltisi içerisinde, 1 saat boyunca döndürülmesi ile uygulanmıştır. Desorpsiyon işlemi bittikten sonra mikroküreler, ortamdaki asit ve SDS'in uzaklaştırılması için santrifüjlenmiştir. Bu işlem distile su kullanılarak 5 defa 5000 rpm'de 8 dakikalık süre ile yapılmıştır. Yıkama işlemi sona erdikten sonra mikroküreler su içerisinde dağıtılmış ve gravimetrik yöntemle dispersiyondaki mikroküre derişimi tayin edilmiştir. Böylece β -NAD baskılanmış monodispers silika mikroküreler (MIP) elde edilmiştir. Kontrol grubu olarak kullanılan molekül baskılanmamış mikroküre (NIP) sentezi, β -NAD molekülü eklenmeden aynı yöntemle gerçekleştirilmiştir. Bu mikrokürelerin yıkama işlemi de yine aynı şekilde yapıp, mikrokürelerin derişimi gravimetrik analiz yöntemi ile tayin edilmiştir.

3.1.2.3. Manyetik Özelliğe Sahip Silika Mikrokürelere Molekül Baskılama Yapılması

Manyetik özellikteki molekül baskılanmış ve baskılanmamış mikrokürelerin sentezinde öncelikle silika mikrokürelerin etrafı tekrar TEOS katmanı ile kaplanmıştır [76]. Bu amaçla ilk olarak, 25 mL Iso-PrOH ve 2.5 mL distile su içerisinde 0.125 g TBAI çözülmüştür. Ardından ortama 0.125 mL amonyak eklenmiştir. Son olarak çözeltiye manyetik silika mikroküreler (0.2 g) eklenmiş ve ortamda dağılmaları için dispersiyon, 2 dakika sonikasyon işlemine tabi tutulmuştur. Dispersiyon 1 saat boyunca mekanik karıştırıcıda karışmaya

birakılmıştır. Ayrı bir beherde hazırlanan ve hacimce %50 TEOS içeren 1 mL TEOS-Iso-PrOH çözeltisi ortama şırınga yardımı ile damla damla eklenmiştir. Sonuç dispersiyon su banyosu içerisinde 40°C’da, 24 saat boyunca 400 rpm’ de mekanik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Elde edilen silika kaplı, manyetik özelliğe sahip silika mikroküreler, (SiO₂@MagSiO₂) mıknatıs yardımıyla 2 kere Iso-PrOH ile yıkanmış ardından da 40°C’de etüvde 1 gece kurumaya bırakılmıştır.

Manyetik mikroküreler kullanılarak yapılan molekül baskılama için, manyetik olmayan silika mikrokürelerde uygulanan yöntemin aynısı kullanılmıştır. Aynı şekilde, SiO₂@MagSiO₂ mikroküreler önce HCl ile etkileştirilip, ardından TMSPM kullanılarak, mikroküre yüzeyinde polimerleşebilir metakrilat gruplarının eldesi sağlanmıştır. Sonrasında manyetik mikroküreler üzerine β-NAD’ın molekül baskılanması, manyetik olmayan silika mikroküreler için uygulanan yöntemin aynısı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Böylece manyetik özelliğe sahip ve β-NAD baskılanmış monodispers silika mikroküreler (MMIP) elde edilmiştir. Aynı yöntem β-NAD kullanılmaksızın uygulanarak, yine manyetik özelliğe sahip, fakat molekül baskılanmamış mikroküreler (MNIP), kontrol grubu olarak elde edilmiştir.

3.2. Molekül Baskılamada Kullanılan Mikrokürelerin Karakterizasyonu

3.2.1. Yüzey Alanı Ölçümü

Sentezlenen mikrokürelerin yüzey alanı ve gözenek boyutu ölçümü, azot adsorpsiyon-desorpsiyon yöntemi ile BET (Brunauer-Emmett-Teller) modeli kullanılarak yapılmıştır (Quantochrome, Nova 2200e, A.B.D.). Ölçümün öncesinde mikroküreler 80°C’de etüvde kurutulmuştur. Cihazın hücreğine yerleştirilen belli miktardaki mikroküre örneği 6 saat boyunca vakumlanmıştır. Böylelikle kalan nem uzaklaştırılıp, mikrokürelerin tamamen kuruması sağlanmıştır. Analiz sırasında mikroküreler üzerinden azot gazı geçirilmiştir. Cihazın ölçüm prensibi örneğin azot gazını adsorpsiyon ve desorpsiyonuna dayanmaktadır. Yüzey analizi, molekül olarak baskılanan ve baskılanmayan normal ve manyetik silika mikroküreler için yapılmıştır.

3.2.2. Taramalı Elektron Mikroskobu

Taramalı elektron mikroskobu (Scanning Electron Microscope-SEM) mikrokürelerin yüzey morfolojisi, ortalama boy ve boy dağılım özelliklerinin incelenmesi için kullanılmıştır. Bu kapsamda 4 örnek incelenmiştir.

Bunlar;

1. Silika mikroküreler
2. Molekül olarak baskılanan silika mikroküreler
3. Silika kaplı manyetik silika mikroküreler (SiO₂@MagSiO₂)
4. Molekül baskılanan manyetik silika mikroküreler (MMIP)

Örnek hazırlama için öncelikle ağırlıkça % 0.1 derişiminde SDS çözeltisi hazırlanmış ve mikroküre örneği yaklaşık 5 mg/mL olacak şekilde bu çözeltide ultrasonikasyon yoluyla dispers edilmiştir. Örnek çözeltisi örnek platformu üzerine damlatılarak, mikrokürelerin oda sıcaklığında kurutulması sağlanmıştır. Mikroküreler görüntü alımı sırasında iletkenliğin sağlanması için vakum altında ince bir tabaka (yaklaşık 100 Å) halinde altın ile kaplanmıştır. Mikroküreler 2000- 80000X büyütme ile SEM cihazında fotoğraflanmıştır. Her bir örnek için alınmış olan SEM fotoğraflarında yaklaşık 50-100 adet mikroküre ölçülerek, ortalama boy ve değişim katsayısı değerleri bulunmuştur. Ortalama boy değer (D_n) ve değişim katsayısı (CV) aşağıdaki formüller ile hesaplanmaktadır (Eş. 3. 1 ve Eş. 3. 2). Burada N_i, D_i çap değerine sahip mikroküre sayısını ifade etmektedir. N_T ise toplam küre sayısını ifade etmektedir. Görüntü alımı, Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi (UNAM)' da mevcut SEM cihazında (FEI, Quanta 200 FEG, A.B.D.) gerçekleştirilmiştir

$$D_n = \sum N_i D_i / \sum N_i \quad (3.1.)$$

$$CV = [(\sum N_i (D_i - D_n)^2 / [N_T - 1])^{1/2} / D_n] \times 100 \quad (3.2.)$$

3.2.3. Geçirimli Elektron Mikroskobu

Geçirimli elektron mikroskobu (Transmission Electron Microscope-TEM) ile sentezlenen mikrokürelerin yüzeyini kaplayan polimerik katman görüntülenmiştir. TEM ile yüzeyin incelenmesinin nedeni, polimerik katmanın nanometre mertebesinde olması ve SEM’de elde edilen görüntünün bu katmanı incelemek için yeterli olmamasıdır. TEM’de 4 örnek incelenmiştir.

Bunlar aşağıda listelenmiştir.

1. Silika mikroküreler
2. Molekül olarak baskılanan silika mikroküreler (MIP)
3. Silika kaplı manyetik silika mikroküreler ($\text{SiO}_2@\text{MagSiO}_2$)
4. Molekül baskılanan manyetik silika mikroküreler (MMIP)

TEM’deki inceleme için, SEM için hazırlanan örnekler kullanılmıştır. TEM’de inceleme yapılırken örneğin derişik olması ve görüntüde mikrokürelerin üst üste gelmemesi için örnekler iyice (1/1000 oranında) seyreltilmiştir. Örnekten yaklaşık olarak 10 μL alınıp TEM gridlerine damlatılmış ve kurumaya bırakılmıştır. Tamamen kuruduktan sonra örnekler incelenmiştir. Görüntü alımı, Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi (UNAM)’de mevcut olan TEM cihazında (FEI Tecnai, A.B.D.) gerçekleştirilmiştir. Görüntüleme yapılırken MIP ve MMIP üzerinde yer alan polimer katmanında hangi atomların bulunduğunu tespit etmek için, enerji saçılımlı X-ışını spektroskopisi (EDX) kullanılmıştır.

3.2.4. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (Fourier Transform Infrared Spectroscopy-FTIR) kullanılarak, sentezlenen mikrokürelerin fonksiyonel grupları tayin edilmiştir. Sulu ortamda bekleyen MIP, NIP, MMIP ve MNIP örneklerinden uygun miktarda alınıp 1 gece boyunca etüvde 80°C’de kurutulmuştur. Molekül baskılanmış mikrokürelerde oluşan fonksiyonel grupların belirlenmesinde referans olarak silika, HCl ile etkileştirilmiş silika ve TMSPM bağlı silika mikrokürelerinde analizi yapılmıştır. Aynı şekilde manyetik kürelerin incelenmesi sırasında da manyetik silika ve TMSPM bağlı manyetik silika mikroküreler referans olarak kullanılmıştır. FTIR analizleri toz formunda örnek kullanımıyla gerçekleştirilmiştir. Analiz Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Merkez

Laboratuvarında mevcut FTIR spektrofotometresinde (Thermo Fisher Scientific, Nicolet 6700, A.B.D.), Diffüz reflektans spektroskopisi (FTIR-ATR) modunda yapılmıştır.

3.2.5. Titreşimli Örnek Manyetometrisi Analizi

Titreşimli örnek manyetometrisi (Vibrating Sample Magnetometer- VSM) analizinde, mikrokürelerin manyetizasyon davranışı incelenmiş ve doygunluk magnetizasyon değerleri belirlenmiştir. Analiz öncesi manyetik özelliğe sahip molekül baskılanmış ve baskılanmamış manyetik mikroküreler, bir gece boyunca 80°C’da, etüvde kurutulmuştur. Analiz Hacettepe Üniversitesi Fizik Bölümünde mevcut Titreşimli Örnek Magnetometresi sisteminde (Cryogenic Limited, PPM System, İngiltere) gerçekleştirilmiştir.

3.2.6. Kolon Basınç Testi

Kolonda gerçekleştirilen basınç testi için, içerisi MIP ve NIP ile dolgulanmış mikro-kolon şırınga pompasına takılmıştır. HPLC pompası ile sabit akış hızında desorpsiyon ortamı geçirilmiştir. Hareketli faz akış hızı 2 µL/dak değerinden başlayarak arttırılmış ve her bir akış hızında mikrokolon 30 dakika tutularak, geri-basınç değeri kaydedilmiştir. İşleme akış hızı 6 µL/dak değerine gelinceye dek devam edilmiştir.

3.3. Molekül Baskılanmış Sorbentler ile Adsorpsiyon/Desorpsiyon Deneyleri

Çalışmada molekül baskılanmış ve baskılanmamış silika mikroküreler sorbent olarak kullanılarak, hedef molekül olan β-NAD için adsorpsiyon/desorpsiyon davranışı incelenmiştir. Manyetik olmayan silika mikroküreler ile adsorpsiyon/desorpsiyon deneyleri hem kesikli hem de sürekli sistemde yürütülmüştür. Manyetik formdaki molekül baskılanmış ve baskılanmamış silika mikroküreler ile adsorpsiyon/desorpsiyon deneyleri ise kesikli sistemde yapılmıştır. Bütün deneylerde β-NAD, Sigma-Aldrich Co., A.B.D.) hedef molekül olarak kullanılmıştır. Buna ek olarak, ribonükleik asit (RNA torula mayası, Tip VI), sitidin, stozin ve kafein Sigma-Aldrich Co.’dan temin edilmiş ve adsorpsiyon seçiciliğini test etmek amacıyla adsorpsiyon deneylerinde kullanılmıştır. Tüm adsorpsiyon deneyleri 25 mM HEPES tampon çözeltisi (pH 8.5) ortamında yapılmıştır.

3.3.1. Kesikli Sistem Adsorpsiyon Deneyleri

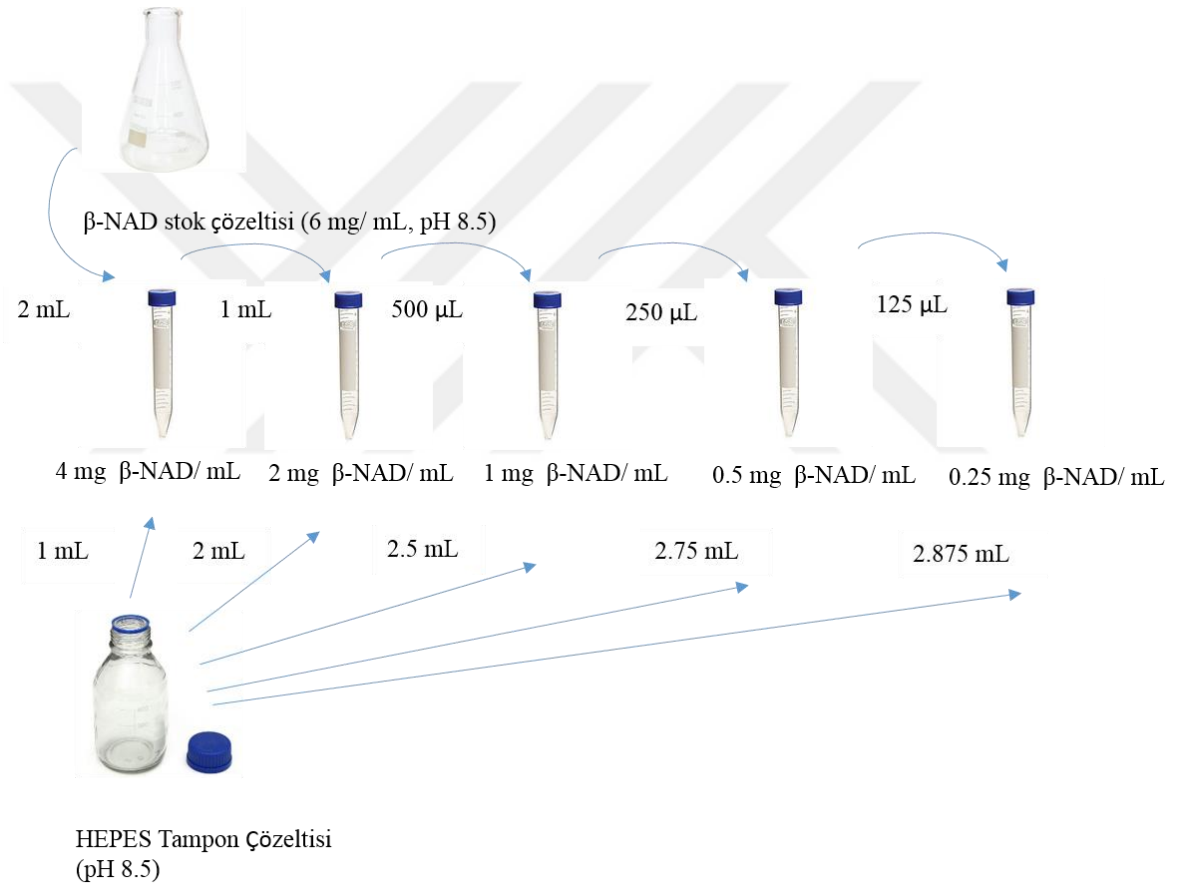
3.3.1.1. Sorbent Derişiminin Etkisi

Sorbent miktarının adsorpsiyona etkisinin belirlenmesi için 100 mL distile suyun içerisinde 0.6 g HEPES çözünerek, 25 mM HEPES tampon çözeltisi hazırlanmıştır. HEPES tamponunun pH değeri 1 M NaOH çözeltisi ile 8.5'a ayarlanmıştır. Adsorpsiyon ortamında 2 mg/mL başlangıç β -NAD derişiminin (C_0) eldesi için 50 mg β -NAD, 25 mL HEPES tampon çözeltisi içerisinde çözülmüştür. Ardından hazırlanan β -NAD stok çözeltisinin pH değeri tekrar kontrol edilmiştir. Böylelikle, adsorpsiyonda kullanılmak üzere 2 mg/mL derişiminde β -NAD çözeltisi hazırlanmıştır. Deneylerde sorbent olarak MIP, NIP, MMIP, MNIP kullanılmıştır. Belirli bir sorbent türü için 1, 2, 5, 10, 20 mg mikroküre tartılarak 2 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. Ardından sorbent 5 kez santrifüjleme-dekantasyon yöntemiyle adsorpsiyon tamponu ile yıkanarak sorbentten gelebilecek olası bir spektrofotometrik kirlilik önlenmiştir. Yıkama işlemi sonrasında mikrospektrofotometre de 260 nm dalga boyunda yıkama ortamının absorbansı ölçülerek, bu değer 0.01'in altında olduğu teyit edilmiştir. Hazırlanmış β -NAD çözeltisinden 1 mL alınıp farklı miktarda sorbent içeren her bir tübe eklenmiştir. Aynı çözeltiden örnek alınarak, uygun oranda seyreltilmiş ve başlangıç β -NAD absorbans değeri 260 nm'de okunmuştur. β -NAD çözeltisi eklenmiş sorbent içeren adsorpsiyon tüpleri oda sıcaklığında 2 saat rotatorda karıştırılarak, β -NAD'ın sorbent üzerine adsorpsiyonu sağlanmıştır. Örnekler rotatordan alınıp 10000 rpm'de 8 dakika boyunca santrifüjlenerek mikrokürelerin çökmesi sağlanmıştır. Santrifüj sonrasında tüplerden alınan süpernatant tekrar 10000 rpm'de 8 dakika santrifüjlenerek içerisinde kalan mikroküre varsa tekrar çöktürülmüş ve böylelikle UV absorbans ölçümünün güvenli yapılabilmesi sağlanmıştır. İkinci santrifüjde elde edilen süpernatant uygun oranda seyreltilerek 260 nm'de absorbans değeri mikrospektrofotometre'de okunmuştur.

3.3.1.2. İzoterm Eldesi

Bu amaçla ilk olarak 100 mL distile suyun içerisinde 0.6 g HEPES çözünerek 25 mM HEPES çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan HEPES çözeltisinin pH değeri 1 M NaOH ile 8.5 değerine ayarlanmıştır. Adsorpsiyon ortamında β -NAD başlangıç derişimi 0.25-6.0 mg β -NAD/mL aralığında değiştirilmiştir. Ortamda sorbent olarak 5 mg MIP, NIP, MMIP, MNIP kullanılmıştır. Her bir β -NAD başlangıç derişimi için kullanılacak sorbent (5 mg) mikrosantrifüj tüplerine konmuştur. Ardından sorbent santrifüjleme-dekantasyon

yöntemiyle yıkanarak spektrofotometrik ölçümde oluşabilecek olası kirlilik giderilmiştir. Her bir tüpte bulunan adsorpsiyon ortamlarının farklı β -NAD başlangıç derişimleri ile eldesi için 6 mg/mL derişimine sahip β -NAD stok çözeltisi hazırlanmıştır (36 mg β -NAD/ 6 mL HEPES tampon çözeltisi). Hazırlanan çözeltinin pH değeri kontrol edilip 8.5'a ayarlanmıştır. Bu stok çözeltisinden yine pH 8.5, 25 mM HEPES tamponu ile uygun oranlarda seyreltme yapılarak farklı β -NAD başlangıç derişimleri ile kullanılacak adsorpsiyon ortamları elde edilmiştir. Çözeltilerin hazırlanışı Şekil 3. 3 ' te gösterilmektedir.



Şekil 3. 3. Farklı başlangıç derişimlerinde β -NAD adsorpsiyon ortamlarının hazırlanması.

Farklı başlangıç derişimine sahip çözeltilerden 1 mL alınıp her bir tüpte bulunan 5 mg sorbentin üzerine eklenmiş, kalan hacim ise başlangıç absorbans değerinin okunması için ayrılmıştır. Adsorpsiyon tüpleri oda sıcaklığında 2 saatliğine rotatorda karışmaya bırakılmıştır. 2 saat sonra alınan örnekler 10000 rpm de 8 dakika santrifüjlenmiştir.

Örneklerden alınan süpernatant için santrifüjleme işlemi 10000 rpm’de 8 dakika süre ile tekrarlanmıştır. Uygun oranda seyreltilen örneklerin absorbans değerleri mikrospektrofotometre cihazında 260 nm dalga boyunda okunmuştur.

3.3.1.3. Spektrofotometrik Yöntemle β -NAD Derişiminin Tayini

Bu deneylerde sorbent derişimi, β -NAD derişimi ve sorbentin tekrar kullanılabilirliğinin β -NAD denge adsorpsiyonu üzerine etkisi incelenmiştir. β -NAD için, adsorpsiyon ortamında başlangıç absorbans (A_0) ve adsorpsiyon sonrası absorbans (A_f) değerleri mikrospektrofotometre’de (Biodrop, Touch, İngiltere) okunmuştur. Okunan A_0 ve A_f değerlerinden, sorbentin dengede adsorpladığı hedef molekül miktarını belirlemek için Eş. 3.3 kullanılmıştır.

$$q = \frac{A_0 - A_f}{A_0} \times \frac{C_0 \times V}{m_a} \quad (3.3.)$$

Burada:

q: Denge adsorpsiyon değeri (mg hedef molekül/g sorbent),

C_0 : Başlangıç hedef molekül derişimi (mg hedef molekül/mL),

V: Adsorpsiyon çözeltisi hacmi (mL),

m_a : Sorbent kütlesi (g),

A_0 : Adsorpsiyon öncesi hedef molekül başlangıç absorbans değeri,

A_f : Adsorpsiyon sonrası hedef molekül sonuç absorbans değeri.

Molekül baskılanmış ve baskılanmamış sorbent için bulunan denge adsorpsiyon değerleri oranlanarak “molekül baskılama faktörü” (Imprinting Factor- IF) Eş. 3.4’ de ile hesaplanmıştır. Denklemdaki, q_{MIP} molekül baskılanmış sorbentin denge adsorpsiyon değerini ve q_{NIP} ise molekül baskılanmamış sorbentin denge adsorpsiyon değerini göstermektedir.

$$IF = \frac{q_{MIP}}{q_{NIP}} \quad (3.4.)$$

3.3.1.4. Kesikli Sistemde Tekrar Kullanılabilirlik

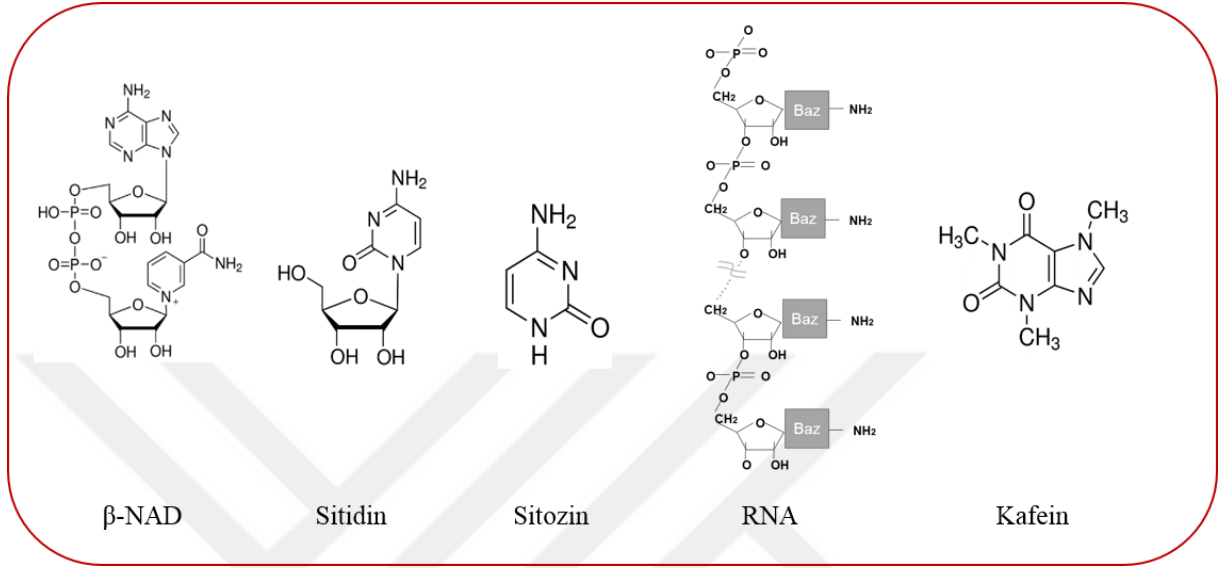
Deneylerde, sentezlenen mikrokürelerin tekrar kullanılabilirliği incelenmiştir. Bu deneyde β -NAD baskılanmış aynı mikroküre örneğine, ardışık olarak 5 kere adsorpsiyon yapılmıştır. Deneyde MIP, NIP, MMIP ve MNIP için 5 mg sorbent kullanılmıştır, mikroküreler mikrosantrifüj tüplerine konulmuştur. Deneye başlamadan önce HEPES tampon çözeltisi hazırlanmıştır. Bunun için 250 mL distile suyun içerisinde 1.5 gram HEPES çözülüp ortam pH'ı 8.5' a ayarlanmıştır. β -NAD çözeltisi içinde, 50 mg β -NAD 25 mL HEPES tampon çözeltisinde çözülmüştür. 2 mg/mL derişimindeki β -NAD çözeltisinin pH'ı 8.5 değerine getirilmiştir. Desorpsiyon çözeltisi 100 mL distile su içerisinde 10 g SDS ve 10 mL asetik asit eklenerek hazırlanmıştır.

Adsorpsiyon için sorbent β -NAD içermeyen adsorpsiyon tamponu ile santrifüjleme-dekantasyon yöntemi kullanılarak 5 kez yıkanmıştır. Sorbentin üzerine 1 mL, 2 mg/mL - β -NAD içeren adsorpsiyon ortamı eklenip 1 saat rotatorda oda sıcaklığında 100 rpm hızda karıştırılmıştır. 1 saatin sonunda sorbent santrifüjde çöktürülmüş ve adsorpsiyon ortamının süpernatant kısmı alınıp, spektrofotometrik analiz için saklanmıştır. Adsorpsiyon deneyi bitiminde sorbentin üzerindeki bütün sıvı alınıp üzerine desorpsiyon ortamı eklenmiştir. Örnek 30 dakika boyunca rotatorda döndürülerek sorbente adsorbe olan β -NAD sökülmüştür. 30 dakika sonra ortam rotatordan alınıp 10000 rpm'de 8 dakika boyunca santrifüjlenerek, mikroküreler çöktürülmüş ve ardından 5 kere distile suyla yıkanmıştır. Yıkama işlemi bittikten sonra sorbent tekrar adsorpsiyon ortamıyla yıkanmış ve adsorpsiyon basamağı tekrarlanmıştır. Bu işlem 4 kez daha tekrarlanmış ve her seferinde adsorpsiyon sonrasındaki süpernatant alınarak ve HEPES tamponu ile aynı oranda seyreltilerek 260 nm'de absorbans değeri mikrospektrofotometre cihazında okunmuştur.

3.3.1.5. Farklı Moleküller ile Adsorpsiyon Deneyleri

Üretilen MIP ve MMIP için en yüksek denge adsorpsiyon değerinin β -NAD ile eldesi beklenmektedir. Bunu göstermek için sentezlenen MIP, MMIP sorbentleri, kimyasal yapıları β -NAD'a benzeyen farklı moleküllerle etkileştirilerek, seçilen moleküller için denge adsorpsiyon değerleri tayin edilmiştir. Bu amaçla kullanılan moleküler yapılar Şekil 3.4' te verilmektedir. Bu gruptaki deneylerde kontrol sorbenti olarak NIP ve MNIP kullanılmış ve

bu sorbentler ile elde edilen denge adsorpsiyon değerleri, MIP, MMIP sorbentleri ile elde edilen değerler ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 3. 4. MIP ve MMIP seçimlilik davranışının belirlenmesi için kullanılan analitler [79].

Bu deneylerde 2 mg/mL başlangıç derişimine sahip adsorpsiyon ortamları 25 mM HEPES tampon çözeltisi (pH 8.5) ile hazırlanmıştır. Elde edilen adsorpsiyon ortamları, 25 mM pH 8.5 HEPES tamponu ile uygun oranda seyreltilmiş ve her bir örneğin absorbans değeri mikrospektrofotometre’de 260 nm dalga boyunda okunarak, başlangıç derişimine karşı gelen absorbans değerleri belirlenmiştir. Her bir molekül için yapılan adsorpsiyonlarda sorbent kütlesi 1 mL adsorpsiyon hacminde 5 mg değerinde tutulmuştur. Sorbent olarak seçilen mikroküreler hedef molekül içermeyen adsorpsiyon çözeltisi ile 5 kez santrifüjleme-dekantasyon yöntemiyle yıkanmış, sorbent üzerine seçilen molekülü içeren 1 mL adsorpsiyon ortamı eklenip, adsorpsiyon için ortam rotatorda 2 saat oda sıcaklığında 100 rpm hızla karıştırılmıştır. Adsorpsiyon süresinin bitiminde adsorpsiyon ortamı 2 kez 10000 rpm’de 8 dakika süreyle santrifüjlenerak, sıvı kısım izole edilmiştir. Elde edilen süpernatant, 25 mM pH 8.5 HEPES tamponu ile uygun oranda seyreltilmiş ve her bir örneğin absorbans değeri mikrospektrofotometre’de 260 nm dalga boyunda okunmuştur.

3.3.2. Sürekli Sistemde Adsorpsiyon Deneyleri

Sürekli sistem deneylerinde, normal molekül baskılanmış silika mikroküreler sabit faz olarak kullanılmıştır. Sabit faz iç çapı 300 µm, dış çapı 430 µm olan 150 mm uzunluğundaki silika kapiler içerisine dolgulanmıştır. Sabit fazın silika kapiler içerisnde kalmasını sağlayabilmek için kolonun çıkış ucuna bir paslanmaz çelik gözenekli frit monte edilmiştir. Bu sayede MIP dispersiyonu, 1 mL hacme insülin şırıngası kullanılarak, silika kapiler kolon içerisine dolgulanmıştır. Kolon doldurulduktan sonra HPLC pompasına (Dionex-Ultimate 3000, A.B.D) bağlanarak sabit fazın kolon içerisine sıkı bir şekilde dolgulanması sağlanmış ve oluşan boşluk, yeni MIP dispersiyonu eklenerek doldurulduktan sonra, pompa ile sıkıştırma işlemi tekrarlanmış ve kolon tamamiyle dolgulanıncaya dek, dispersiyon ekleme ve sıkıştırma basamakları tekrar edilmiştir. Dolum işlemi tamamlandığında kolonun dolgulanmış kısmında bir boşluk olup olmadığı optik mikroskopla kontrol edilmiştir. Bu şekilde oluşturulan sürekli sistemde adsorpsiyon ortamı olarak 25 mM HEPES tamponu (pH 8.5) ve desorpsiyon ortamı olarak ağırlıkça %10 SDS/ % 10 asetik asit içeren sulu çözelti kullanılmıştır. Sürekli sistemde mikro-kolon bağlantı elamanları yardımıyla şırınga pompasına (Harvard Apparatus, A.B.D.) takılmıştır. Şekil 3. 5' te kurulmuş olan sürekli sistem mikro-borat afinite kromatografisi düzeneği gösterilmektedir.



Şekil 3. 5. Mikro-borat afinite kromatografisi deney düzeneği.

Adsorpsiyon ortamı 30 dakika mikro-kolondan geçirilmiş ve mikro-kolon adsorpsiyon için şartlanmıştır. Ardından pH 8.5 değerine 0.05 mg β -NAD/mL başlangıç derişimine sahip adsorpsiyon ortamı 2 μ L/dak akış hızıyla kolona yüklenerek, kolon çıkışı mikrosantrifüj tüplerine toplanmıştır. Bu amaçla her bir tüpe 3 dakika boyunca 6 μ L örnek alınmıştır. Toplam 10 tüpe örnek alınarak, örneklerin absorbansı 260 nm dalga boyunda mikrospektrofotometre de okunarak, kolon çıkış akımındaki β -NAD derişiminin zamanla değişimi belirlenmiştir.

Sürekli sistemde β -NAD' ın adsorpsiyon verimi (Θ , % Ağ.), aşağıda verilen formüllerle hesaplanmıştır.

$$\Theta = [M_{\beta-NAD,Adsorplanan}/M_{\beta-NAD,Yüklenen}]x100 \quad (3.5.)$$

$$M_{\beta-NAD,Adsorplanan} = M_{\beta-NAD,Yüklenen} - M_{\beta-NAD,Adsorplanmayan} \quad (3.6.)$$

$$M_{\beta-NAD,Yüklenen} = Qx C_0x t \quad (3.7.)$$

$$M_{\beta-NAD,Adsorplanmayan} = V_Ax C_A \quad (3.8.)$$

Burada:

$M_{\beta-NAD,Yüklenen}$ = Mikrokolona yüklenen β -NAD miktarı (mg)

Q = Adsorpsiyon ortamı akış hızı (μ L/dak)

t = Adsorpsiyon ortamı akış süresi (dak.)

C_0 = Adsorpsiyon ortamındaki β -NAD derişimi (mg/ μ L)

$M_{\beta-NAD,Adosrplanmayan}$ = Adsorpsiyon sırasında toplanan örneğin β -NAD miktarı (mg)

V_A = Adsorpsiyon sırasında toplanan örneğin hacmi (μ L)

C_A = Adsorpsiyon sırasında toplanan örneğin β -NAD derişimi (mg/ μ L)

olarak tanımlanmaktadır.

3.3.2.1. Mikro-kolonda Tekrar Kullanılabilirlik Deneyleri

Mikro-kolon'da tekrar kullanılabilirlik deneyleri sabit faz olarak MIP kullanılarak yapılmıştır. Bu deney serisinde aynı kolonda 5 defa adsorpsiyon, 4 defa desorpsiyon yapılmıştır. Deney öncesi 0.05 mg/mL derişiminde β -NAD içeren pH 8.5 değerine sahip adsorpsiyon ortamı hazırlanmıştır. Tekrar kullanılabilirlik deneylerinde 150 mm uzunluk ve 300 mm iç çap değerine sahip mikro-kolon kullanılmıştır. Kolondan 30 dakika boyunca 2 μ L/dak akış hızında adsorpsiyon ortamı geçirilerek kolon koşullandırılmıştır. 1 mL adsorpsiyon ortamı insülin enjektörüne konularak, enjektör pompaya yerleştirilmiştir. Sistem çalıştırılarak 2 μ L/dak akış hızında β -NAD çözeltisi 30 dakika süreyle kolondan geçirilmiştir. Mikro-kolon çıkışı bir mikro-pipet yardımı ile toplanarak mikro-santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Her tüp için 3 dakika süreyle 6 μ L hacim toplanmıştır. 10 tüp örnek 30 dakika süreyle alındıktan sonra, tüm tüplerin içerisindeki örneklerin absorbans değerleri mikrospektrofotometre'de 260 nm dalga boyunda okunmuştur. Ardından mikro-kolondan 1 saat boyunca 2 μ L/dak akış hızıyla desorpsiyon ortamı geçirilmiş ve adsorbe edilen β -NAD kolondan sökülmüştür. Ardından desorpsiyon ortamını sabit fazdan uzaklaştırmak için, mikro-kolon 1 saat boyunca 2 μ L/dak akış hızında distile su ile yıkanmıştır. Bu işlem sonrasında kolon tekrar pH 8.5, 25 mM HEPES çözeltisi ile 30 dakika boyunca 2 μ L/dak akış hızı ile yıkanarak bir sonraki adsorpsiyon basamağı için koşullandırılmıştır. Ardından yeni adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü yukarıda verilen koşullarda tekrarlanmış ve işlem 5 kez adsorpsiyon ve desorpsiyon yapıncaya dek sürdürülmüştür.

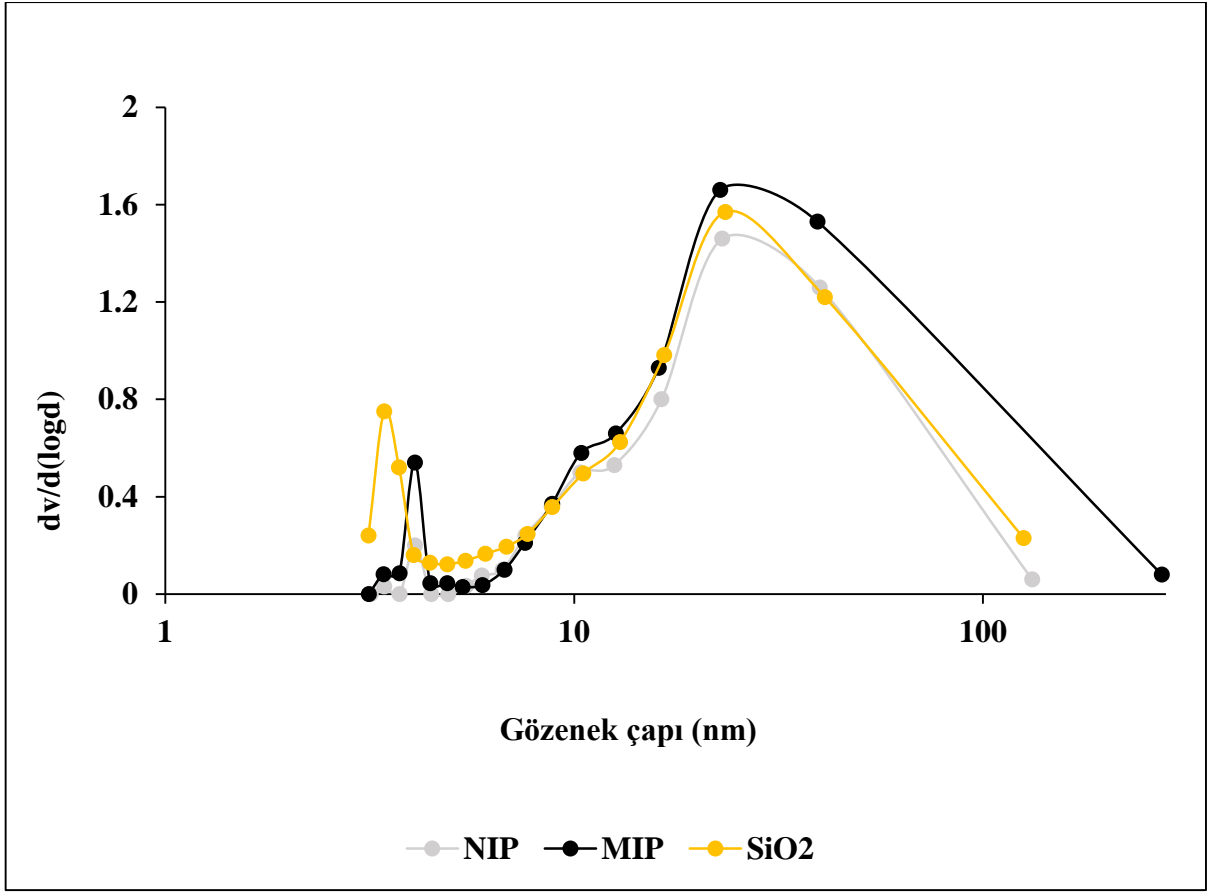
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

4.1. Karakterizasyon

Molekül baskılama yönteminde sorbent olarak kullanılan silika mikrokürelerin sentezi çok basamaklı hidroliz kondenzasyonu yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Ardından sentezlenen mikroküreler, 4-dimetilaminopropil metakrilamid (DMAPMA) ve 4- vinilfenilboronik asit (VPBA) monomerleri ve etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) çapraz bağlayıcısı kullanılarak fonksiyonelleştirilmiştir. Silika mikrokürelerin etrafında oluşturulan polimer katmanı BET, SEM, TEM ve FT-IR; mikrokürelerin manyetik özelliği ise VSM analizi ile karakterize edilmiştir. Mikrokürelerin karakterizasyonunda önemli olan, fonksiyonelleştirdiğimiz mikrokürelerin etrafında bir polimer katmanı oluştuğunu gösterebilmektir.

4.1.1. Gözeneklilik Analizi Sonuçları

Molekül baskılama yönteminde sorbent olarak kullanılan silika mikrokürelerin özgül yüzey alanları azot adsorpsiyon desorpsiyon yöntemi ile ölçülmüştür. Molekül baskılanmış silika mikroküreler (MIP) ve molekül baskılanmayan silika mikrokürelerin (NIP) yüzey alanları silika mikrokürelerin yüzey alanları ile karşılaştırılmıştır. Aynı şekilde manyetik molekül baskılanmış silika mikroküreler (MMIP) ve manyetik molekül baskılanmayan silika mikrokürelerin (MNIP) yüzey alanları tayin edilerek manyetik silika mikrokürelerin yüzey alanları ile karşılaştırılmıştır. Şekil 4. 1' de silika mikroküreler, MIP ve NIP için gözenek boy dağılım eğrileri verilmektedir.



Şekil 4. 1. Silika, MIP ve NIP mikroküreler için azot adsorpsiyon/ desorpsiyon yöntemi ile elde edilen gözenek boy dağılım eğrileri.

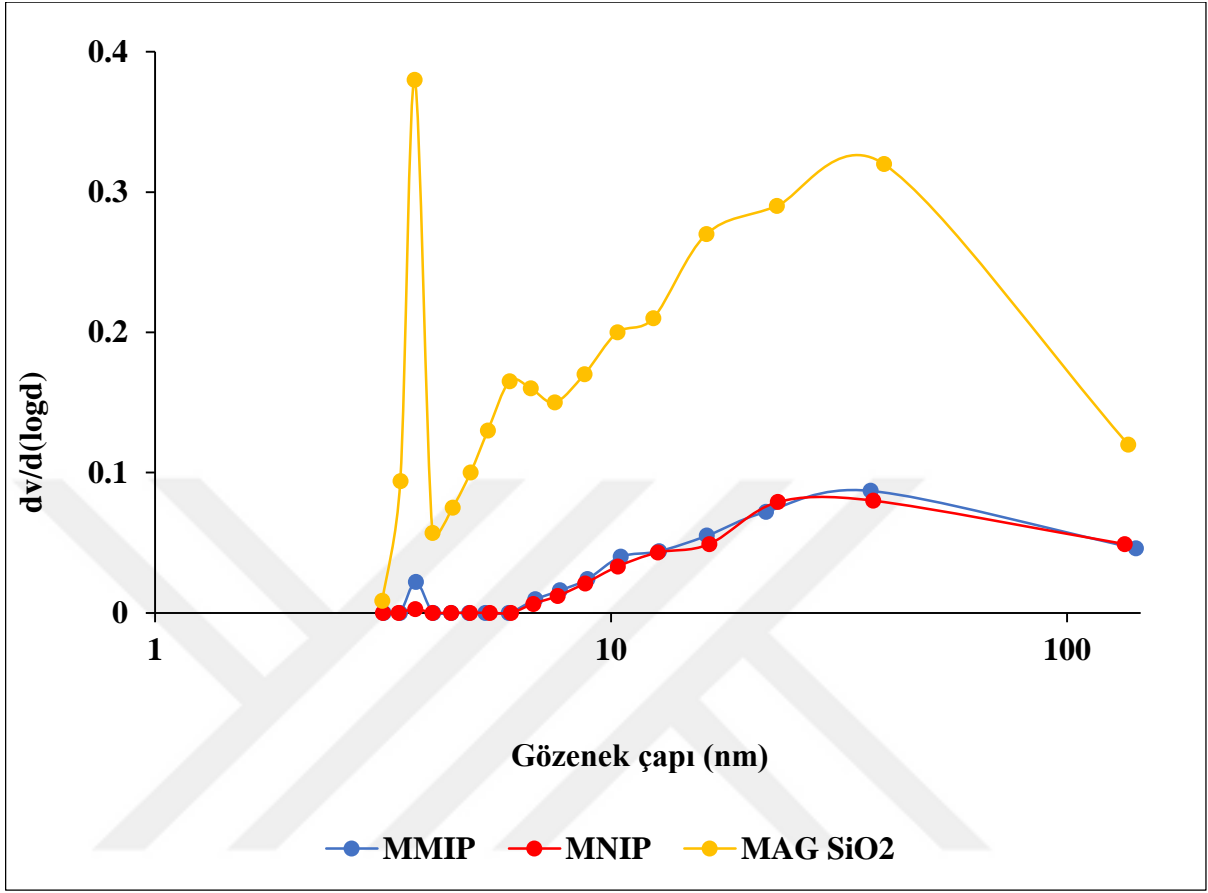
Şekil 4. 1'e bakıldığında sentezlenen mikrokürelerde mezogözenek ve makrogözenek yapısının varlığı birlikte görülmektedir. Manyetik olmayan silika mikroküreler, MIP ve NIP için, ortalama gözenek boyutu ve özgül yüzey alanı ise Çizelge 4. 1' de verilmektedir.

Çizelge 4. 1. Silika mikroküreler, MIP ve NIP için özgül yüzey alanı, gözenek hacmi ve ortalama gözenek boyutu.

Mikroküre Türü	Özgül yüzey alanı (m²/g)	Gözenek Hacmi (cm³/g)	Ortalama Gözenek Boyutu (nm)
Silika	373	1.16	12.4
MIP	158	1.02	28.07
NIP	116	0.81	25.86

Silika mikroküreler, MIP ve NIP için özgül yüzey alanları sırasıyla 373 m²/g, 116 m²/g ve 158 m²/g olarak hesaplanmıştır. Buna ek olarak, MIP için ortalama gözenek boyutu ve gözenek hacmi, NIP için tayin edilenlerden daha yüksek bulunmuştur. Bu bulgular MIP için molekül baskılama yapılmış boşlukların varlığını kanıtlamaktadır.

Şekil 4. 2' de manyetik silika mikroküreler, MMIP ve MNIP için gözenek boy dağılım eğrileri gösterilmektedir. Manyetik silika mikroküreler, MMIP ve MNIP için, ortalama gözenek boyutu ve özgül yüzey alanı Çizelge 4.2' de verilmektedir. Şekil 4.2' ye bakıldığında sentezlenen mikrokürelerde mezogözenek ve makrogözenek yapısının (2–100 nm) varlığı birlikte görülmektedir.



Şekil 4. 2. Manyetik silika, MMIP ve MNIP mikroküreler için azot adsorpsiyon/ desorpsiyon yöntemi ile elde edilen gözenek boy dağılım eğrileri.

Çizelge 4. 2. Manyetik silika, MMIP ve MNIP için özgül yüzey alanı, gözenek hacmi ve ortalama gözenek boyutu değerleri.

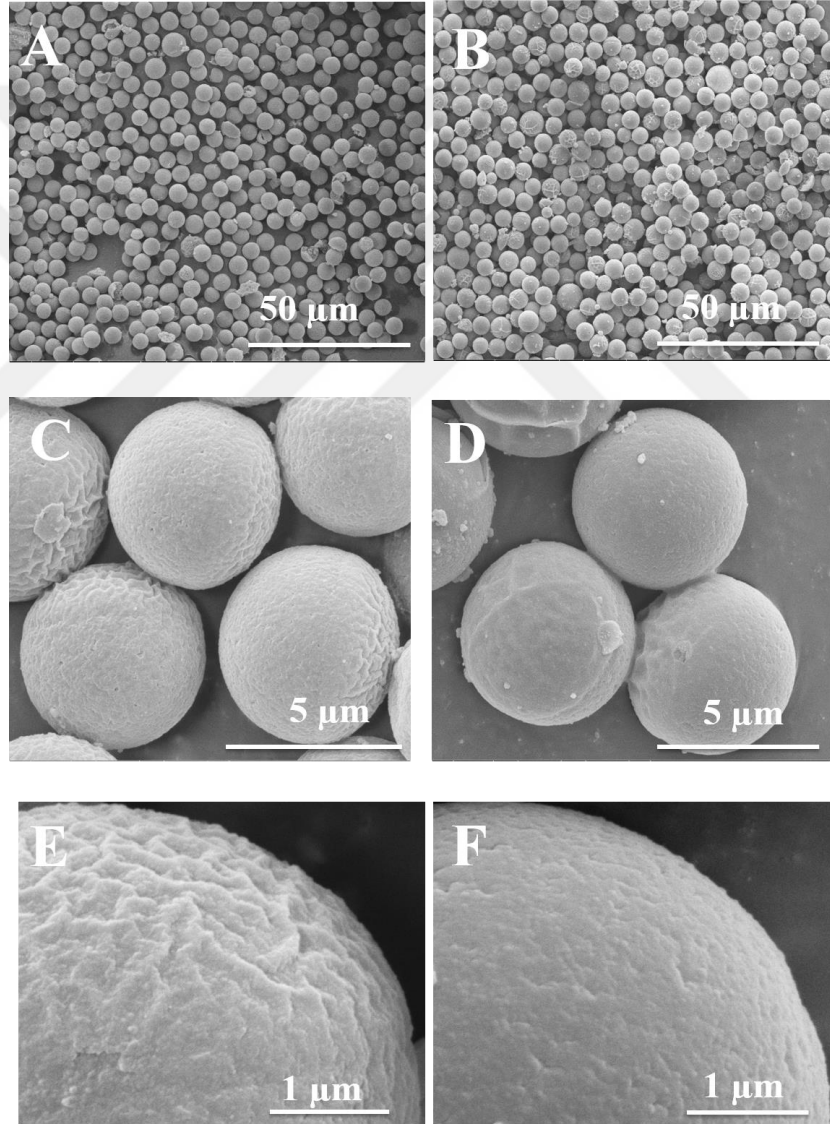
Mikroküre Türü	Özgül yüzey alanı (m ² /g)	Gözenek Hacmi (cm ³ /g)	Ortalama Gözenek Boyutu (nm)
Manyetik silika	183	0.390	8.61
MMIP	62.8	0.096	6.15
MNIP	55.1	0.084	6.12

Manyetik silika mikroküreler, MMIP ve MNIP için özgül yüzey alanı değerleri sırasıyla 183, 62.8 ve 55.1 m²/g olarak hesaplanmıştır. Buna ek olarak, MMIP için ortalama gözenek

boyutu ve gözenek hacmi, MNIP için tayin edilen değere göre daha yüksektir. Bu durum MMIP için molekül baskılama yapılmış boşlukların varlığını kanıtlamaktadır.

4.1.2. Mikrokürelerin Morfolojik Analizi

Silika mikroküreler ve MIP için yüzey morfolojisi ve ortalama boy ve boy dağılımı taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak incelenmiştir (Şekil 4.3). SEM görüntüleri kullanılarak ortalama mikroküre boyutu ve değişim katsayısı hesaplanmıştır (Çizelge 4.3).



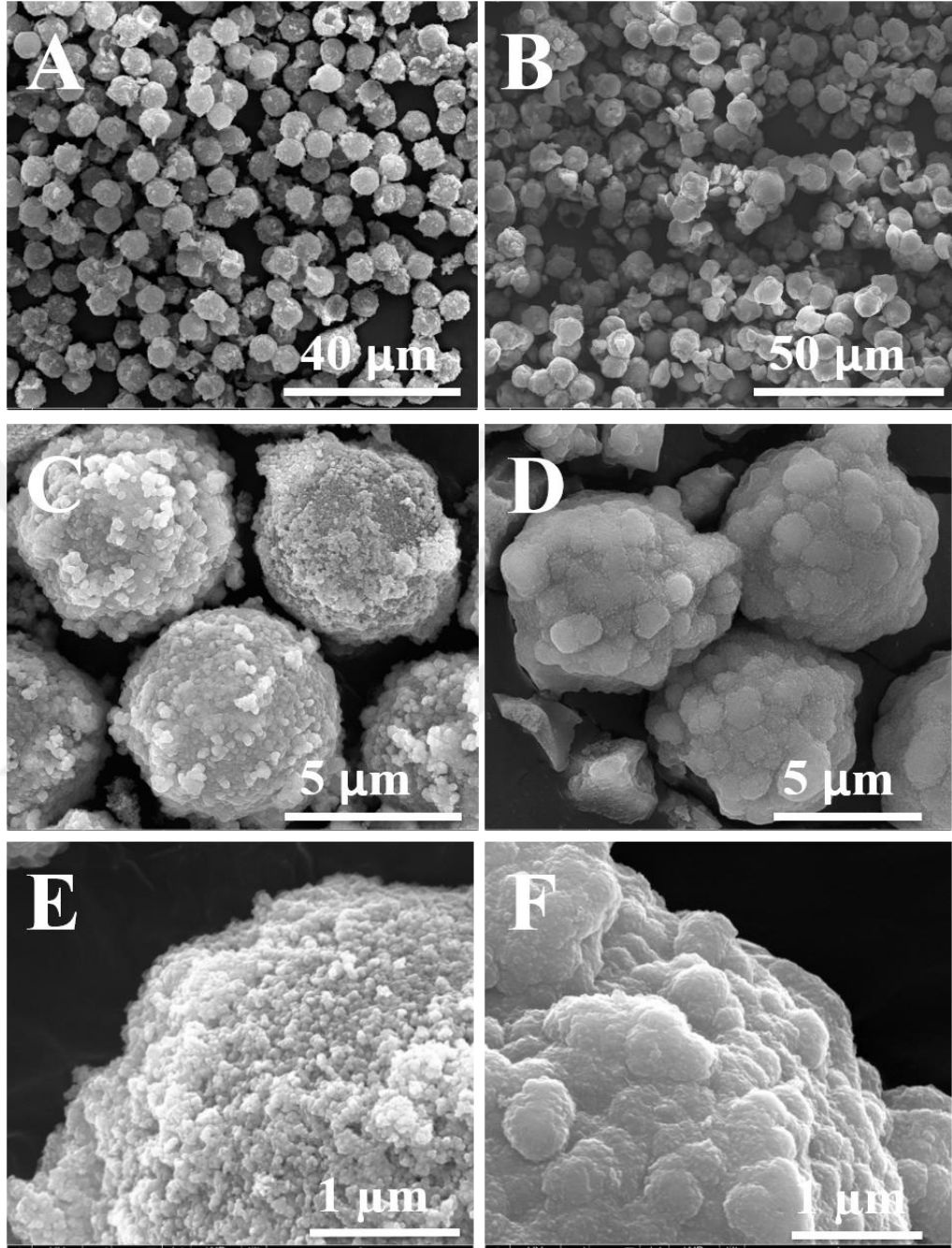
Şekil 4. 3. A), C), E) Silika mikroküreler ve B), D), F) MIP için yüzey morfolojisi, ortalama boy ve boy dağılımını gösteren SEM görüntüleri. Büyütme oranı: (A-B): 2000X, (C-D) 20000X, (E-F) 77000X

Çizelge 4. 3. Silika mikroküreler ve MIP için ortalama boy ve değişim katsayısı değerleri.

Mikroküre türü	Ortalama boy (µm)	Değişim katsayısı (CV %)
Silika	5.36	4.65
MIP	5.71	4.89

Şekil 4. 3 A-B'den görüldüğü gibi geliştirilen yöntem, silika mikroküreler ve MIP için monodispers-gözenekli formda üretime imkan vermektedir. Mikroküre boy değişim katsayılarının küçük oluşu da monodispersiteyi desteklemektedir. Silika mikroküreler pürüzlü bir yüzeye sahiptir (Şekil 4.3 E). Ancak, bu materyal üzerinde fonksiyonel monomer ve çapraz bağlayıcı kullanılarak polimerizasyon yoluyla katman eldesi sonrasında, MIP yüzeyi oldukça pürüzsüz bir hale gelmiştir (Şekil 4. 3F). Bu sonuç, molekül baskılama için oluşturulan polimer katmanının silika mikroküre yüzeyinde varlığını göstermektedir. Silika mikrokürelerin ortalama mikroküre boyutu 5.36 µm, MIP için ortalama mikroküre boyutu ise polimerik katman nedeniyle 5.71 µm olarak bulunmuştur (Çizelge 4. 3).

Manyetik silika mikroküreler ve MMIP için yüzey morfolojisi, ortalama boy ve boy dağılımını gösteren SEM görüntüleri Şekil 4. 4' te verilmektedir. SEM görüntülerinden yararlanılarak ortalama mikroküre boyutu ve değişim katsayısı hesaplanmıştır (Çizelge 4. 4).



Şekil 4. 4. A), C), E) Manyetik silika ve B), D), F) MMIP için yüzey morfolojisi, ortalama boy ve boy dağılımını gösteren SEM görüntüleri. Büyütme oranı: (A-B): 2000X, (C-D) 17000X, (E-F) 60000X

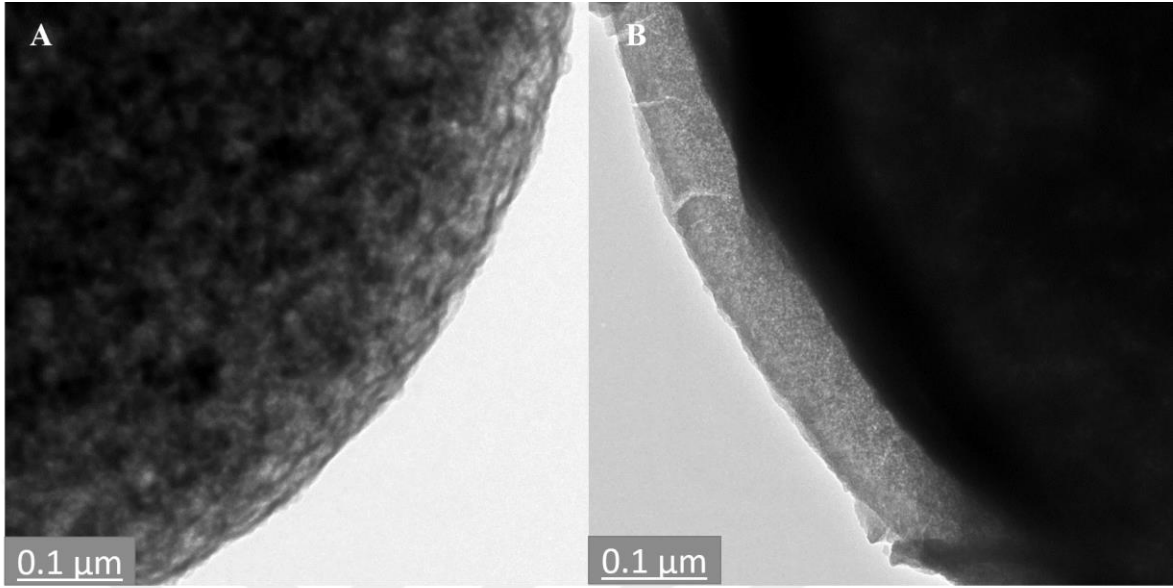
Çizelge 4. 4. Manyetik silika ve MMIP için ortalama boy ve değişim katsayısı değerleri.

Mikroküre türü	Ortalama boy (μm)	Değişim katsayısı (CV %)
Manyetik silika	6.34	3.83
MMIP	6.49	4.13

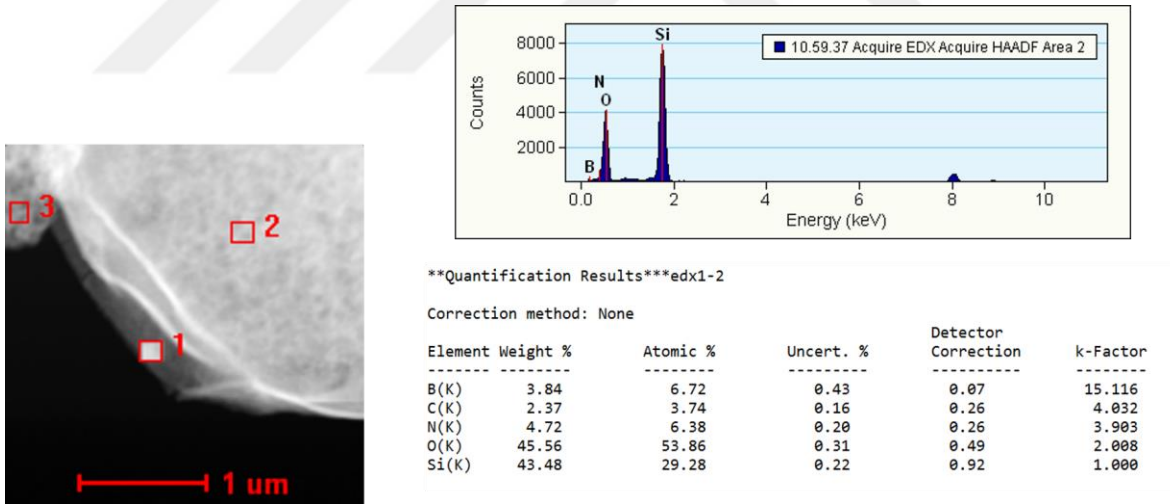
Şekil 4. 4 A-B'den, manyetik silika mikroküreler ve MMIP'in monodispers-gözenekli formda üretildiği görülmektedir. Değişim katsayılarının % 5'ten daha az olması monodispers özelliği destekleyen bir bulgudur. Ayrıca, manyetik silika mikrokürelerin yüzeyindeki demir tuzları oldukça belirgin şekilde gözlenirken (Şekil 4. 4 E), MMIP yüzeyinin bir katmanla kaplı olduğu görülmektedir (Şekil 4. 4 F). Bu katman, materyal üzerinde fonksiyonel monomerler ve çapraz bağlayıcı kullanılarak polimerik katmanın oluşturulduğunu göstermektedir (Şekil 4. 4 F). Manyetik silika için ortalama mikroküre boyutu 6.34 μm , MMIP için ortalama mikroküre boyutu ise polimerik katman nedeniyle 6.49 μm olarak bulunmuştur (Çizelge 4. 4).

4.1.3. Mikrokürelerin Yığın Yapısı

Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) yardımıyla, silika ve manyetik silika mikroküreler üzerinde fonksiyonel monomerler ve çapraz bağlayıcı kullanılarak polimerizasyon yoluyla oluşturulan molekül baskılama katmanının varlığı incelenmiştir. Şekil 4.5' te silika mikroküreler ile MIP için karşılaştırmalı TEM görüntüsü, Şekil 4. 6' da MIP'in incelenen bölgeye göre EDX sonuçları verilmektedir.



Şekil 4. 5. A) Silika mikroküreler ve B) MIP için karşılaştırmalı TEM görüntüleri.

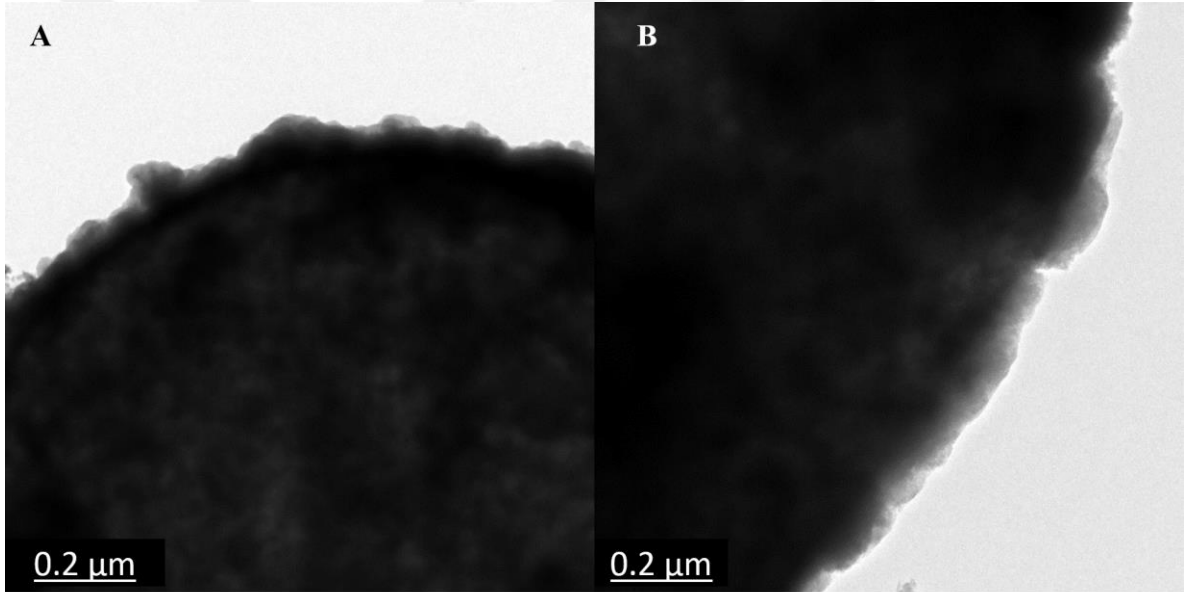


Şekil 4. 6. MIP için mikroküre üzerinde seçilen bölgeye göre elde edilen EDX sonuçları.

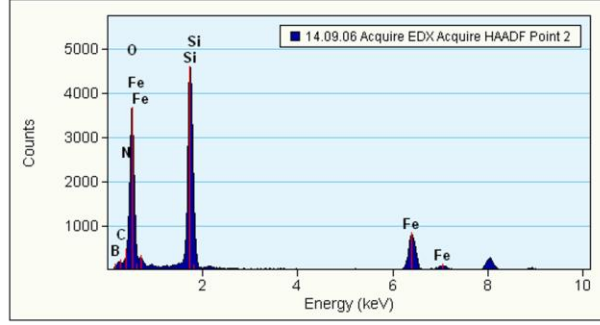
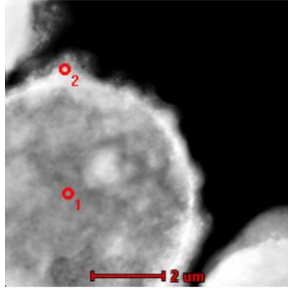
Silika mikroküre yüzeyinde polimerik katman yokken, molekül baskılanmış silika mikrokürelerde polimerik katman bariz bir şekilde görülmektedir (Şekil 4. 5). Böylece MIP için çekirdek-kabuk yapısının oluşturulduğu anlaşılmaktadır. Görüldüğü gibi polimerik katman, silika çekirdeği homojen bir şekilde kaplamaktadır.

EDX analiz sonuçları da silika mikrokürelerin dış yüzeyinde polimerik katmanın varlığını göstermektedir (% 6.72 oranında bor ve % 6.38 oranında da azot). Böylece bor'un VPBA, azot'un ise DMAPMA ile polimerik katmanın yapısına girdiği kanıtlanmaktadır. Aynı zamanda yüzeyde % 29.28 oranında silisyum bulunmuştur. Dış polimerik katmandan mikroküre merkezine doğru gidildikçe silisyum miktarı artmaktadır.

Şekil 4. 7' de manyetik silika mikroküreler ile MMIP için karşılaştırmalı TEM görüntüleri, Şekil 4. 8' de ise MMIP için seçilen bölgeye göre EDX sonuçları verilmektedir. Manyetik silika mikrokürelerin yüzeyinde demir oksit nanopartiküllerin varlığı gözlenirken, MMIP için silikanın etrafını saran polimerik katman bariz bir şekilde görülmektedir (Şekil 4. 7).



Şekil 4. 7. A) Manyetik özelliğe sahip silika kaplı silika mikroküreler ($\text{SiO}_2@\text{MagSiO}_2$), B) Manyetik özelliğe sahip silika kaplı silika mikrokürelerin molekül baskılanmış formu (MMIP).



Quantification Results edx1-2

Correction method: None

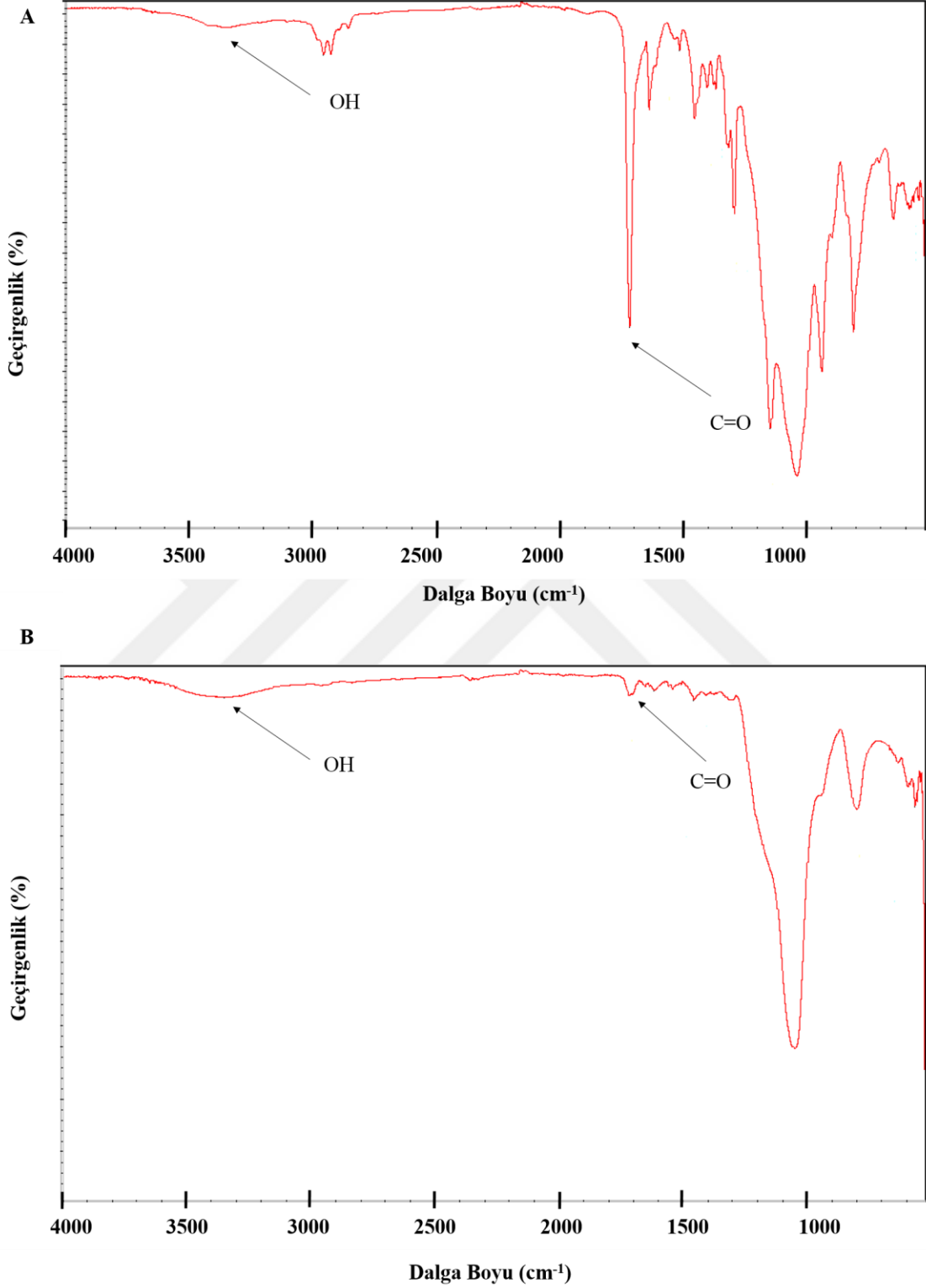
Element	Weight %	Atomic %	Uncert. %	Detector Correction	k-Factor
B(K)	3.97	7.04	0.42	0.07	15.116
C(K)	4.10	6.54	0.19	0.26	4.032
N(K)	4.42	6.04	0.22	0.26	3.903
O(K)	47.35	56.65	0.37	0.49	2.008
Si(K)	29.39	20.03	0.21	0.92	1.000
Fe(K)	10.73	3.67	0.13	0.99	1.359

Şekil 4. 8. MMIP için mikroküre yüzeyi üzerinde seçilen bölgedeki EDX analizi.

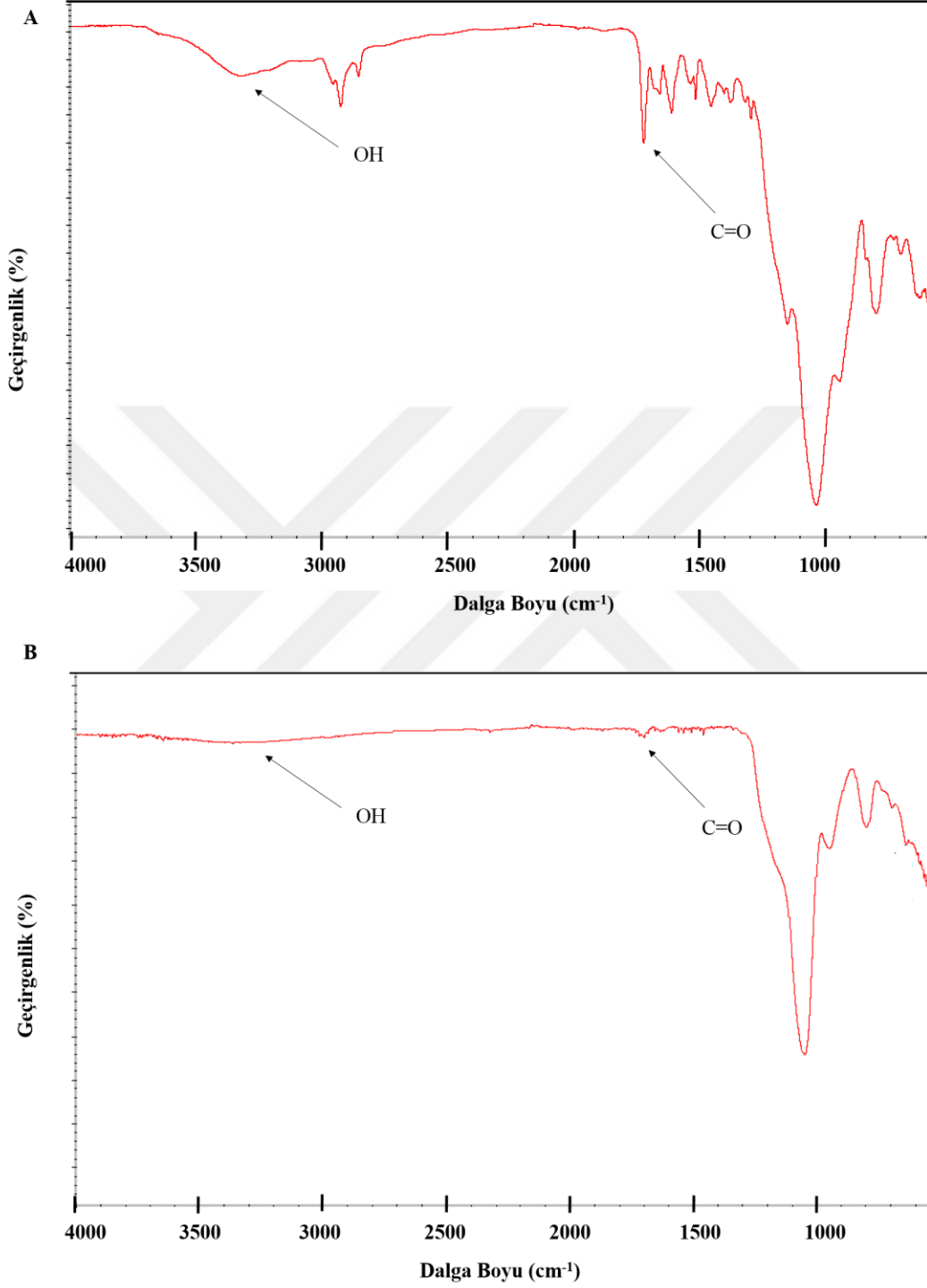
EDX analizine göre molekül baskılanmış manyetik silika mikrokürelerin dış yüzeyinde % 7.04 oranında bor, % 6.04 oranında azot bulunmuştur. Bu sonuç manyetik silika mikrokürler için polimerik katmanın varlığını kanıtlamaktadır. Bu mikroküreler için silisyum'a ek olarak kürelerin manyetik özellikte olması nedeniyle demir elementi de % 3.67 oranında tespit edilmiştir.

4.1.4. Mikrokürelerin FTIR-ATR Analizi

Normal ve manyetik formdaki silika mikroküreler üzerinde oluşturulan molekül baskılama yapılmış polimerik katmanın kimyasal karakterizasyonu, FTIR-ATR ile yapılmıştır. Bu amaçla normal ve manyetik formdaki, β -NAD baskılanmış mikroküreler ve β -NAD baskılanmış ve uzaklaştırılmış mikrokürelerin FTIR-ATR spektrumları alınmıştır. Kimyasal karakterizasyon için önemli iki fonksiyonel grubun (-OH ve -C=O) belirlenmesi amacıyla normal ve manyetik formdaki silika mikroküreler için elde edilen spektrumlar, sırasıyla Şekil 4. 9 ve Şekil 4. 10'da verilmektedir.



Şekil 4. 9. (A) β -NAD baskılanmış normal silika, (B) β -NAD baskılanıp uzaklaştırılmış silika mikrokürelerin FTIR-ATR spektrumları.



Şekil 4.10. (A) β -NAD baskılanmış manyetik silika, (B) β -NAD baskılanıp uzaklaştırılmış manyetik silika mikrokürelerin FTIR-ATR spektrumları.

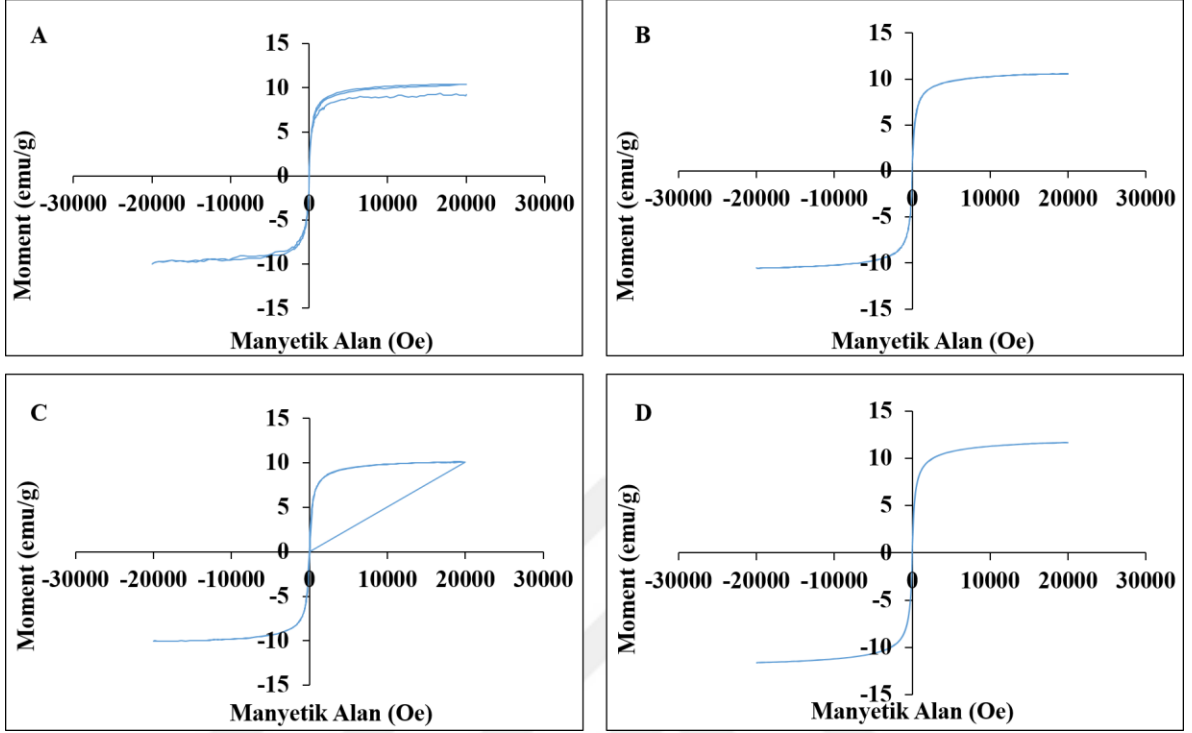
Şekil 4. 9’da, β -NAD baskılanmış normal silika ve β -NAD baskılanıp uzaklaştırılmış normal silika mikrokürelerde, hidroksil piki 3400 cm^{-1} değerinde gözlenmektedir. β -NAD

baskılanmış normal silika mikroküreler için bu pikin kaynağı, β -NAD ve VPBA'da varolan hidroksil gruplarıdır. β -NAD baskılanıp uzaklaştırılmış silika mikrokürelerde ise pikin kaynağı ağırlıklı olarak VPBA birimleridir. Ayrıca DMAPM'de bulunan dimetil amino grubunun bu pike katkı sağladığı söylenebilir. β -NAD baskılanmış normal silika ve β -NAD baskılanıp uzaklaştırılmış normal silika mikrokürelerde VPBA, DMAPM ve EGDMA'nın yapısında bulunan karbonil gruplarından ötürü 1700 cm^{-1} civarında karbonil bandı gözlenmiştir.

İkinci basamakta β -NAD baskılanmış manyetik silika, β -NAD baskılanmış ve uzaklaştırılmış manyetik silika mikroküreler ile alınan spektrumlar ile değerlendirilmiştir (Şekil 4.10). Normal silika mikroküreleri için alınan FTIR-ATR spektrumlarına benzer şekilde önemli iki fonksiyonel grubun (-OH ve -C=O) belirlenmesi amacıyla bu spektrumlar değerlendirilmiştir. Şekil 4.10'da, normal silika mikrokürelere benzer şekilde -OH ve -C=O gruplarına ait karakteristik bantlar, β -NAD baskılanmış manyetik silika, β -NAD baskılanıp uzaklaştırılmış manyetik silika mikroküreler için sırasıyla 3400 ve 1700 cm^{-1} dalga boylarında gözlenmiştir.

4.1.5. Mikrokürelerin VSM Analizi

Manyetik özelliğe sahip silika mikrokürelerin titreşimli örnek manyetometresi ile oda sıcaklığında elde edilen manyetizasyon eğrileri Şekil 4. 11' de verilmiştir.

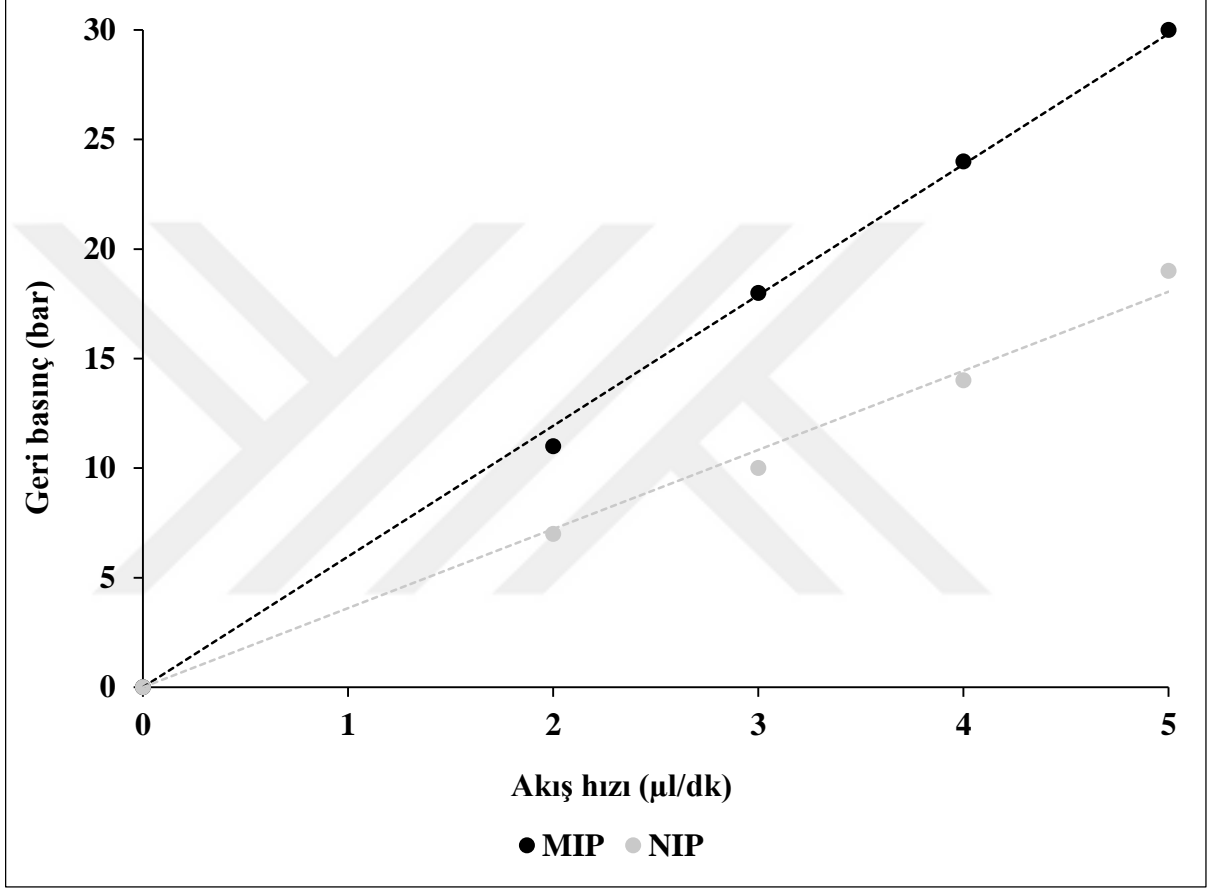


Şekil 4. 11. A) Silika kaplı manyetik silika mikroküreler ($\text{SiO}_2@\text{MagSiO}_2$), B) TMSPM bağlı- silika kaplı manyetik silika mikroküreler ($\text{TMSPM}@\text{SiO}_2@\text{MagSiO}_2$), C) MMIP, D) MNIP için ait titreşimli örnek manyetometresi ile elde edilen manyetizasyon doygunluk eğrileri.

Manyetizasyon eğrilerinde görüldüğü gibi, $\text{SiO}_2@\text{MagSiO}_2$, $\text{TMSPM}@\text{SiO}_2@\text{MagSiO}_2$, MMIP ve MNIP için doygunluk manyetizasyon değeri yaklaşık 10 emu g^{-1} 'dir. Bu sonuç modifikasyon işlemlerinden sonra mikrokürelerin manyetik özelliklerinde bariz bir değişim olmadığını, tüm mikrokürelerin dış manyetik alanla su bazlı süspansiyondan hızlı bir şekilde ayırma ($<30 \text{ s}$) imkân verebilen güçlü bir manyetik özelliğe sahip olduğunu göstermektedir.

4.1.6. Kolon Geri Basınç Testi

MIP ve NIP dolgulanmış 50 mm uzunluk ve 300 μm iç çap değerine sahip mikrokolonlarda geri-basıncın hareketli faz akış hızı ile değişimi Şekil 4. 12' de gösterilmektedir. Deneylerde hareketli faz olarak β -NAD desorpsiyon ortamı kullanılmıştır.



Şekil 4. 12. MIP ve NIP ile dolgulanmış mikrokolon için geri-basıncın hareketli faz akış hızı ile değişimi. Kolon: 50 mm x300 μm i.ç., Hareketli faz: Desorpsiyon ortamı.

NIP ve MIP ile dolgulanmış mikrokolonlarda artan akış hızı ile geri basınç değerinin doğrusal şekilde arttığı gözlemlenmektedir. Sabit akış hızı değerinde MIP ile doldurulmuş kolonda geri-basınç değeri daha yüksektir. Bu durum molekül baskılanmanın oluşturduğu bir direnç etkisi olarak yorumlanabilir.

4.2. MIP ve NIP için β -NAD Adsorpsiyon Deneyleri

Tez kapsamında, kesikli sistemde β -NAD adsorpsiyon çalışmaları için normal ve manyetik özelliğe sahip ve molekül baskılanmış monodispers silika mikroküreler sorbent olarak

kullanılmıştır. Normal ve manyetik formdaki sorbentlerin molekül baskılanmış ve baskılanmamış formları için denge β -NAD adsorpsiyon değerleri belirlenerek IF (Baskılama Faktörü- Imprinting Factor) değerleri hesaplanmıştır (Bkz. Eş. 3.4). Normal formdaki molekül baskılanmış monodispers silika mikroküreler ayrıca kolona doldurularak sürekli sistemde adsorpsiyon çalışmaları yapılmıştır.

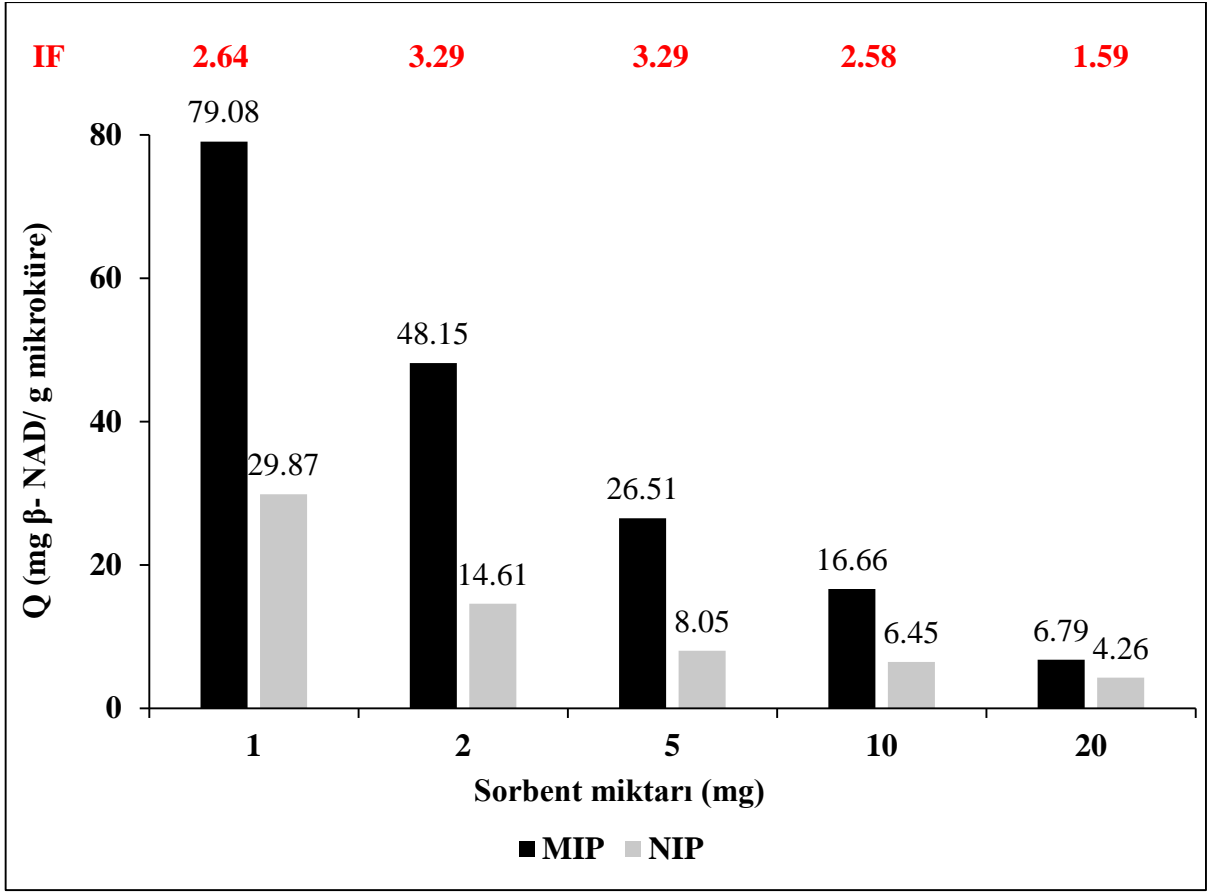
4.2.1. Kesikli Sistem Çalışmaları

Kesikli sistem deneylerinde, MIP ve NIP kullanılarak borat afinite yöntemi ile, diol grubu içeren β -NAD adsorpsiyonu gerçekleştirilmiştir. Borat afinite kromatografisinde, borik asit ve molekülün diol grupları arasında kovalent bağ oluşumu dikkate alınarak deneyler, pH 8.5 HEPES tampon çözeltisi ortamında yapılmıştır. Adsorpsiyon hacmi 1 mL değerinde tutulup, deneyler oda sıcaklığında (21°C) gerçekleştirilmiştir.

İlk olarak sorbent miktarının, sonra da β -NAD derişiminin MIP ve NIP adsorpsiyon performansına etkisi karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Molekül baskılamada en önemli noktalardan biri olan tekrar kullanılabilirlik deneyleri yapılmıştır. MIP seçiciliği, kimyasal yapı olarak β -NAD molekülüne benzeyen farklı biyomoleküllerin adsorpsiyonu denenerak belirlenmiştir.

4.2.1.1. Sorbent Derişiminin Etkisi

Bu kısımda sorbent olarak kullanılan MIP ve NIP miktarının, β -NAD izolasyonu üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bu deneyler 2 mg/mL derişiminde hazırlanan β -NAD çözeltisi 1, 2, 5, 10 ve 20 mg sorbent bulunan 1 mL adsorpsiyon ortamına eklenerek yapılmıştır. Denge adsorpsiyon süresi ön deneyler ile 2 saat olarak belirlenmiştir. Sorbent miktarının denge adsorpsiyon değeri ve molekül baskılama faktörüne etkisi Şekil 4.13' de verilmektedir.

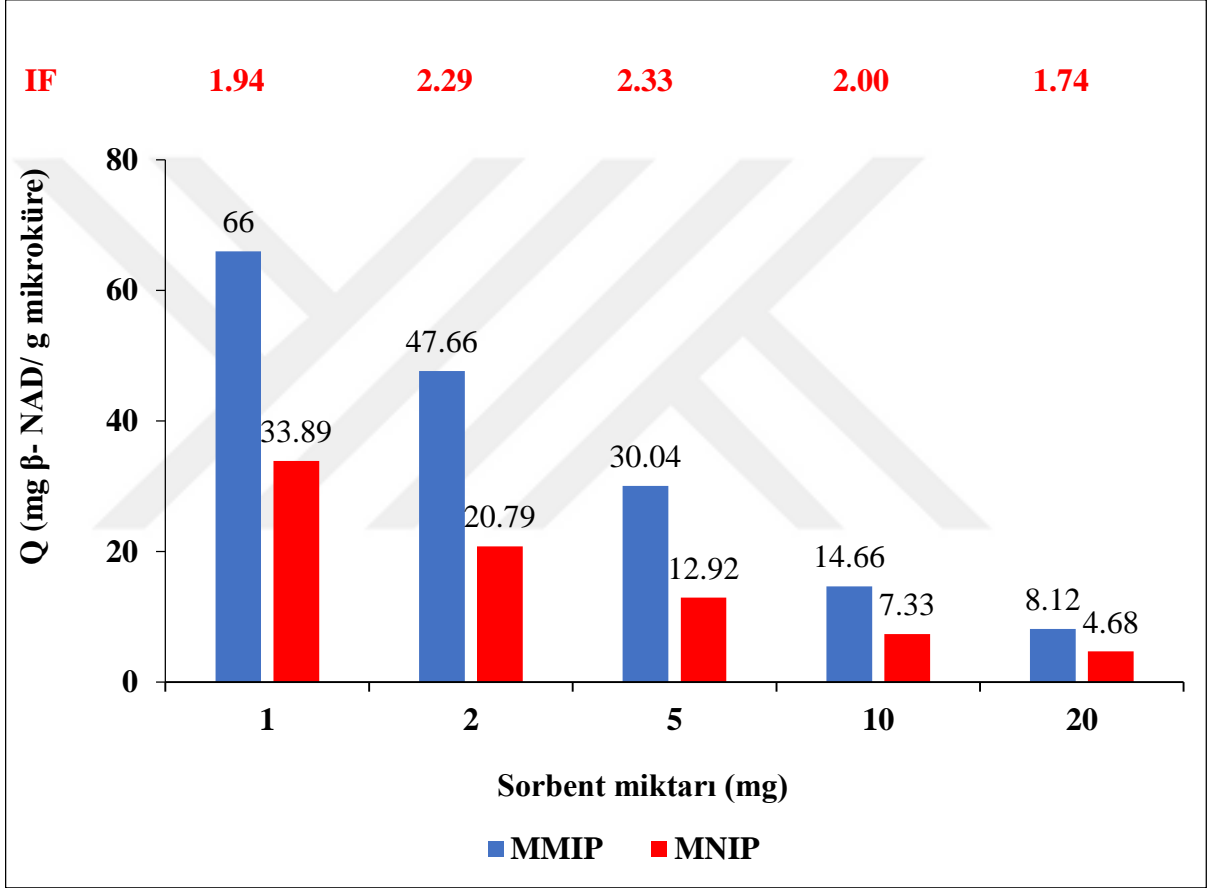


Şekil 4.13. Normal formdaki MIP ve NIP için sorbent miktarının β -NAD denge adsorpsiyonu ve molekül baskılama faktörü (IF) üzerindeki etkisi. IF değerleri grafik üzerinde kırmızı font ile gösterilmiştir.

Şekil 4. 13' ten görüldüğü gibi, en yüksek denge adsorpsiyonu MIP ile 1 mg sorbent içeren adsorpsiyon ortamında (79.08 mg β -NAD /g sorbent), elde edilmiştir. Bununla birlikte sorbent miktarı arttıkça birim sorbente düşen β -NAD miktarının azalmasından dolayı mikrokürelerin denge β -NAD adsorpsiyonu da düşmektedir. Sorbent miktarı 5 mg olduğunda, tatminkâr bir denge adsorpsiyonu, yüksek molekül baskılama faktörü ile (3.29) elde edilmiştir. Bu nedenle ilerleyen deneyler 5 mg sorbent miktarı ile yapılmıştır.

β -NAD için denge adsorpsiyon davranışının sorbent miktarı ile değişimi 1 mL adsorpsiyon hacminde, 1-20 mg arasında değişen MMIP ve MNIP miktarları kullanılarak çalışılmıştır. Şekil 4.14'de manyetik formda baskılanmış ve baskılanmamış sorbentlerle yapılan

deneylerin sonuçları verilmektedir. Şekil 4. 14' de en yüksek denge adsorpsiyonu yine 1 mg MMIP ile elde edilmiştir (66 mg β -NAD /g sorbent). MMIP ve MNIP arasındaki denge adsorpsiyon farkı, molekül baskılanmış boşlukların MMIP yüzeyinde de oluştuğunun kanıtıdır.

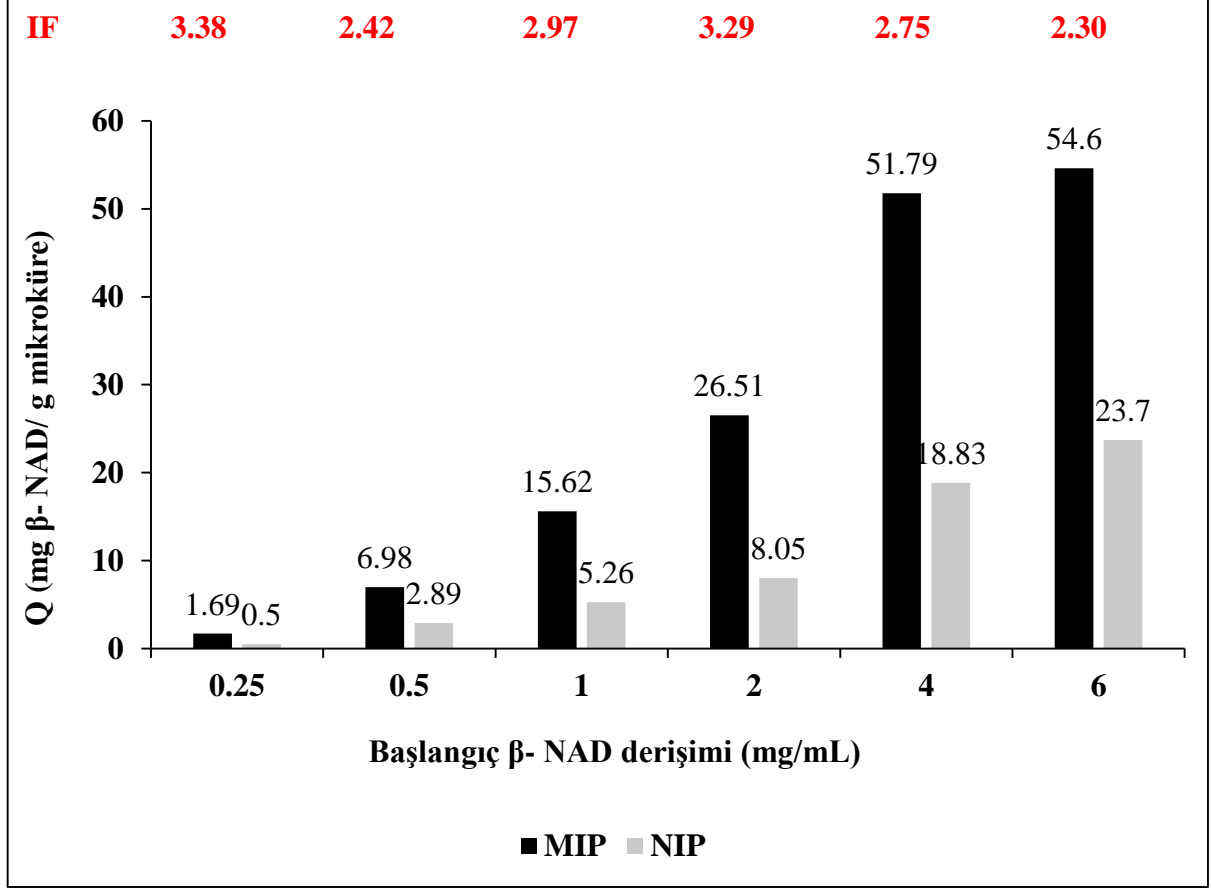


Şekil 4. 14. MMIP ve MNIP için sorbent miktarının β -NAD denge adsorpsiyonu ve molekül baskılama faktörü (IF) üzerindeki etkisi. IF değerleri grafik üzerinde kırmızı font ile gösterilmiştir.

4.2.1.2. β -NAD Başlangıç Derişiminin Denge Adsorpsiyonu Üzerindeki Etkisi

Sorbent olarak kullanılan MIP ve NIP mikrokürelerin miktarı 5 mg olarak belirlendikten sonra, sabit sorbent miktarı ile başlangıç β -NAD derişimi 0.25-6.0 mg/ mL aralığında değiştirilerek bu derişimin β -NAD denge adsorpsiyonuna etkisi incelenmiştir.

Şekil 4.15’ de, başlangıç β -NAD derişiminin molekül baskılanmış ve baskılanmamış silika mikrokürelerin β -NAD denge adsorpsiyonuna etkisi gösterilmektedir.

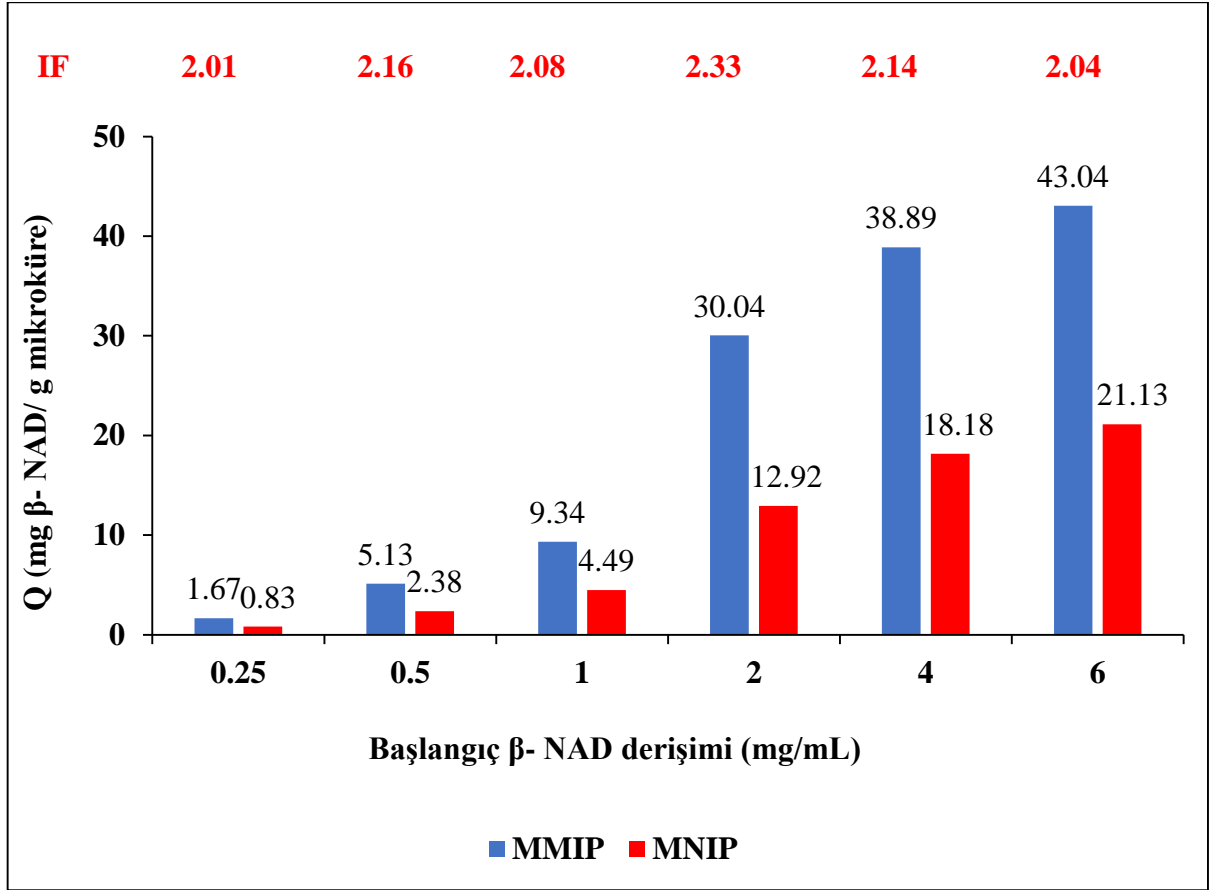


Şekil 4. 15. Başlangıç β -NAD derişiminin molekül olarak baskılanmış ve baskılanmamış silika mikrokürelerin β -NAD denge adsorpsiyonu ve molekül baskılama faktörü (IF) üzerindeki etkisi. IF değerleri grafik üzerinde kırmızı font ile gösterilmiştir.

MIP ve NIP için elde edilen izotermelerden görüldüğü üzere başlangıç β -NAD derişimi 4 mg/mL’de plato denge adsorpsiyon değerine ulaşılmıştır. MIP ve NIP için en yüksek adsorpsiyon kapasitesi 4 mg/mL β -NAD başlangıç derişiminde, sırasıyla 51.79 mg/g ve 18.83 mg/g şeklinde elde edilmiştir. Bağlı olarak yüksek IF değeri (3.29) ve yüksek β -NAD denge adsorpsiyon değerine ise 2 mg/mL, β -NAD başlangıç derişiminde ulaşılmıştır. Bu

sonuç silika mikroküreler üzerinde molekül baskılama işleminin, β -NAD 'a karşı yüksek bağlanma afinitesi gösteren spesifik tanıma alanları oluşturması ile açıklanabilir.

Başlangıç β -NAD derişiminin denge adsorpsiyonuna etkisi sabit miktarda (5 mg) MMIP ve MNIP sorbentleri kullanılarak ve β -NAD başlangıç derişimi 0.25-6.0 mg β -NAD/ mL aralığında değiştirilerek incelenmiştir. Şekil 4.16' da manyetik özelliğe sahip molekül baskılanmış ve baskılanmamış sorbentlerle yapılan adsorpsiyon deneyleri sonuçları verilmektedir.



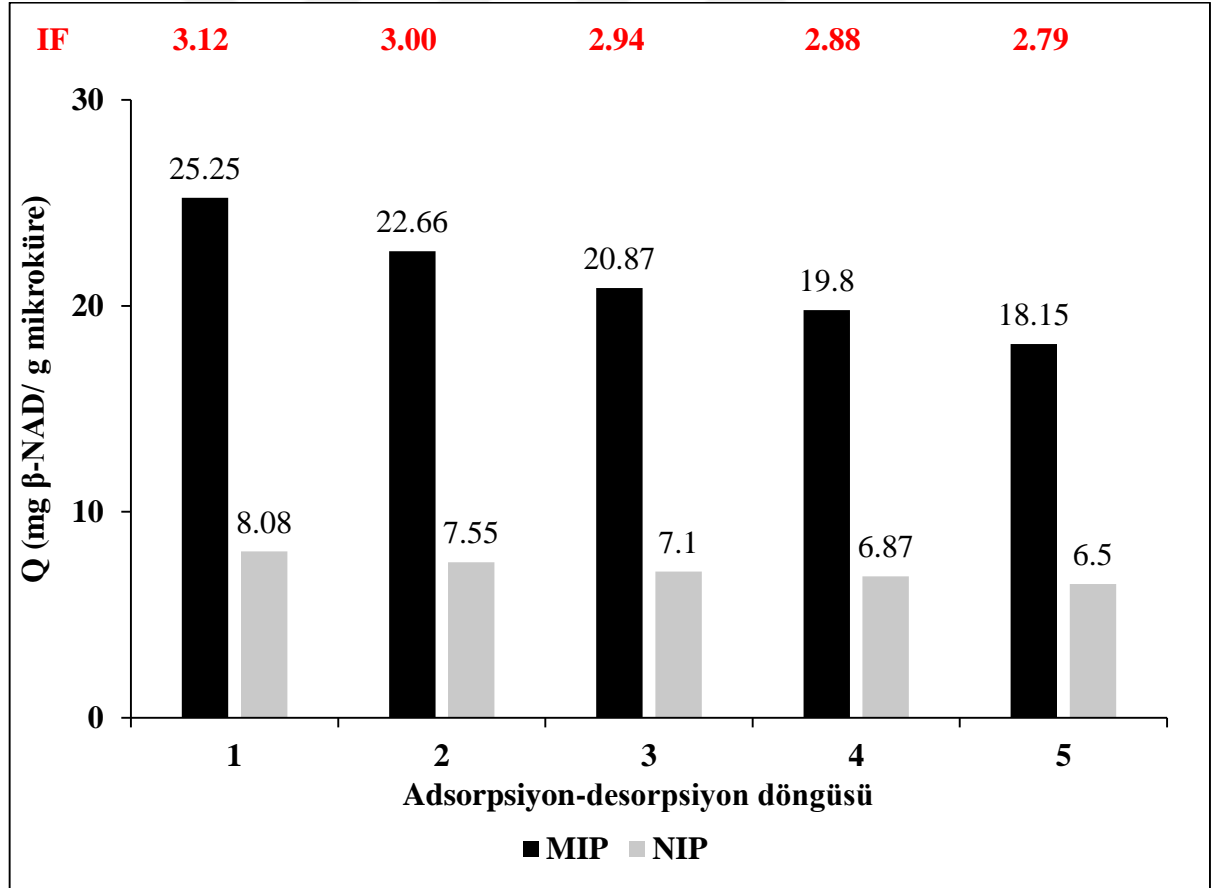
Şekil 4. 16. MMIP ve MNIP için β -NAD başlangıç derişiminin β -NAD denge adsorpsiyonuna etkisi. IF değerleri grafik üzerinde gösterilmiştir.

Şekil 4.16' da görüldüğü gibi MMIP için denge adsorpsiyon değeri artan β -NAD başlangıç derişimi ile 2 mg/mL değerine kadar doğrusal şekilde artmakta ve β -NAD başlangıç derişiminin 2.0 mg/mL değerini geçmesiyle birlikte denge adsorpsiyon değeri platoya

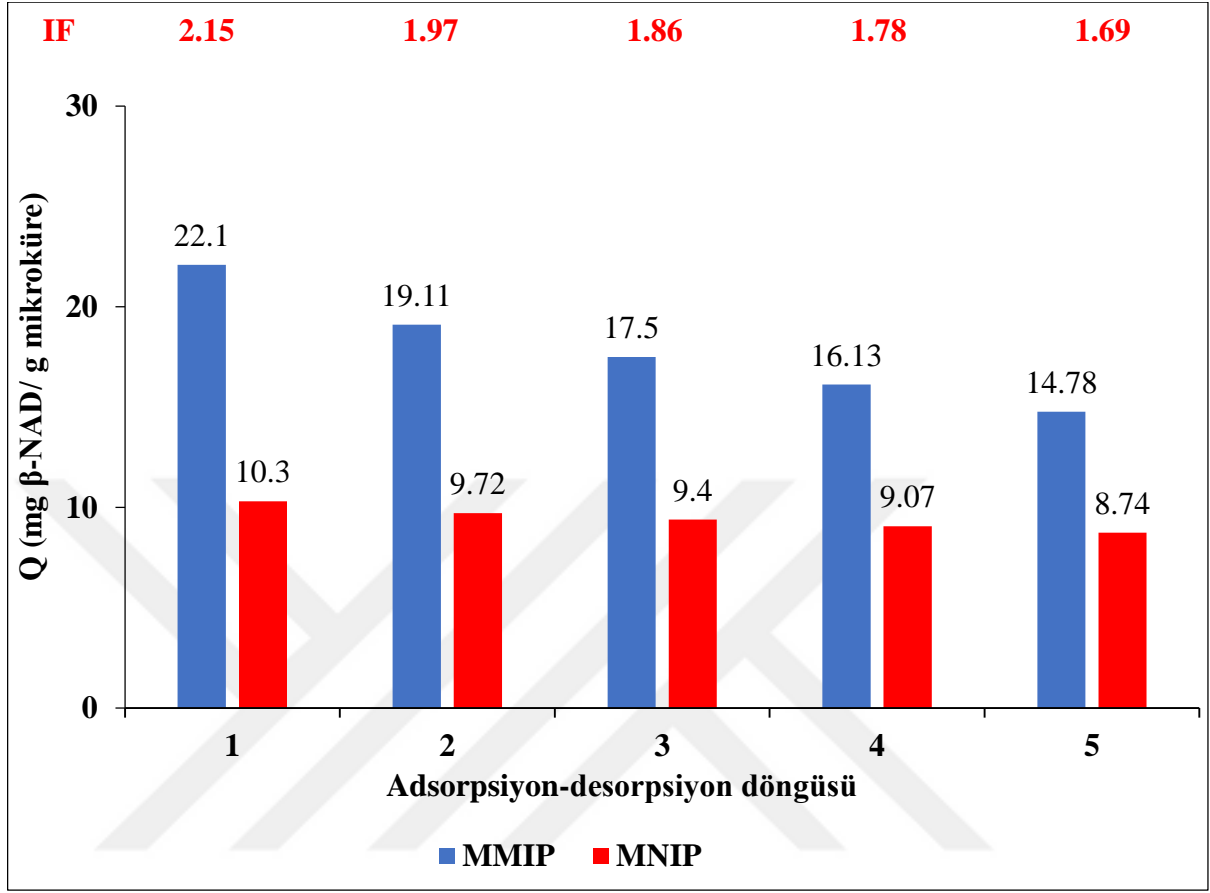
ulaşmaktadır. Sonuçlar hazırlanan MMIP'in seçicilik özelliğinin yüksek olduğunu göstermektedir.

4.2.1.3. Tekrar Kullanılabilirlik Testleri

Yeniden kullanılabilirlik, sentezlenen molekül baskılanmış mikrokürelerin (MIP ve MMIP) pratik uygulaması için en önemli faktörlerden biridir. Adsorpsiyon HEPES (pH 8.5) tampon çözeltisi, desorpsiyon ise %10 SDS/asetik asit çözeltisi ortamında 5 kez tekrarlanmıştır. Deneyleerde 5 mg sorbent ve 2 mg/ mL β -NAD çözeltisi kullanılmıştır. Adsorpsiyon süresi 1 saat, desorpsiyon süresi 30 dk olarak ayarlanmıştır. Sürekli adsorpsiyon-desorpsiyon döngüleri için tekrar tekrar kullanılan MIP'ların ve MMIP'lerin yeniden kullanılabilirliği sırasıyla Şekil 4. 17 ve Şekil 4. 18' de verilmektedir.



Şekil 4.17. MIP ve NIP için tekrar kullanılabilirlik sonuçları. IF değerleri grafik üzerinde gösterilmiştir.



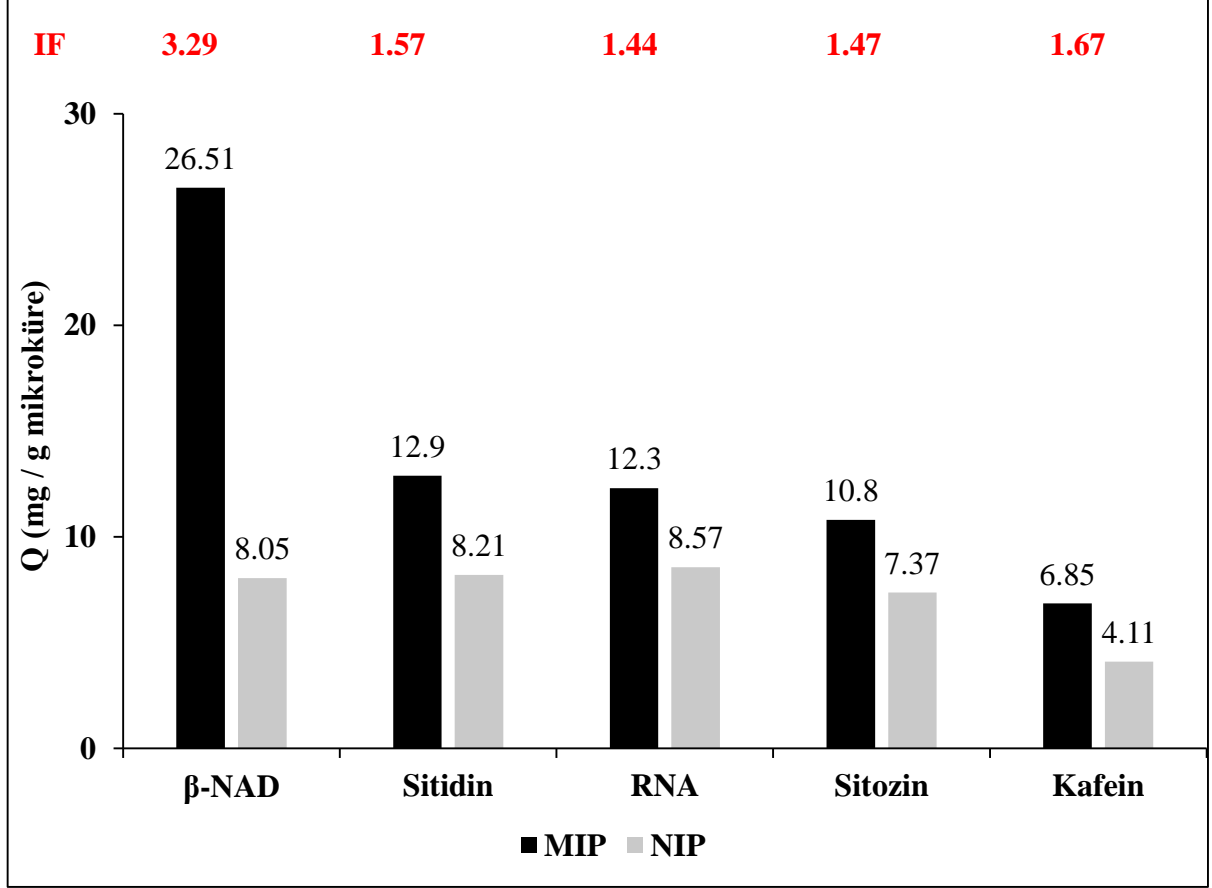
Şekil 4. 18. MMIP ve MNIP için tekrar kullanılabilirlik sonuçları. IF değerleri grafik üzerinde gösterilmiştir.

MIP için beş döngüden sonra, denge adsorpsiyon değeri 25.25 mg/g'dan 18.15 mg/g'a; MMIP için beş döngüden sonra, ise 22.1 mg/g'dan 14.78 mg/g'a azalma olduğu görülmektedir. Bu düşüş, mikrokürelerin bağlanma noktalarının ardışık kullanımda azalması ile açıklanabilir. NIP ve MNIP üzerinde β -NAD için spesifik bağlanma bölgeleri olmadığından, denge adsorpsiyonu beş döngü boyunca sabit kalmaktadır. Deneysel sonuçlar sentezlenen molekül baskılanmış mikrokürelerin birden fazla kullanılabilir olduğunu göstermiştir.

4.2.1.4. Seçicilik

MIP ve MMIP için seçiciliği incelemek için ilgili sorbentler β -NAD ile benzer yapıda olan başka moleküller ile etkileştirilmiştir. Bu amaçla sitidin, sitozin, kafein ve RNA, MIP ve MMIP için karşılaştırma analitleri olarak seçilmiştir. Her bir molekülü 2 mg/mL

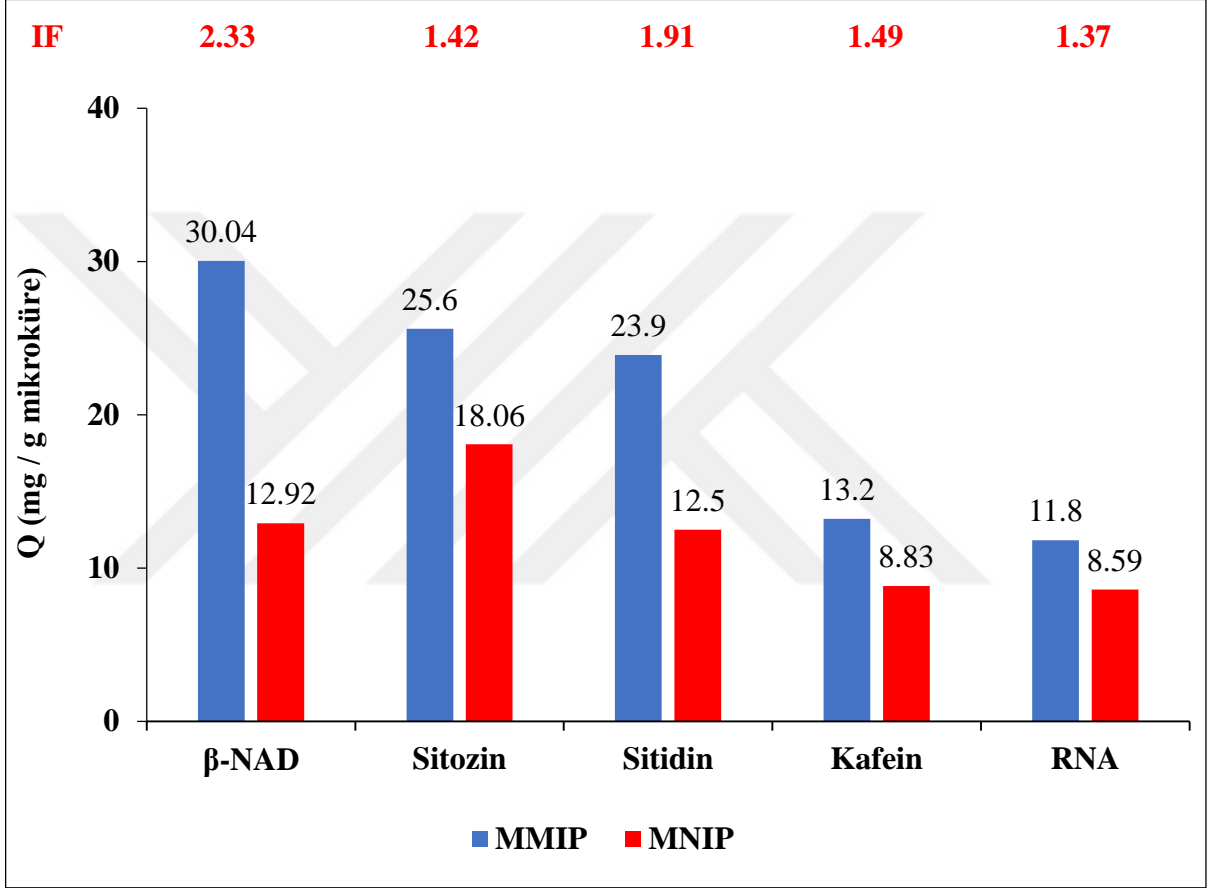
başlangıç derişimi ile içeren pH 8.5 değerine sahip adsorpsiyon ortamı, 5 mg sorbent ile etkileştirilerek adsorpsiyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. MIP ve NIP için elde edilen sonuçlar Şekil 4. 19' de gösterilmektedir.



Şekil 4. 19. MIP ve NIP sorbentlerinin β -NAD dahil farklı hedef moleküllere karşı gösterdiği seçicilik davranışı. IF değerleri grafik üzerinde gösterilmiştir.

Görüldüğü gibi molekül yapıları çok benzer formda kıyaslama analitleri kullanıldığı durumda, en yüksek denge adsorpsiyonu ve en yüksek baskılama faktörü β -NAD baskılanmış silika mikroküreler ile elde edilmiştir. Bu durum seçilen yüzey baskılama yöntemiyle, β -NAD'nın silika mikrokürelerin yüzeyine başarılı bir şekilde baskılandığını göstermektedir.

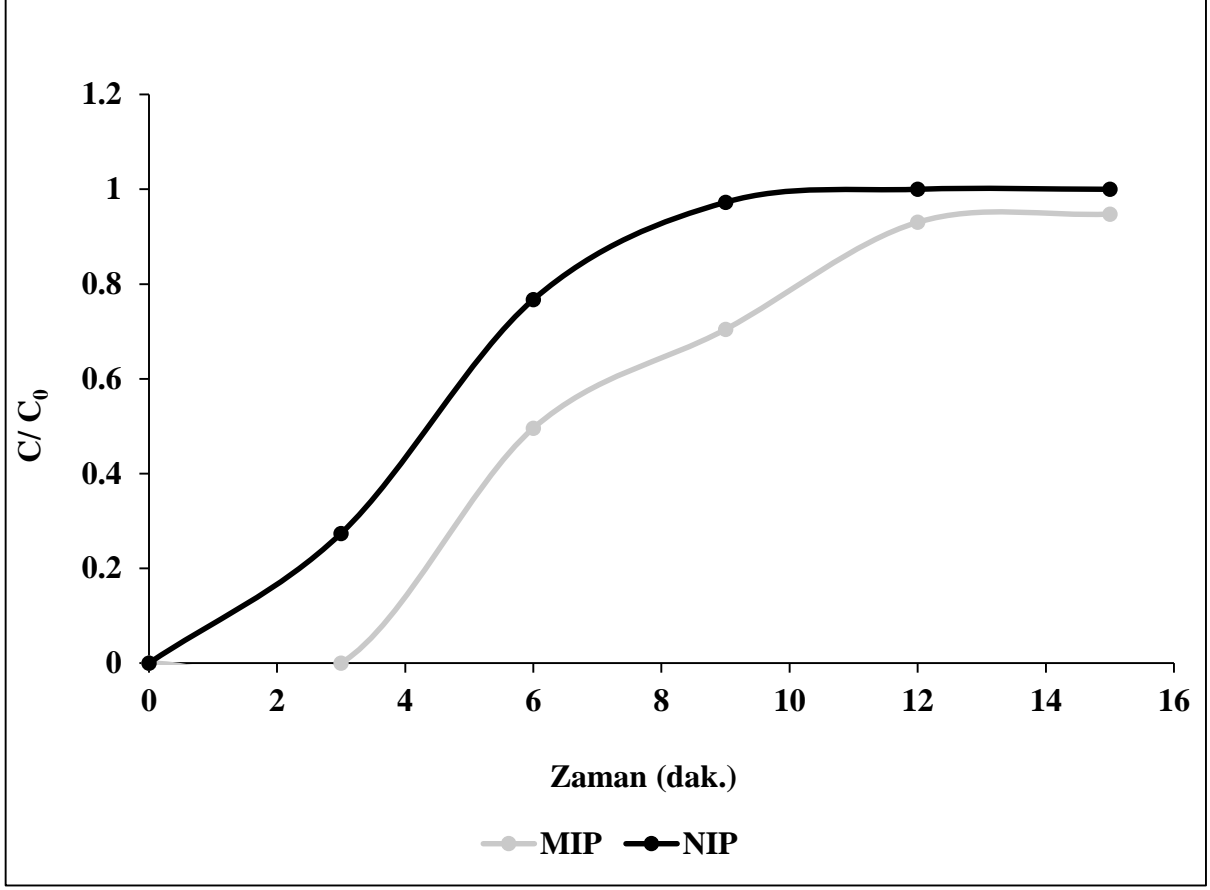
Sitidin, RNA, sitozin ve kafein kullanılarak MMIP ve MNIP ile yapılan adsorpsiyon deneylerinin sonucu Şekil 4. 20’ de verilmektedir. Elde edilen sonuçlar, MMIP’ın MIP gibi β -NAD’a karşı yüksek seçicilik gösterdiğini ortaya koymuştur.



Şekil 4. 20. MMIP ve MNIP sorbentlerinin β -NAD dahil farklı hedef moleküllere karşı gösterdiği seçicilik davranışı. IF değerleri grafik üzerinde gösterilmiştir.

4.2.2. Mikroakışkan Sistemde β -NAD Adsorpsiyon Deneyleri

Sürekli sistem çalışmalarında adsorpsiyon deneyleri için MIP ve NIP 300 μ m iç çap ve 150 mm uzunluğunda silika kapiler kolon içerisine dolgulanmıştır. MIP kullanılarak oluşturulan mikro-borat afinite kromatografi sisteminde, β -NAD mikrokolon çıkış derişiminin zamanla değişimi, NIP içeren referans kolon da kullanılarak Şekil 4. 21’ de verilmiştir.



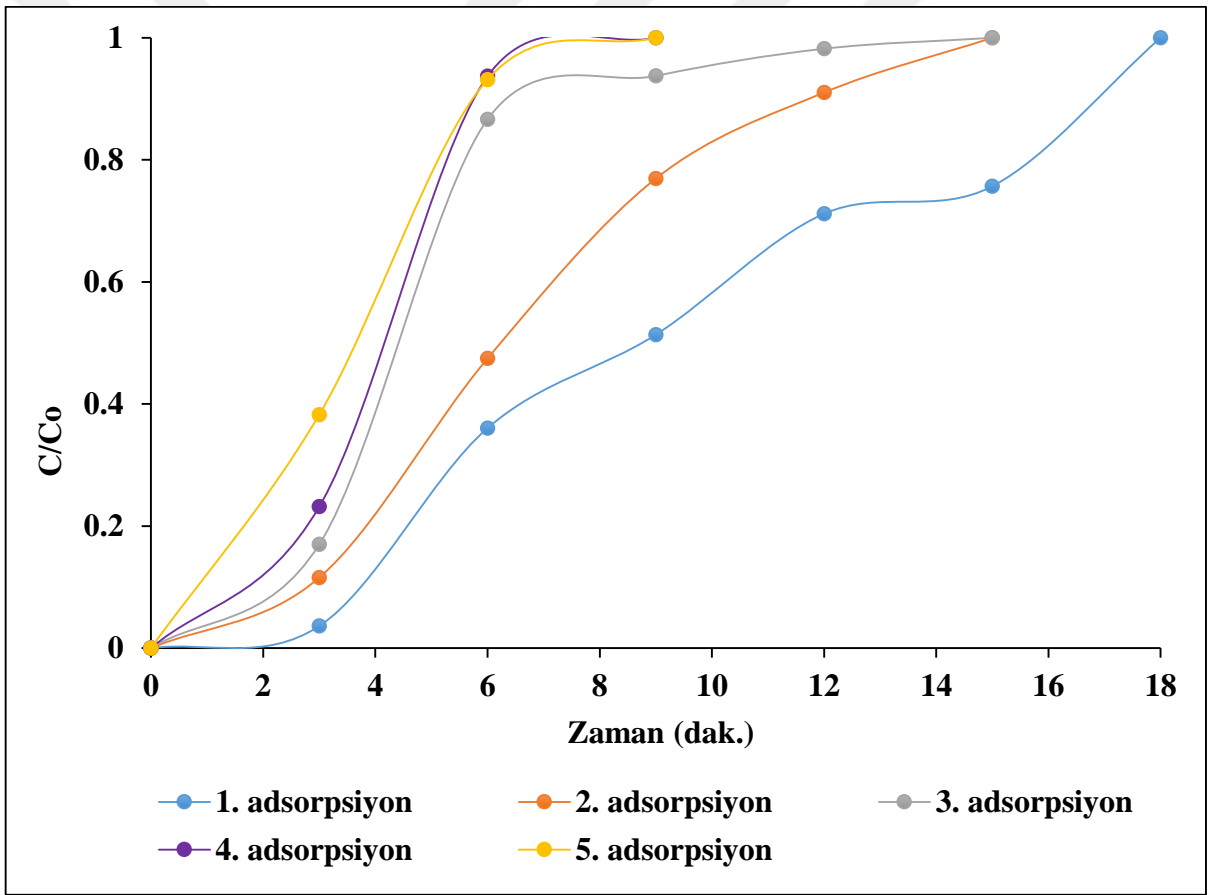
Şekil 4. 21. MIP kullanılarak oluşturulan mikro-borat afinite kromatografi sisteminde β -NAD mikrokolon çıkış derişiminin zamanla değişimi. Adsorpsiyon koşulları: Besleme akış hızı: 2 μ L/dak, Mobil faz: pH 8.5, 25 mM HEPES tamponu, Oda sıcaklığı.

Şekil 4. 21' e bakıldığında NIP içeren mikro-kolon beklendiği gibi MIP içeren mikro-kolondan daha hızlı bir şekilde doygunluğa ulaşmıştır. Bu durum sorbent üzerinde baskılama ile oluşturulan ve hedef molekül olan β -NAD'ı tanıma yeteneğine sahip bağlanma bölgelerinin sürekli formda çalışan borat afinite kromatografisi sisteminde çalıştığını göstermektedir.

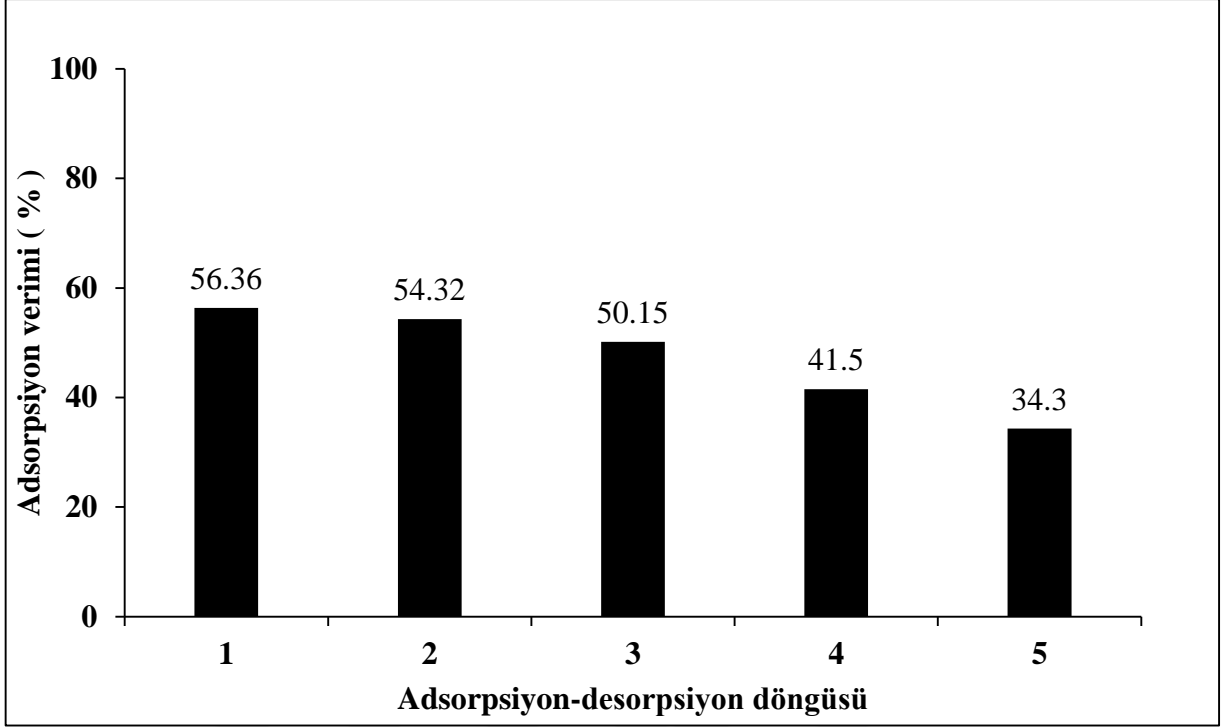
4.2.2.1. Kolonda Tekrar Kullanılabilirlik

Sürekli sistemde MIP içeren kolonda yapılan tekrar kullanılabilirlik testlerinde adsorpsiyon ortamı olarak pH 8.5 değerindeki 25 mM HEPES çözeltisi, desorpsiyon ortamı olarak ise

SDS/asetik asit çözeltisi kullanılmış ve adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü 5 kez tekrarlanmıştır. Deneylede 150 mm uzunluk ve 300 µm iç çap değerine sahip ve MIP ile dolgulanmış kapiler kolondan 0.05 mg/mL derişimine sahip β-NAD çözeltisi 2 µL/dak akış hızıyla geçirilmiştir. Şekil 4. 22' de MIP kullanıldığı durumda mikro-borat afinite kromatografi sisteminde β-NAD çıkış derişiminin zamanla değişimi verilmektedir. Şekil 4.23' de ise tekrar kullanılabilirlik testleri sonrasında elde edilen adsorpsiyon verimleri gösterilmektedir.



Şekil 4. 22. MIP için mikro-borat afinite kromatografi sisteminde mikrokolon çıkışında β-NAD derişiminin zamanla değişimi. Adsorpsiyon koşulları: β-NAD derişimi: 0.05 mg/ mL, Mobil faz akış hızı: 2 µL/dak, Mobil faz: pH 8.5, 25 mM HEPES tamponu, Oda sıcaklığı.



Şekil 4. 23. MIP için mikro-borat afinite kromatografi sisteminde adsorpsiyon veriminin deney sayısı ile değişimi (%). Adsorpsiyon koşulları: β -NAD derişimi: 0.05 mg/mL, Besleme akış hızı: 2 μ L/ dak, Mobil faz: pH 8.5 25 mM HEPES tamponu, Oda sıcaklığı.

MIP için üç kullanımda, mikro-kolon adsorpsiyon veriminin yaklaşık sabit kaldığı, beşinci kullanıma doğru hafif bir azalma gösterdiği görülmektedir. Bu azalma mikrokürelerin her adsorpsiyon-desorpsiyon işleminde özellikle SDS/asetik asit içeren çözelti ile etkileşimi sonucunda moleküler bağlanma noktalarının azalması ile açıklanabilir. Elde edilen tekrarlanabilirlik davranışı mikro-kolonun ilk üç kullanımda tatminkâr bir adsorsiyon verimi ile çalıştığını ortaya koymaktadır.

5. SONUÇLAR

Tez kapsamında bütün canlı hücrelerde bulunan β -NAD molekülünün, molekül baskılaması yapılmıştır.

- Poli(MAA-co-EGDMA) mikroküreler destek materyali olarak kullanılmış ve monodispers-gözenekli formda silika mikrokürelerin sentezi gerçekleştirilmiştir.
- Silika mikroküreler önce HCl ile etkileştirilerek yüzeylerinde hidroksil gruplarının oluşumu sağlanmış, ardından da TMSPM ile etkileştirilerek, yüzeylerinde kovalent bağlı, polimerleşebilir metakrilat grupları oluşturulmuştur.
- Molekül baskılama, HEPES tampon çözeltisi ortamında hedef molekül β -NAD, fonksiyonel monomerler, VPBA ve DMAPMA ve çapraz bağlayıcı EGDMA varlığında gözenek yapıcı olarak etil alkol kullanılarak yapılmıştır. Bu amaçla TMSPM bağlı silika mikroküreler üzerinde β -NAD baskılanmış polimerik katman oluşturulmuştur.
- Sentez işleminin ardından molekül olarak baskılanmış mikroküreler, desorpsiyon çözeltisi ile yıkanmış ve yapıdan β -NAD uzaklaştırılmıştır. Böylelikle MIP sorbenti elde edilmiştir.
- Sentezlenen manyetik poli(MAA-co-EGDMA) mikroküreler kullanılarak, manyetik silika sentezi gerçekleştirilmiştir. Manyetik monodispers silika mikrokürelerin yüzeyi, tekrar silika tabakasıyla kaplanmıştır ($\text{SiO}_2@Mag\text{-SiO}_2$). Molekül baskılama yöntemi aynı şekilde $\text{SiO}_2@Mag\text{-SiO}_2$ mikroküreler için de uygulanarak β -NAD baskılanmış, manyetik özelliğe sahip silika mikroküreler elde edilmiştir (MMIP).
- Kontrol grubu olarak, molekül baskılanmamış mikroküreler (NIP ve MNIP), β -NAD molekülü kullanılmadan aynı yöntemler ile sentezlenmiştir.

- SEM görüntülerine bakıldığında MIP ve MMIP'in, eşboyutlu formda olduğu görülmüştür. Bu görüntüler yardımıyla mikroküre boyutu MIP ve MMIP için sırasıyla 5.71 μm ve 6.49 μm olarak hesaplanmıştır.
- BET analizinde silika mikrokürelerin özgül yüzey alanı 373 m^2/g değerindeyken, MIP için bu değer 116 m^2/g olarak bulunmuştur. Aynı şekilde $\text{SiO}_2@\text{Mag-SiO}_2$ mikrokürelerin özgül yüzey alanı 183 m^2/g değerindeyken, MMIP için bu değer 55.1 m^2/g olarak bulunmuştur. Sonuçlar silika mikrokürelerin yüzeyinin, hedeflendiği gibi polimer katmanı ile kaplandığını desteklemektedir.
- Yapılan TEM incelemeleriyle, MIP ve MMIP üzerinde nanometre mertebesinde kalınlığa sahip polimer katmanı görüntülenmiş ve heteroatomların varlığı EDX ile gösterilmiştir.
- MIP kullanılarak borat afinite kromatografisi yoluyla kesikli ve sürekli sistemde β -NAD için denge adsorpsiyon deneyleri yapılmıştır. Bu deneylerde, diol grubu içeren β -NAD molekülü ortamdan izole edilmiştir. MMIP sorbentleri sadece kesikli sistemde sorbent olarak kullanılmıştır.
- MIP için kesikli sistemde en yüksek β -NAD denge adsorpsiyonu 1 mg/mL sorbent derişimi ile 79.08 mg β -NAD/g sorbent olarak ölçülmüştür. Sorbent derişimi 5 mg/mL olduğunda, yüksek denge adsorpsiyonu, yüksek moleküler baskılama faktörü, 3.29 ile elde edilmiştir.
- MIP için kesikli sistemde en yüksek β -NAD denge adsorpsiyonu 1 mg/mL sorbent derişimi ile 66 mg β -NAD /g sorbent olarak elde edilmiştir. Manyetik sorbent derişimi 5 mg/mL olduğunda, yüksek moleküler baskılama faktörü, 2 mg β -NAD / mL ile elde edilmiştir.

- MIP ve MMIP kullanılarak kesikli sistemde yapılan seçicilik deneylerinde MIP ve MMIP için β -NAD'a karşı yüksek seçicilik gözlenmiştir.
- MIP ve MMIP sorbentlerinin tekrar kullanılabilirliği incelenmiştir. Aynı mikroküreler kullanılarak beş kez ardışık adsorpsiyon-desorpsiyon deneyi yapılmıştır. Birinci adsorpsiyon sonunda elde edilen denge adsorpsiyonu ile beşinci adsorpsiyon sonunda elde edilen denge adsorpsiyonu arasında önemli bir fark gözlenmemiştir. Bu bulgu MIP ve MMIP sorbentlerinin tekrarlı olarak kullanılabilirliğini göstermiştir.
- MIP mikro-borat afinite kromatografisi sisteminde sabit faz olarak uygun mobil faz geçirgenliği ve tatmin edici adsorpsiyon kapasitesi ile kullanılmıştır. Sürekli sistemde tekrarlı kullanımda, MIP içeren mikrokolonun üç kez ardışık olarak, β -NAD izolasyonunda kullanılabilirliği gösterilmiştir.

6. KAYNAKLAR

- [1] Peng M, Xiang H, Hu X, Shi S, Chen X, Boronate affinity-based surface molecularly imprinted polymers using glucose as fragment template for excellent recognition of glucosides, *Journal of Chromatography A*,1474, 8-13, **2016**.
- [2] Hu Y, Huang W, Tong Y, Xia Q, Tian M, Boronate-affinity hollow molecularly imprinted polymers for the selective extraction of nucleosides, *New Journal of Chemistry*,41, 7133-7141, **2017**.
- [3] Senel S, Camli S, Tuncel M, Tuncel A, Nucleotide adsorption–desorption behaviour of boronic acid functionalized uniform-porous particles, *Journal of Chromatography B*,769, 283-295, **2002**.
- [4] Elmas B, Onur M, Şenel S, Tuncel A, Thermosensitive N-isopropylacrylamide-vinylphenyl boronic acid copolymer latex particles for nucleotide isolation, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*,232, 253-259, **2004**.
- [5] Jiang H-P, Qi C-B, Chu J-M, Yuan B-F, Feng Y-Q, Profiling of cis-diol-containing nucleosides and ribosylated metabolites by boronate-affinity organic-silica hybrid monolithic capillary liquid chromatography/mass spectrometry, *Scientific reports*,5, 7785, **2015**.
- [6] Nigam VN, Cantero A: **Polysaccharides in cancer**. In *Advances in cancer research*. Volume 16: Elsevier; 1973: 1-96
- [7] Thijssen VL, Postel R, Brandwijk RJ, Dings RP, Nesmelova I, Satijn S, Verhofstad N, Nakabeppu Y, Baum LG, Bakkers J, Galectin-1 is essential in tumor angiogenesis and is a target for antiangiogenesis therapy, *Proceedings of the National Academy of Sciences*,103, 15975-15980, **2006**.
- [8] Hakomori S-i, Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingo (glyco) lipid metabolism, *Cancer research*,56, 5309-5318, **1996**.
- [9] Katopodis N, Hirshaut Y, Geller NL, Stock CC, Lipid-associated sialic acid test for the detection of human cancer, *Cancer Research*,42, 5270-5275, **1982**.
- [10] Pan Y, Guo X, Li S, Liu X, Zhang H, Boronate–decorated porous carbon material derived from zinc-based metal–organic framework for enrichment of cis–diol–containing nucleosides, *New Journal of Chemistry*,**2018**.
- [11] Li Q, Lü C, Li H, Liu Y, Wang H, Wang X, Liu Z, Preparation of organic-silica hybrid boronate affinity monolithic column for the specific capture and separation of cis-diol containing compounds, *Journal of Chromatography A*,1256, 114-120, **2012**.
- [12] Vasapollo G, Sole RD, Mergola L, Lazzoi MR, Scardino A, Scorrano S, Mele G, Molecularly imprinted polymers: present and future prospective, *International journal of molecular sciences*,12, 5908-5945, **2011**.
- [13] Mosbach K, Molecular imprinting, *Trends in biochemical sciences*,19, 9-14, **1994**.
- [14] Xing R, Wang S, Bie Z, He H, Liu Z, Preparation of molecularly imprinted polymers specific to glycoproteins, glycans and monosaccharides via boronate affinity controllable–oriented surface imprinting, *Nature protocols*,12, 964, **2017**.

- [15] Li S, Yang K, Deng N, Min Y, Liu L, Zhang L, Zhang Y, Thermoresponsive epitope surface-imprinted nanoparticles for specific capture and release of target protein from human plasma, *ACS applied materials & interfaces*,8, 5747-5751, **2016**.
- [16] Sun X-Y, Ma R-T, Chen J, Shi Y-P, Boronate-affinity based magnetic molecularly imprinted nanoparticles for the efficient extraction of the model glycoprotein horseradish peroxidase, *Microchimica Acta*,184, 3729-3737, **2017**.
- [17] Liu D, Yang Q, Jin S, Song Y, Gao J, Wang Y, Mi H, Core-shell molecularly imprinted polymer nanoparticles with assistant recognition polymer chains for effective recognition and enrichment of natural low-abundance protein, *Acta biomaterialia*,10, 769-775, **2014**.
- [18] Akhtar MH, Mir TA, Gurudatt N, Chung S, Shim Y-B, Sensitive NADH detection in a tumorigenic cell line using a nano-biosensor based on the organic complex formation, *Biosensors and Bioelectronics*,85, 488-495, **2016**.
- [19] Pollak N, Dölle C, Ziegler M, The power to reduce: pyridine nucleotides-small molecules with a multitude of functions, *Biochemical Journal*,402, 205-218, **2007**.
- [20] Andersson LI, Molecular imprinting: developments and applications in the analytical chemistry field, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*,745, 3-13, **2000**.
- [21] Emir Diltemiz S, Keçili R, Ersöz A, Say R, Molecular Imprinting Technology in Quartz Crystal Microbalance (QCM) Sensors, *Sensors*,17, 454, **2017**.
- [22] Samarth N, Kamble V, Mahanwar P, Rane A, Abitha V, A historical perspective and the development of molecular imprinting polymer-A review, *Chem Int*,1, 202-210, **2015**.
- [23] Cieplak M, Kutner W, Artificial Biosensors: How can molecular imprinting mimic biorecognition?, *Trends in biotechnology*,34, 922-941, **2016**.
- [24] Dickey FH, Specific adsorption, *The Journal of Physical Chemistry*,59, 695-707, **1955**.
- [25] Wulff G, Vesper W, Grobe-Einsler R, Sarhan A, Enzyme-analogue built polymers, 4. On the synthesis of polymers containing chiral cavities and their use for the resolution of racemates, *Die Makromolekulare Chemie: Macromolecular Chemistry and Physics*,178, 2799-2816, **1977**.
- [26] Takagishi T, Klotz IM, Macromolecule-small molecule interactions; introduction of additional binding sites in polyethyleneimine by disulfide cross-linkages, *Biopolymers*,11, 483-491, **1972**.
- [27] Vlatakis G, Andersson LI, Müller R, Mosbach K, Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting, *Nature*,361, 645, **1993**.
- [28] Chen L, Wang X, Lu W, Wu X, Li J, Molecular imprinting: perspectives and applications, *Chemical Society Reviews*,45, 2137-2211, **2016**.
- [29] Yan H, Row KH, Characteristic and synthetic approach of molecularly imprinted polymer, *International journal of molecular Sciences*,7, 155-178, **2006**.

- [30] Al-Kindy S, Badía R, Suárez-Rodríguez JL, Díaz-García ME, Molecularly imprinted polymers and optical sensing applications, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*,30, 291-309, **2000**.
- [31] Martín-Esteban A, Molecularly-imprinted polymers as a versatile, highly selective tool in sample preparation, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*,45, 169-181, **2013**.
- [32] Mustafa G, Lieberzeit PA: **MIP sensors on the way to real-world applications**. In *Designing Receptors for the Next Generation of Biosensors*. Springer; 2012: 167-187
- [33] Lv Y, Tan T, Svec F, Molecular imprinting of proteins in polymers attached to the surface of nanomaterials for selective recognition of biomacromolecules, *Biotechnology advances*,31, 1172-1186, **2013**.
- [34] Ertürk G, Mattiasson B, From imprinting to microcontact imprinting—A new tool to increase selectivity in analytical devices, *Journal of Chromatography B*,1021, 30-44, **2016**.
- [35] He H, Gan Q, Feng C, Synthesis and characterization of a surface imprinting silica gel polymer functionalized with phosphonic acid groups for selective adsorption of Fe (III) from aqueous solution, *Journal of Applied Polymer Science*,134, **2017**.
- [36] Wu N, Luo Z, Ge Y, Guo P, Du K, Tang W, Du W, Zeng A, Chang C, Fu Q, A novel surface molecularly imprinted polymer as the solid-phase extraction adsorbent for the selective determination of ampicillin sodium in milk and blood samples, *Journal of Pharmaceutical Analysis*,6, 157-164, **2016**.
- [37] Ertürk G, Mattiasson B, Molecular imprinting techniques used for the preparation of biosensors, *Sensors*,17, 288, **2017**.
- [38] Wang Z, Cao X, Preparation of core-shell molecular imprinting polymer for lincomycin a and its application in chromatographic column, *Process Biochemistry*,50, 1136-1145, **2015**.
- [39] Li W-H, Stöver HD, Monodisperse cross-linked core-shell polymer microspheres by precipitation polymerization, *Macromolecules*,33, 4354-4360, **2000**.
- [40] Lu C-H, Zhou W-H, Han B, Yang H-H, Chen X, Wang X-R, Surface-imprinted core-shell nanoparticles for sorbent assays, *Analytical chemistry*,79, 5457-5461, **2007**.
- [41] Jin G, Li W, Yu S, Peng Y, Kong J, Novel superparamagnetic core-shell molecular imprinting microspheres towards high selective sensing, *Analyst*,133, 1367-1372, **2008**.
- [42] Niu M, Pham-Huy C, He H, Core-shell nanoparticles coated with molecularly imprinted polymers: a review, *Microchimica Acta*,183, 2677-2695, **2016**.
- [43] Chen L, Xu S, Li J, Recent advances in molecular imprinting technology: current status, challenges and highlighted applications, *Chemical Society Reviews*,40, 2922-2942, **2011**.
- [44] Cheong WJ, Yang SH, Ali F, Molecular imprinted polymers for separation science: A review of reviews, *Journal of separation science*,36, 609-628, **2013**.

- [45] Yang S, Wang Y, Jiang Y, Li S, Liu W, Molecularly imprinted polymers for the identification and separation of chiral drugs and biomolecules, *Polymers*,8, 216, **2016**.
- [46] Yu Y, Zhang Q, Chang C-C, Liu Y, Yang Z, Guo Y, Wang Y, Galanakis DK, Levon K, Rafailovich M, Design of a molecular imprinting biosensor with multi-scale roughness for detection across a broad spectrum of biomolecules, *Analyst*,141, 5607-5617, **2016**.
- [47] Figueiredo L, Erny G, Santos L, Alves A, Applications of molecularly imprinted polymers to the analysis and removal of personal care products: a review, *Talanta*,146, 754-765, **2016**.
- [48] Zaidi SA, Molecular imprinted polymers as drug delivery vehicles, *Drug delivery*,23, 2262-2271, **2016**.
- [49] Alvarez-Lorenzo C, Concheiro A, Smart drug delivery systems: from fundamentals to the clinic, *Chemical Communications*,50, 7743-7765, **2014**.
- [50] Mourão CA, Bokeloh F, Xu J, Prost E, Duma L, Merlier F, Bueno SnM, Haupt K, Tse Sum Bui B, Dual-Oriented Solid-Phase Molecular Imprinting: Toward Selective Artificial Receptors for Recognition of Nucleotides in Water, *Macromolecules*,50, 7484-7490, **2017**.
- [51] Krstulja A, De Schutter C, Favetta P, Manesiotis P, Agrofoglio LA, Artificial receptors for the extraction of nucleoside metabolite 7-methylguanosine from aqueous media made by molecular imprinting, *Journal of Chromatography A*,1365, 12-18, **2014**.
- [52] Okutucu B, Vurmaz D, Tuncal A, Türkcan C, Aktaş Uygun D, Akgöl S, Boronate affinity nanoparticles for nucleoside separation, *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*,44, 322-327, **2016**.
- [53] Raitman OA, Chegel VI, Kharitonov AB, Zayats M, Katz E, Willner I, Analysis of NAD (P)⁺ and NAD (P) H cofactors by means of imprinted polymers associated with Au surfaces:: A surface plasmon resonance study, *Analytica chimica acta*,504, 101-111, **2004**.
- [54] Liu X-C, Boronic Acids as Ligands for Affinity Chromatography, *Chinese Journal of Chromatography*,24, 73-80, **2006**.
- [55] Kawamura T, Mori N, Shibata K, β -Nicotinamide Mononucleotide, an Anti-Aging Candidate Compound, Is Retained in the Body for Longer than Nicotinamide in Rats, *Journal of nutritional science and vitaminology*,62, 272-276, **2016**.
- [56] Anderson KA, Madsen AS, Olsen CA, Hirschey MD, Metabolic control by sirtuins and other enzymes that sense NAD⁺, NADH, or their ratio, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*,**2017**.
- [57] Pumera M, Scipioni R, Iwai H, Ohno T, Miyahara Y, Boero M, A Mechanism of Adsorption of β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide on Graphene Sheets: Experiment and Theory, *Chemistry-A European Journal*,15, 10851-10856, **2009**.

- [58] Ding D, Jiang H, Fu Y, Li Y, Salvi R, Ototoxic model of oxaliplatin and protection from nicotinamide adenine dinucleotide, *Journal of otology*,1, 22-30, **2013**.
- [59] Lin S-J, Guarente L, Nicotinamide adenine dinucleotide, a metabolic regulator of transcription, longevity and disease, *Current opinion in cell biology*,15, 241-246, **2003**.
- [60] Yuan H, Marmorstein R, Structural basis for sirtuin activity and inhibition, *Journal of Biological Chemistry*,287, 42428-42435, **2012**.
- [61] Mericskay M, Nicotinamide adenine dinucleotide homeostasis and signalling in heart disease: pathophysiological implications and therapeutic potential, *Archives of cardiovascular diseases*,109, 207-215, **2016**.
- [62] Hage DS, Affinity chromatography: a review of clinical applications, *Clinical chemistry*,45, 593-615, **1999**.
- [63] Salimi K, Usta DD, Koçer İ, Çelik E, Tuncel A, Protein A and protein A/G coupled magnetic SiO₂ microspheres for affinity purification of immunoglobulin G, *International journal of biological macromolecules*,**2018**.
- [64] Li H, Liu Z, Recent advances in monolithic column-based boronate-affinity chromatography, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*,37, 148-161, **2012**.
- [65] Hage DS, Anguizola JA, Bi C, Li R, Matsuda R, Papastavros E, Pfaunmiller E, Vargas J, Zheng X, Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: recent trends and developments, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*,69, 93-105, **2012**.
- [66] Pir Muhammad DLaZL, Boronate Affinity Chromatography, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*,**2015**.
- [67] Li D, Chen Y, Liu Z, Boronate affinity materials for separation and molecular recognition: structure, properties and applications, *Chemical Society Reviews*,44, 8097-8123, **2015**.
- [68] Stöber W, Fink A, Bohn E, Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range, *Journal of colloid and interface science*,26, 62-69, **1968**.
- [69] Nozawa K, Gailhanou H, Raison L, Panizza P, Ushiki H, Sellier E, Delville J, Delville M, Smart control of monodisperse Stöber silica particles: effect of reactant addition rate on growth process, *Langmuir*,21, 1516-1523, **2005**.
- [70] Lei X, Yu B, Cong H-L, Tian C, Wang Y-Z, Wang Q-B, Liu C-K, Synthesis of monodisperse silica microspheres by a modified stöber method, *Integrated Ferroelectrics*,154, 142-146, **2014**.
- [71] Yu B, Cong H, Xue L, Tian C, Xu X, Peng Q, Yang S, Synthesis and modification of monodisperse silica microspheres for UPLC separation of C 60 and C 70, *Analytical Methods*,8, 919-924, **2016**.
- [72] Grama S, Horák D, Preparation of Monodisperse Porous Silica Particles Using Poly (Glycidyl Methacrylate) Microspheres as a Template, *Physiological research*,64, S11, **2015**.

- [73] Han Y, Lu Z, Teng Z, Liang J, Guo Z, Wang D, Han M-Y, Yang W, Unraveling the Growth Mechanism of Silica Particles in the Stöber Method: In Situ Seeded Growth Model, *Langmuir*,33, 5879-5890, **2017**.
- [74] Knopp D, Tang D, Niessner R, Bioanalytical applications of biomolecule-functionalized nanometer-sized doped silica particles, *Analytica Chimica Acta*,647, 14-30, **2009**.
- [75] Elmas B, Tuncel M, Yalçın G, Şenel S, Tuncel A, Synthesis of uniform, fluorescent poly (glycidyl methacrylate) based particles and their characterization by confocal laser scanning microscopy, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*,269, 125-134, **2005**.
- [76] Salimi K, Usta DD, Çelikbıçak Ö, Pinar A, Salih B, Tuncel A, Ti (IV) carrying polydopamine-coated, monodisperse-porous SiO₂ microspheres with stable magnetic properties for highly selective enrichment of phosphopeptides, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*,153, 280-290, **2017**.
- [77] Günel G, Kip Ç, Öğüt SE, Usta DD, Şenlik E, Kibar G, Tuncel A, Human genomic DNA isolation from whole blood using a simple microfluidic system with silica-and polymer-based stationary phases, *Materials Science and Engineering: C*,74, 10-20, **2017**.
- [78] Liu J, Qiao SZ, Liu H, Chen J, Orpe A, Zhao D, Lu GQM, Extension of the Stöber method to the preparation of monodisperse resorcinol–formaldehyde resin polymer and carbon spheres, *Angewandte Chemie International Edition*,50, 5947-5951, **2011**.
- [79] Uğuzdoğan E, Denkbaş EB, Tuncel A, RNA-sensitive N-isopropylacrylamide/vinylphenylboronic acid random copolymer, *Macromolecular Bioscience*,2, 214-222, **2002**.
- [80] Anonim,Unit 3: Molecular Biology and Biotechnology,

<https://opentextbc.ca/biology/chapter/9-1-the-structure-of-dna/> (Haziran, **2018**)

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı: Çağıl Zeynep Süngü

Doğum Yeri: Bursa

Medeni Hali: Bekar

E-posta: cagilsungu@gmail.com

Adresi: 435. Cadde Birlik Mahallesi, Zirvekent Konutları Zambak Sitesi, 50/A NO:6
ÇANKAYA/ANKARA

Eğitim

Lise: Gazi Üniversitesi Vakfı Özel Fen Lisesi

Lisans: Başkent Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği

Yüksek Lisans: Hacettepe Üniversitesi Biyomühendislik ABD

Yabancı Dil ve Düzeyi:

İngilizce: İleri

İş Deneyimi

Stajyer: Gülhane Askeri Tıp Akademisi (GATA)

Stajyer: PENTA Tıbbi Cihazlar ve Bilişim Sistemleri San. ve Tic. A. Ş

Deneyim Alanları

Polimer Teknolojileri, Mikroakışkan Sistemleri, Nanoteknoloji

Tezden Üretilmiş Proje ve Bütçesi

-

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/ veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

C. Z. Sungu, C. Kip, Ali Tuncel, Boronate affinity separation of β -NAD via molecularly imprinted silica particles in batch and microfluidic systems, ISC 2018, 32nd The International Symposium on Chromatography, Cannes-Mandelieu, France, 23- 27 September, 2018. Poster Sunumu (Kabul edildi).





HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 20/06/2018

Tez Başlığı / Konusu: Manyetik Silika Bazlı Borat Afinite Kromatografisi Sorbentlerinin Sentezi ve Kromatografik Performanslarının İncelenmesi

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 97 sayfalık kısmına ilişkin, 19/06/2018 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 2 'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/dâhil
- 3- 5 kelimededen daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: ÇAĞIL ZEYNEP SÜNGÜ
Öğrenci No: N14334952
Anabilim Dalı: BİYOMÜHENDİSLİK
Programı: -
Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

20.06.2018

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Prof. Dr. S. ALİ TUNCEL