



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

KİMYA ANABİLİM DALI

**TİROSOLE ÖZGÜ MOLEKÜLER BASKILANMIŞ
POLİMERLERİN TASARIMI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Miren ŞEN

DANIŞMAN

Doç. Dr. Mehmet ODABAŞI

İKİNCİ DANIŞMAN

Doç. Dr. Baran ÖNAL ULUSOY

AKSARAY, 2017



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

KİMYA ANABİLİM DALI

**TİROSOLE ÖZGÜ MOLEKÜLER BASKILANMIŞ
POLİMERLERİN TASARIMI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Miren ŞEN

DANIŞMAN

Doç. Dr. Mehmet ODABAŞI

İKİNCİ DANIŞMAN

Doç. Dr. Baran ÖNAL ULUSOY

AKSARAY,2017

AKSARAY ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ONAY BELGESİ

Aksaray Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 142305407 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi "Miren ŞEN", ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "TİROSOLE ÖZGÜ MOLEKÜLER BASKILANMIŞ POLİMERLERİN TASARIMI" başlıklı tezini, aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışman : **Doç. Dr. Mehmet ODABAŞI**
Aksaray Üniversitesi

İkinci Danışman : **Doç. Dr. Baran ÖNAL ULUSOY**
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Nahit AKTAŞ**
Yüzüncü Yıl Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Doç. Dr. Gözde BAYDEMİR PEŞİNT**
Aksaray Üniversitesi

Teslim Tarihi:
Savunma Tarihi: 10.07.2017

DOĞRULUK BEYANI

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmanın tasarımından sonucuna kadar kendim hazırladığımı, bilgileri kendim toplayıp deneyleri kendim yaptığımı, bana ait olmayan tüm bilgileri eksiksiz şekilde kaynakçada gösterdiğimi ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Miren ŞEN

ÖNSÖZ

Kanser hastalığı başta olmak üzere çeşitli hastalıkların ilerlemelerinin durdurulması ve tedavisinde zeytin ve zeytinyağı tüketimi vardır. Zeytin karasuyunda bulunan pek çok doğal fenolik bileşik antioksidan olarak görev yapar. Doğal fenolik bileşikler oksitlenmeye karşı hücreyi korumaktadırlar. Yapılan pek çok çalışma fenolik bileşiklerin cilt, göğüs ve kolon kanserine ve kalp rahatsızlıklarına karşı koruyucu olduğunu göstermektedir (Owen vd., 2000). Konsantrasyonlarına bakıldığında fenolik bileşiklerin en önemli kısmını tirosol ve hidroksitirosolün oluşturduğu görülmektedir. Bu fenolik bileşiklerin zeytindeki miktarı da zeytinin kalitesini belirlemektedir. Ayrıca anti-kanserojen etkisi ile de zeytinin kalitesini olumlu yönde etkilemektedir. Tirosol, hidroksitirosol ve türevleri zeytinin olgunlaşması ile birlikte daha yüksek molekül ağırlıklı bileşenlere dönüşmektedir. Ve buna bağlı olarak bu fenolik bileşiklerin konsantrasyonu zeytinin gelişimi ile artmaktadır (Romani vd., 1999).

Kimyasal ve enzimatik yollarla tirosolün üretilmesi pahalı ve süreci oldukça yavaştır. Hidroksitriazolün sentez yoluyla elde edildiği yöntemlere ek olarak çok sayıda patent fenolik bileşiklerin zeytin karasuyundan geri kazanılmasına yönelik olarak, çözücü ekstraksiyonu, membran ayırma, kromatografik ayırma ve kombine işlemlere dayanan yöntemler için alınmıştır. Fakat bu yöntemlerin pek çoğu başta hidroksitriazol olmak üzere tek bir hedef molekülün, kompleks bir matriksten saflaştırılmasını sağlayamamıştır. Moleküler baskılanmış polimerler (MIP), baskılanan hedef molekülü spesifik olarak tanıma bölgelerine sahiptir. Buna dayanarak MIP'ler hedef moleküle bağlanabilmektedirler. Bununla birlikte, MIP'ler oldukça kararlıdır ve kuvvetli asidik, bazik ve organik çözücüler ile farklı sıcaklıklarda muamele edildiklerinde bile molekülleri tanıma özelliklerini korumaktadırlar. Moleküler baskılama tekniği son zamanlarda da doğal mleküllere göre daha kararlı olmalarından dolayı çok fazla araştırma konusu olmaya devam etmektedir (Odabası vd., 2007).

Bu tez 2017-017 Nolu Aksaray Üniversitesi Araştırma Fonu Projesi ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Bilime ve hayata bakış açısı ile bize ışık tutan ve bu çalışmanın yürütülmesi sırasında desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Mehmet ODABAŞI'na, tez konumun belirlenmesinde etkili olan ve tezimin ön çalışmalarında kullandığım saf fenoliklerin temininde yardımcı olan Doç. Dr. Baran ÖNAL ULUSOY'a engin bilgilerinden her zaman faydalandığımız Dr. Şeyda CEYLAN CÖMERT'e, Aksaray'da ki ailem olan ev arkadaşlarım Pelin Su YILDIRIM ve Şule ÇANKAL'a, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen laboratuvar arkadaşlarım Ömür ACET, Özlem ARSLAN ve Burcu ÖNAL'a, hayatım boyunca her konuda yanımda olan ve maddi, manevi desteklerini esirgemeyen annem Mergül ŞEN ve babam Hicabi ŞEN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Miren ŞEN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİDEKİLER.....	İv
ÖZET.....	Vi
ABSTRACT.....	Vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	Vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	İx
SİMGELER DİZİNİ.....	X
KISALTMALAR DİZİNİ.....	Xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Moleküler Baskılama Tekniği.....	1
1.1.1 Moleküler baskılama tekniğinin tarihteki yeri.....	1
1.1.2 Moleküler baskılamanın temel basamakları.....	2
1.1.3 Moleküler baskılama yönteminin aşamaları.....	3
1.1.4 Moleküler baskılama yönteminin çeşitleri.....	4
1.1.4.1 Kovalent baskılama.....	4
1.1.4.1.1 Kovalent baskılama tekniğinin avantajları.....	5
1.1.4.1.2 Kovalent baskılama tekniğinin dezavantajları.....	6
1.1.4.2 Kovalent olmayan baskılama.....	6
1.1.4.2.1 Kovalent olmayan baskılama tekniğinin avantajları.....	6
1.1.4.2.2 Kovalent olmayan baskılama tekniğinin dezavantajlar.....	7
1.1.4.3 Yarı kovalent baskılama	8
1.1.4.4 Metal – iyon etkileşimine dayanan baskılama baskılama yöntemi.....	8
1.1.5 MIP’lerin hazırlanmasında kullanılan başlıca bileşenler.....	9
1.1.5.1 Hedef ya da kalıp molekül.....	11
1.1.5.2 Fonksiyonel monomer.....	12
1.1.5.3 Çapraz bağlayıcı.....	14
1.1.5.4 Çözücüler.....	14
1.1.5.5 Sıcaklık.....	15
1.1.6 MIP’lerin oluşturulması.....	15
1.1.7 Moleküler baskılanmış polimerlerin kullanım alanları.....	15
1.2 Serbest Radikal (Zincir Uzasması) Polimerizasyonu.....	16
1.3 MIP Hazırlanmasında Kullanılan Polimerizasyon Yöntemleri.....	17
1.3.1 Yığın polimerizasyon.....	17
1.3.2 Süspansiyon polimerizasyonu.....	18
1.3.3 Çöktürme polimerizasyonu.....	19
1.3.4 Basamaklı polimerizasyon.....	19
1.4 Polimerlerin Karakterizasyon Basamakları.....	19

	<u>Sayfa</u>
1.5 Biyomoleküllerin Ayrılmasında Moleküler Baskılamanın Yeri.....	20
1.6 Tirosol.....	20
1.6.1 Zeytin ve içeriği.....	21
1.6.2 Zeytin ve zeytinyağındaki başlıca bileşen oleuropein.....	23
1.6.3 Hidroksitirosol.....	24
2. LİTERATÜR ÖZETLERİ.....	25
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	28
3.1 Malzeme.....	28
3.2 Yöntem	28
3.2.1 Tirosol molekülünün (kalıp molekül) dalga boyunun belirlenmesi.....	28
3.2.2 Tirosol molekülünün kalibrasyon doğrusunun belirlenmesi.....	28
3.2.3 Tirosol baskılanmış polimerlerin hazırlanması.....	29
3.2.4 Polimerlerden kalıp molekül tirosolün uzaklaştırılması.....	30
3.2.5 Sulu ortamda tirosol adsorpsiyon deneyleri.....	30
3.2.6 Seçimli adsorpsiyon çalışmaları.....	31
3.2.7 Desorpsiyon işlemleri ve tekrar kullanılabilirlik.....	32
3.3 Polimerlerin karakterizasyon çalışmaları.....	32
3.3.1 Baskılanmış ve baskılamamış polimerlerin şişme testleri.....	32
3.3.2 Baskılanmış ve baskılamamış polimerlerin yüzey alan ölçümleri.....	33
3.3.3 Polimerlerin taramalı elektron mikroskopu (SEM) analizleri.....	33
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	34
4.1 Tirosol molekülünün dalga boyunun belirlenmesi ve kalibrasyon doğrusu.....	34
4.2 Baskılanmış ve baskılamamış polimerlerin şişme testleri.....	34
4.3 Baskılanmış ve baskılamamış polimerlerin yüzey alan ölçümleri.....	36
4.4 Tirosol baskılanmış ve baskılanmamış polimerlerin SEM analizleri....	35
4.5 Baskılanmış polimerlerin tirosol adsorpsiyon çalışmaları.....	36
4.5.1 pH etkisi.....	36
4.5.2 Tirosol başlangıç derişiminin etkisi.....	37
4.5.3 Tirosol adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi.....	38
4.5.4 Tirosol adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi.....	39
4.6 Denge modelleri.....	40
4.7 Seçicilik çalışmaları.....	42
4.8 Tekrar kullanılabilirlik.....	44
5. SONUÇLAR.....	46
KAYNAKLAR.....	47
ÖZGEÇMİŞ.....	53

ÖZET

TIROSOLÜN SPESİFİK SAFLAŞTIRILMASINA YÖNELİK MOLEKÜLER BASKILANMIŞ POLİMERLERİN TASARIMI

Bu çalışma ile antioksidan özelliğe sahip zeytin meyvesinde ve yağında bulunan tirosol molekülü non-kovalent moleküler baskılama tekniği (MIP) kullanılarak saflaştırılmıştır. Polimerizasyonda monomer olarak metakrilik asit, çapraz bağlayıcı olarak etilen glikol dimetakrilat (EGDMA), başlatıcı olarak benzoil peroksit (BPO), çözücü olarak metanol ve kalıp molekül olarak tirosol kullanılarak yığın polimerizasyon tekniği uygulanmıştır. Polimerizasyon, 2,5 ml'lik şırıngalarda gerçekleştirilmiş ve diskler şeklinde kesilmiştir. Oluşturulan partiküllerden metanol/su karışımı kullanılarak kalıp molekül uzaklaştırılmıştır. Hazırlanan partiküller taramalı elektron mikroskobu (SEM), yüzey alan ölçümleri ve şişme testleri ile karakterize edilmiştir. Elde edilen bazı bulgular şöyledir: Tirosol analizleri için dalga boyu 228 nm olarak bulunmuştur. Sulu çözeltiden maksimum tirosol adsorpsiyonu 25°C, pH 6 ve 2,5 mg/mL tirosol başlangıç derişiminde gerçekleşmiştir. Desorpsiyon ajanı olarak metanol/su karışımı kullanılmıştır. Tirosol baskılanmış polimer için seçicilik testleri yarışmacı molekül olarak kullanılan pryogallol ve 2-Nitrosonaphtol-(1)'e için yapılmış ve tirosol moleküllerin bu iki moleküle karşı bağıl seçicilik katsayıları (β) sırasıyla 3,65 ve 8,11 olarak bulunmuştur. Tirosol baskılanmış polimerde 20 kullanımdan sonra sadece %3 lük bir adsorpsiyon kaybı görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Moleküler Baskılanmış Polimer (MIP), Tirosol, Yığın Polimerizasyon

ABSTRACT

DESIGN OF MOLECULAR IMPRINTING POLYMER FOR SPESIFIC SEPARATION OF TYROSOL

In this study, the tyrosol molecule existing in olive and olive oil having antioxidant properties was purified using non-covalent molecular imprinting technique (MIP). Tyrosol imprinting polymer was prepared with bulk polymerization technique, methacrylic acid, ethylene glycole dimethacrylate benzoyl peroxide and methanole were used as monomer, cross-linker, initiator and solvent, respectively. Polymerization was carried out in plastic syringes of 2.5 mL, then, formed polymer was crashed into pieces to obtain particulate form. Tyrosol used as template molecule was removed from the particles using methanole/water mixture. Prepared particles were characterized using different techniques as scanning electron microscopy (SEM), surface area measurement and swelling tests. Some results obtained as follows: Wavelength to analyse tyrosol was found as 228 nm. Maximum tyrosol adsorption was found at 25°C, pH 6 and in an initial tyrosol concentration of 2.5 mg/mL. Selectivity tests for tyrosol imprinting polymer was performed using pyrogallol and 2-Nitrosonaphthol-(1), and relative selectivity coefficients were found for ones as 3.65 and 8.11, respectively. An adsorption loss of only 3% was observed in tyrosol imprinting polymer after 20 adsorption-desorption cycles.

Key words: Molecular Imprinting Polymer (MIP), Tyrosol, Bulk Polymerization

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1:	Moleküler baskılama tekniğinin yıllara göre dağılımı..... 2
Şekil 1.2:	Polimerizasyon işleminin gerçekleşmesi ve yıkama işlemi ile kalıp molekülün yapıdan uzaklaştırılması..... 4
Şekil 1.3:	Kovalent baskılama..... 5
Şekil 1.4:	Kovalent olmayan baskılama..... 6
Şekil 1.5:	Yarı kovalent baskılama..... 8
Şekil 1.6:	Sıklıkla kullanılan başlatıcılar..... 14
Şekil 1.7:	Moleküler baskılanmış polimerlerin kullanım alanları..... 16
Şekil 1.8:	Yığın polimerizasyonun yapılma aşaması..... 18
Şekil 1.9:	Zeytinin yapısındaki fenolik bileşiklerin moleküler yapıları..... 21
Şekil 1.10:	Oleuropein'in moleküler yapısı..... 22
Şekil 1.11:	Oleuropeinin β -glikozidaz enzimi ile hidrolizi..... 22
Şekil 1.12:	Oleuropeinin vücuda alındıktan sonraki şematik metabolizması..... 23
Şekil 1.13:	Hidroksitirozolün moleküler yapısı..... 23
Şekil 1.14:	Tirozolün moleküler yapısı..... 24
Şekil 3.1:	Polimerizasyon işlemi tamamlanmış polimer..... 30
Şekil 3.2:	Kesikli sistem ile eş zamanlı çalışmalar..... 31
Şekil 3.3:	Pryogallol ve 2-Nitrosonaphtol-(1) moleküllerinin yapıları..... 32
Şekil 4.1:	Tirozol için kalibrasyon denklemi ve doğrusu..... 34
Şekil 4.2:	Tirozol baskılanmış ve baskılanmamış polimerlerin SEM Görüntüleri..... 36
Şekil 4.3:	Tirozol adsorpsiyonuna pH'nın etkisi..... 37
Şekil 4.4:	Tirozol adsorpsiyonuna başlangıç derişiminin etkileri..... 38
Şekil 4.5:	Tirozol adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi..... 39
Şekil 4.6:	Tirozol adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi..... 40
Şekil 4.7:	Tirozol baskılanmış polimerik partiküllere tirozol adsorpsiyonu için Scatchard grafiği..... 41
Şekil 4.8:	Seçicilik çalışmalarında kullanılan moleküller..... 42
Şekil 4.9:	Baskılanmış ve baskılanmamış polimerlerin tirozol ve yarışmacı moleküllere karşı adsorpsiyon davranışları..... 43
Şekil 4.10:	Tirozol baskılanmış polimerlerin tekrar kullanılabilirliği..... 45

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 1.1:	Kovalent baskılama ile Kovalent olmayan baskılamanın karşılaştırılması.....	7
Çizelge 1.2:	Kullanılan bazı kalıp molekülle.....	10
Çizelge 1.3:	Kullanılan fonksiyonel monomerler ve yapıları.....	11
Çizelge 1.4:	Sıklıkla kullanılan çapraz bağlayıcılar.....	13
Çizelge 4.1:	Scatchard grafiğinden elde edilen, düşük ve yüksek derişim bölgelerine ait değerler.....	42
Çizelge 4.2:	Kalıp ve yarışmacı moleküllerin MIP ve NIP'e karşı İ.F. değerleri.....	43
Çizelge 4.3:	Tirosol ve yarışmacı moleküllerin seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları.....	44

SEMBOLLER DİZİNİ

Dk	Dakika
Rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
Gr	Gram
V	Hacim
v/v	Hacimce Yüzde
Kg	Kilogram
L	Litre
Ppm	mg Çözünen/L
µm	Mikrometre
M	Mili
Mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
M	Molarite
Nm	Nanometre
°C	Santigrat Derece
Cm	Santimetre

KISALTMALAR DİZİNİ

BPO	Benzoil Peroksit
CBZ	Karbamazepin
EGDMA	Etilen glikol dimetakrilat
HT	Hidroksitirozol
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
MBAA	N,N'-metilenbisakrilamid
MIP	Moleküler Baskılanmış Polimerler
NIP	Moleküler Baskılanmamış Polimerler
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
T	Tirozol
UV-VIS	Görünür Bölge ve Mor Ötesi Spektroskopisi

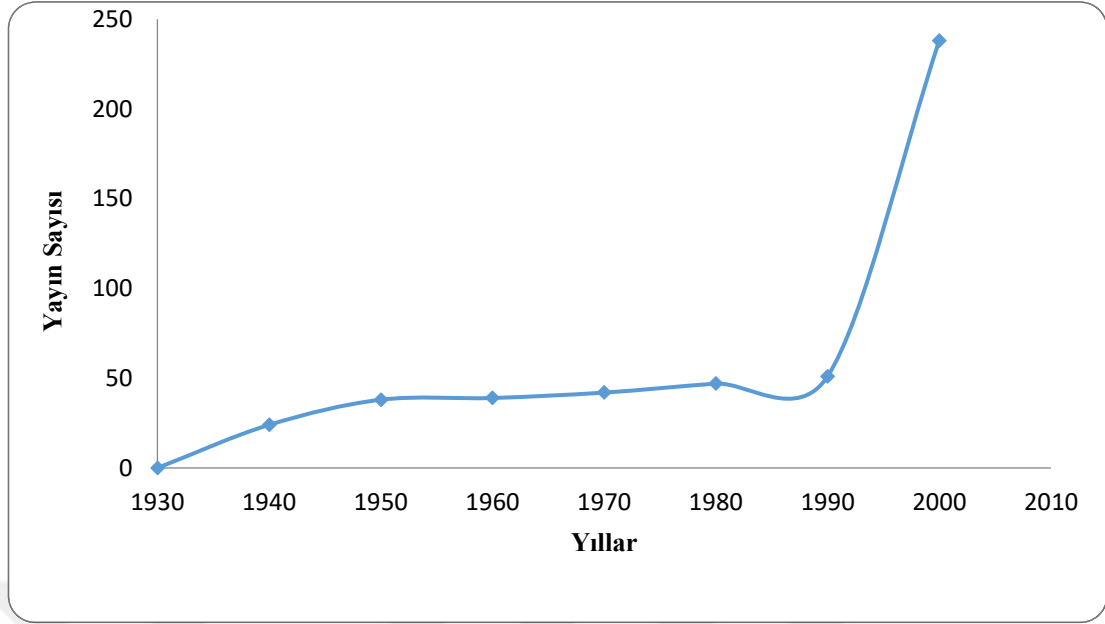
1. GİRİŞ

1.1 Moleküler Baskılama Tekniği

1.1.1 Moleküler baskılama tekniğinin tarihteki yeri

Moleküler baskılama tekniği eski zamanlardan günümüze kadar gelmektedir. İlk defa 1894 yılında Fischer tarafından kullanılan enzim-substrat modeli günümüzde de kullandığımız “Anahtar-Kilit” modelini açığa çıkarmıştır. Buna göre “Anahtar-Kilit” modeli enzimin üzerinde bulunan substratın üç boyutlu yapısını tamamlayan aktif bölgeler içermekte ve böylece substrat tıpkı anahtar gibi kendisine özgü yapıyı tamamlayan aktif bölgelerle etkileşime girmektedir.

Sentetik organik polimerler birbirlerinden farklı çalışmalarda ilk defa 1972 yılında sunulmuştur (Takagishi ve Klatz, 1972). Yapılan farklı çalışmalarla ise kovalent baskılama yöntemi denenmiş ve olumlu sonuçlanan çalışmalar yapılmıştır (Wulff ve Sarhan, 1972). Kovalent baskılama yöntemi ile kıyaslanınca daha pratik olan non-kovalent baskılama yöntemi Mosbach tarafından ileri sürülmüştür (Arshady ve Mosbach, 1981). Yapılan bir çalışma ile miyogloblin molekölü baskılanmış polimer kolon dolgu maddesi olarak kullanılmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır (Hjerten vd., 1997). 1990 yılında amino asit ve türevleri kullanılarak farklı bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaya göre amino asit türevleri ile metakrilat bazlı MIP’ler üretilmiş ve HPLC’de ki kullanımında olumlu sonuçlar elde edilmiştir (Anderson vd., 1990). Moleküler baskılama tekniğinin yıllara göre dağılımı Şekil 1.1’de gösterilmiştir. 30 yıl önce Mosbach ve arkadaşları nanometre ölçeğindeki yapıları yakalamak için bir tür teknoloji geliştirerek çok küçük boyuttaki biyolojik yapıları yakalayabilmişlerdir.



Şekil 1.1: Moleküler baskılama tekniğinin yıllara göre dağılımı

1.1.2 Moleküler baskılamanın temel basamakları

Moleküler baskılama genel olarak üzerinde kalıp moleküle özgü spesifik tanıma bölgeleri olan polimerlerin sentezlenmesi işlemidir. Sentez işlemi için gerekli olan temel bileşenler vardır: 1) kalıp molekül ya da baskılanacak molekül, 2) monomer, 3) çapraz bağlayıcı, 4) başlatıcı, 5) çözücü. Polimerizasyon işleminden sonra yapıda kalıp molekülün yerini alacak boşlukların oluşması amacı ile yıkama işlemi yapılarak kalıp molekül polimerden uzaklaştırılır. Oluşan oyuk bölgeler uzaklaştırılan kalıp molekülün boyutunu, yapısını ve kimyasal özelliklerini tanırlar ve uygun şartlarda kalıp molekülün bağlanmasını sağlar. Bundan sonra ki işlemlerde kalıp molekülü içeren bir çözelti, baskılı polimere uygulandığında aktif tanıma bölgeleri sayesinde kalıp molekülünü tanıyacak ve böylece kalıp molekül polimere tekrar bağlanmış olacaktır.

Moleküler baskılanmış polimerler farklı nedenlerden dolayı araştırma konusu olmuştur:

- 1) Doğal reseptörlere aynı denecek kadar yakın ölçüde seçicilik ve afiniteleri,
- 2) Doğal moleküllere göre daha kararlı olmaları,
- 3) Hazırlanmalarının ve uygulanmalarının kolay olması (Odabaşı vd., 2007).

1.1.3 Moleküler baskılama tekniğinin aşamaları

Moleküler baskılama yönteminin gerçekleşmesi sırasında temel olarak 3 aşama vardır (Şekil 1.2).

a. Ön kompleksleşme

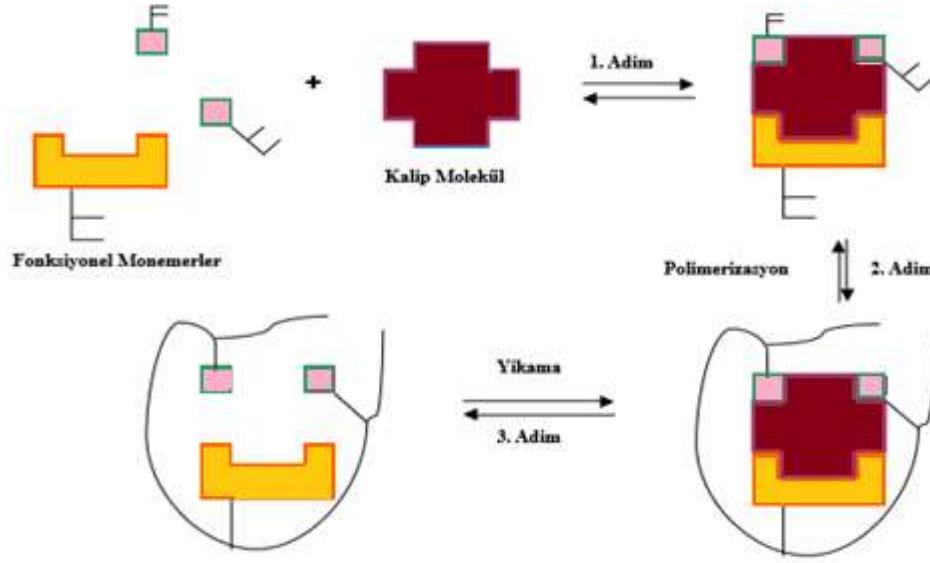
Fonksiyonel monomerler kalıp ya da diğer bir deyişle hedef moleküle kovalent ya da kovalent olmayan etkileşimlerle bağlanırlar ve kompleks oluştururlar. Bu aşamada hidrofobik etkileşimler, Van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağı gibi etkileşimler hedef molekülün etrafında monomerlerin duruşlarını etkilemektedir (Verheyen vd., 2011). Bu etkileşimlerle birlikte monomer ve kalıp molekül arasında bir bağlanma söz konusudur ve yeni bir yapı meydana gelmektedir. Bu kompleks oluşumu sırasında hedef molekülün üç boyutlu yapısı ve kimyasal özellikleri önemli bir yer tutmaktadır.

b. Polimerizasyon

Fonksiyonel monomer ve kalıp molekül kompleksi polimerizasyona uygun bir çapraz bağlayıcının kullanılmasıyla birlikte monomer üzerinden polimerleştirilir. Polimer için gözenek boyutu oldukça önemli bir yere sahiptir. Bu nedenle polimerizasyon gözenek oluşumunu sağlayan uygun bir çözücü varlığında gerçekleştirilir (Cazes, 2006).

c. Kalıp molekülün uzaklaştırılması

Yapıda kalıp molekülün yerinalacak boşlukların oluşturulması amacı ile kalıp molekül polimerden uzaklaştırılır. Oluşturulan polimerden birkaç kez kirliliği gidermek amacıyla yıkama yapıldıktan sonra kalıp molekülü uzaklaştırmak için monomer ile kalıp molekül arasındaki etkileşimden daha kuvvetli etkileşime sahip bir ajan kullanılır. Kalıp molekülün üç boyutlu yapısını, kimyasal özelliklerini tanıyan seçici yapıdan uygun yıkama ajanları kullanılarak kalıp molekül uzaklaştırılır.



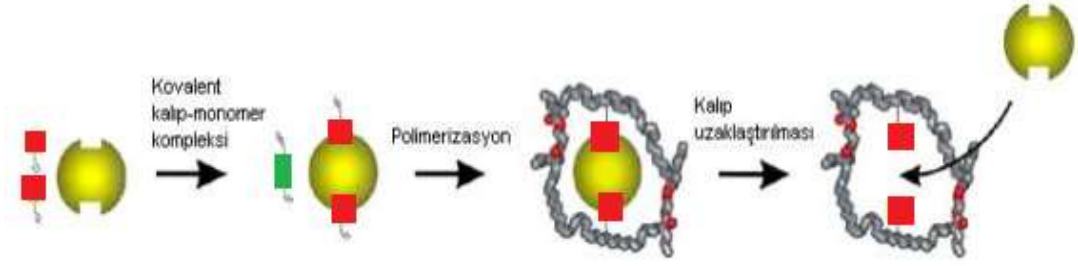
Şekil 1.2: Polimerizasyon işleminin gerçekleşmesi ve yıkama işlemi ile kalıp molekülün yapıdan uzaklaşması

1.1.4 Moleküler baskılama yöntemlerinin çeşitleri

Moleküler baskılama yöntemi fonksiyonel monomer ile kalıp molekül arasındaki etkileşimin ve oluşan bağın çeşidine göre gruplara ayrılır.

1.1.4.1 Kovalent baskılama

Polimerizasyon işleminden önce fonksiyonel monomer ve hedef molekül arasında kovalent bir bağlanma gerçekleşir. Kalıp molekülün yapıdan uzaklaştırılması sırasında hedef molekül ile monomer arasındaki kovalent bağlar kırılır ve polimer içerisinde seçici boşluklar oluşturmak için kalıp molekül yapıdan uzaklaştırılır. Ortama kalıp molekülü içeren farklı bir çözelti verildiğinde seçici olarak hedef molekül boşluklara tekrar kovalent olarak bağlanır (Şekil1.3) (Alexander vd., 2006).



Şekil 1.3: Kovalent Baskılama

Kovalent baskılama ilk olarak Wulf ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiş ve yaptıkları çalışmada p-vinilbenzenboronik asit ile 4nitrofenil- α D-mannopiranositin 2:1 oranında kovalent birleşimi ile oluşan kompleks etilen dimetakrilat (çapraz bağlayıcı olarak) varlığında polimerleştirilmiştir (Wulff vd., 1977).

1.1.4.1.1 Kovalent baskılama tekniğini avantajları

Kovalent baskılamada kalıp molekül ve monomer kompleksinin oldukça kararlı olması sayılabilecek en önemli avantajları arasında yer almaktadır. Bu da yapıdaki bağlanma bölgelerin homojen olarak dağılmasını sağlamaktadır. Ayrıca yapının kararlı olması polimerizasyonun yüksek pH, yüksek sıcaklık şartlarında gerçekleştirilebilmesine olanak sağlamaktadır (Ikegami vd., 2004). Polimerizasyon oluşturma sırasında kullanılan kalıp molekül miktarı da oldukça önemlidir. Kovalent olmayan baskılamaya göre kovalent baskılama da kullanılan kalıp molekül miktarının fazlalığı bağlanma bölgelerinde ki verimi de arttırmaktadır (Cazes, 2006).

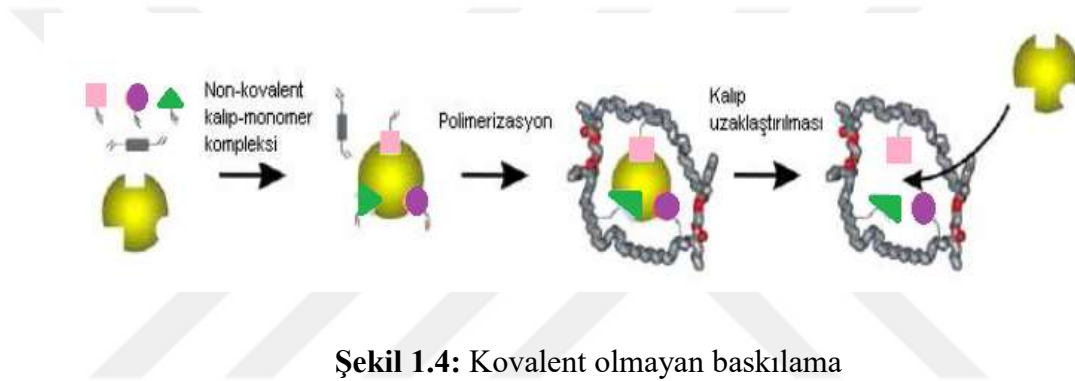
1.1.4.1.2 Kovalent baskılama tekniğinin dezavantajları

Kovalent baskılamanın dezavantajları oldukça fazladır ve bu nedenle kullanımı da azdır. Ayrıca ekonomik olmayışı da kullanımını kısıtlamaktadır. Polimerin sentezi sırasında kalıp molekül ve monomer arasında sık sık sorunlar çıkmakta ve kalıp molekülün polimere tersinir olarak bağlanma sayısı kısıtlanmaktadır (Kriz vd., 1997; Sellergren vd., 1988). Hedef molekülün yapıda tanınması sırasında kovalent bağ oluşumu genellikle yavaş olarak gerçekleşir. Kromatografik ayırmalarda ise sabit faz ve analit arasında hızlı bir etkileşim gerçekleşeceğinden doğru sonuçlar alınmasını engellemektedir. Kovalent bağ oluşturdıkları için ise bağlanma kinetikleri de oldukça yavaştır (Caro vd., 2002; Steinke vd., 1995).

1.1.4.2 Kovalent olmayan baskılama

Kovalent olmayan baskılama yöntemi Arshady ve arkadaşları tarafından 1981’de kullanılan bir yöntemdir (Arshady ve Mosbach, 1981). Kovalent olmayan baskılama yönteminde monomer ile hedef molekül arasında ki bağlanma hidrojen bağı, π - π etkileşimleri, hidrofobik etkileşimler gibi kovalent olmayan etkileşimlerle gerçekleşmektedir (Şekil 1.4).

Kovalent olmayan baskılamada polimerizasyondan sonra kalıp molekül basit çözücü ekstraksiyonuyla yapıdan uzaklaştırılabilir. Kalıp molekülün yapıdan uzaklaştırılması ile oluşan oyuklara spesifik kalıp molekül tekrar kovalent olmayan etkileşimlerle bağlanır.



1.1.4.2.1 Kovalent olmayan baskılama tekniğinin avantajları

Moleküler baskılamada en çok tercih edilen kovalent olmayan baskılamadır (Sellergren vd., 1988; Zhong vd., 2001). Kovalent olmayan yaklaşım polimerizasyon öncesi kalıp molekül etrafında monomerlerle düzenlenmesine kovalent olmayan etkileşimlerle şans verdiği için daha basit bir yaklaşımdır. Kovalent olmayan bağlanma kinetiği kovalent bağlanma ile kıyaslandığında enzim ile substrat arasındaki bağlanmaya oldukça benzemektedir (Sellergren vd., 1988). Kovalent baskılamada olduğu gibi kalıp molekülü uzaklaştırmak kovalent olmayan etkileşimler zayıf olduğu için zor değildir. Kalıp molekülün bağlanma kinetiği daha hızlıdır.

1.1.4.2.2 Kovalent olmayan baskılama tekniğinin dezavantajları

Kovalent olmayan yapılarda bağlanma bölgelerinin dağılımı heterojendir. Bunun sonucunda da polimerde ki oyuklara spesifik olmayan bağlanmalar gerçekleşir (Katz

ve Davis, 1999; Dong vd., 2002). Hazırlanan baskılanmış polimerler kromatografi çalışmalarında kullanıldığı zaman pik genişlemesine neden olabilmektedir (Mallik vd., 1994; Yoshizako vd., 1998).

Görüldüğü gibi her iki yöntemin de birbirlerine göre avantaj ve dezavantajları vardır. Kullanılacak yöntem kalıp molekülün yapısına, çeşidine, zamana ve maliyete göre değişim gösterebilmektedir.

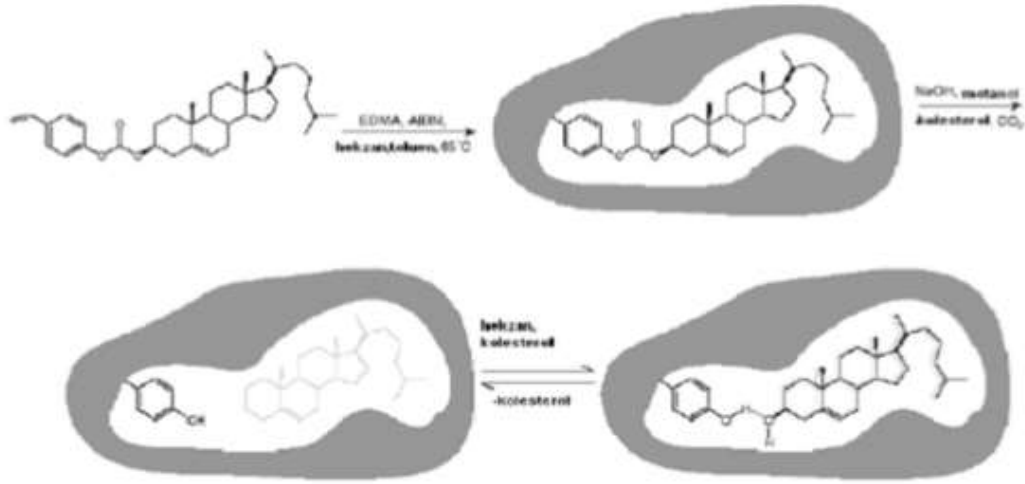
Çizelge 1.1:Kovalent baskılama ile kovalent olmayan baskılamanın karşılaştırılması

	Kovalent	Kovalent Olmayan
Monomer-Kalıp molekül kompleksinin sentezi	Gerekli	Gereksiz
Kalıp molekülün bağlanıp uzaklaşması	Yavaş	Hızlı
Polimerizasyondan sonra kalıp molekülün uzaklaşması	Zor	Kolay
Polimerizasyon Koşulları	Geniş	Kısıtlı
Bağlanma bölgelerinin yapısı	Belirgin	Fazla değil

1.1.4.3 Yarı kovalent baskılama

Yarı kovalent baskılama kovalent ve kovalent olmayan baskılamanın olumlu yönlerini alarak hazırlanan yöntemdir. Bu yöntemde kalıp molekül ile monomer arasında oluşacak olan polimer kovalent bağ yaparak gerçekleşir. Kalıp molekül yapıdan uzaklaştırıldıktan sonra kalıp molekülün tekrar bağlanması ise kovalent olmayan etkileşimlere dayanır (Whitcombe vd., 1995). Bu baskılama yöntemini geliştirmek amacıyla yapılan çalışmalarda kalıp molekül ile monomer arasına kalıp molekülle birlikte yapıdan uzaklaşan ek gruplar eklenir. Bu eklenen gruplar kalıp molekül ile monomerin polimerleşmesi sırasında kovalent bağlanmalarını sağlarken kalıp molekülün ortamdaki uzaklaştırılıp tekrar bağlanması esnasında da kovalent olmayan etkileşimlerle geri bağlanmasında ki sterik engelleri ortadan kaldırmaktadır. Bu amaçla eklenen gruplardan biri de karbonat esterinin karbonil grubudur. Karbonil

grubu sayesinde baskılanmış moleküllere üre, üre tan, kolesterol gibi örnekler verilebilir (Kirsch vd., 2000).



Şekil 1.5: Yarı kovalent baskılama

1.1.4.4 Metal iyon etkileşimlerine dayanan baskılama yöntemi

Metal iyon etkileşimlerine dayanan baskılama yönteminde kullanılan metal iyonları ya da kullanılan metal iyonlarının kompleksleri hedef molekül olarak kullanılır. Bu baskılama yöntemi protein saflaştırmada, biyosensörlerde de ayrıca sıklıkla kullanılan bir yöntemdir.

Metal iyon etkileşimlerine dayanan baskılama türünde kovalent ya da kovalent olmayan etkileşimlerden daha kuvvetli bir etkileşim gerçekleşir. Bunun nedeni de değişik metal iyonlarının değişik fonksiyonel gruplara ilgisinin daha da fazla olmasıdır. Bu nedenle de moleküler baskılama tekniği metal iyonları sayesinde yüksek seçicilikte ve yüksek afiniteye sahip polimerik yapıların oluşturulmasında oldukça önemli bir yere sahip olmasıdır. Bu etkileşime dayanan baskılama türü biyosensörlerde, kromatografik ayırmalarda da kullanılabilmektedir (Matsui vd., 1996).

1.1.5 MIP'lerin hazırlanmasında kullanılan başlıca bileşenler

Moleküler baskılanmış polimerlerin hazırlanması aşamasında kalıp molekül, fonksiyonel monomer, uygun bir başlatıcı, uygun bir çözücü ve kalıp molekül ile fonksiyonel monomere uygun çapraz bağlayıcının varlığı gereklidir.

1.1.5.1 Hedef ya da kalıp molekül

Moleküler baskılama tekniğinin ana bileşeni kalıp moleküldür. Baskılanacak olan kalıp molekülün monomerlerle kompleks yapacak fonksiyonel gruplarının olması moleküler baskılamanın önemli koşullarındandır. Hedef molekülün etkileşim yapacak bölgeleri de önemli olmakla birlikte kalıp molekül reaksiyon sırasında kararlı kalmalıdır (Yan ve Row, 2006).

Moleküler baskılama teknolojisinde kalıp molekül olarak makro düzeyde yapılar seçilebilir. Kalıp molekülden kaynaklanan sıkıntıların polimerizasyon aşamasında yaşanmaması için dikkat edilmesi ve araştırılması gereken birkaç konu vardır. Bunlar; hedef molekülün polimerize olmasını engelleyecek gruplar taşıyıp taşımadığı ya da kalıp molekülün yapısında polimerizasyonu geciktirecek fonksiyonel grupların olup olmadığı, kalıp molekülün yüksek sıcaklıkta ya da UV ışınlarında kararlı olup olmadığı araştırılmalıdır (Komiya vd., 2003).

Hedef molekül ile çalışırken kalıp molekülün boyutunun büyük olması da problem yaratmaktadır. Polimerde çapraz bağlar arasından kalıp molekülün çıkarılması yani uzaklaştırılması daha zor olacağından küçük moleküller daha fazla tercih edilmektedir. Aşağıda ki tabloda da kullanılabilecek kalıp moleküllerin listesi verilmiştir.

Çizelge 1.2: Kullanılan bazı kalıp moleküller

Sınıf	Bileşik	Yaklaşım
İlaçlar	Timolol	Non-kovalent
	Teofilin	Non-kovalent
	Diazepam	Non-kovalent
	Morfin	Non-kovalent
	Naproksen	Non-kovalent
	Ephedrine	Non-kovalent
	Pentamidine	Non-kovalent
Hormonlar	Enkefalin	Non-kovalent
Böcek ilaçları	Atrazine	Non-kovalent
Proteinler	Transferin	Kovalent
	RNase A	Non-kovalent
	Üreaz	Non-kovalent
Amino asitler	Amino asit türevleri	Non-kovalent
	Dansyl-Phe-OH	Non-kovalent
Peptidler	Ac-Trp-Phe-OMe	Non-kovalent
	Phe-Gly-anilide	Non-kovalent
	Boc-Phe-Gly-OEt	Non-kovalent
	Cbz-Ala-Ala-OMe	Non-kovalent
	Cbz-Ala-Gly-Phe-OMe	Non-kovalent
Karbonhidratlar	Galaktoz türevleri	Non-kovalent
	Glukoz türevleri	Non-kovalent
	Fruktoz türevleri	Non-kovalent
Koenzimler	Pyridoksal türevleri	Non-kovalent
Nükleotidler NAD ⁺	Kovalent	Kovalent
Steroidler	Kolesterol	Kovalent
Boyalar	Safranin O	Non-kovalent
	Rodanil mavisi	Non-kovalent
Metal iyonları	Ca(II)	Metal
	Cu(II)	Metal
Diğer	Bis-imidazoller	Metal
	Mandelik asit	Non-kovalent

1.1.5.2 Fonksiyonel monomerler

Monomerler moleküler baskılamanın temelini oluşturan ve bağlanmadan sorumlu bileşenlerdir. Polimerleşme sırasında kararlı yapının oluşabilmesi için uygun monomer seçimi önemlidir. Non-kovalent bağlanan baskılama yönteminde monomer ile kalıp molekül arasındaki etkileşimi arttırmak için fazla miktarda hedef molekül kullanılır. Bu kullanılan kalıp molekülün miktarını saptamakta ancak deneysel yollarla mümkündür (Kim ve Spivak, 2003). Kovalent baskılamada monomer oranını değiştirerek incelemeye gerek görülmemektedir. Bunun nedeni kalıp molekülün kovalent olarak bağlanacak monomer sayısını belirlemesidir. Kullanılan bazı monomerler aşağıdaki çizelgede verilmiştir.

Çizelge 1.3: Kullanılan fonksiyonel monomerler ve yapıları

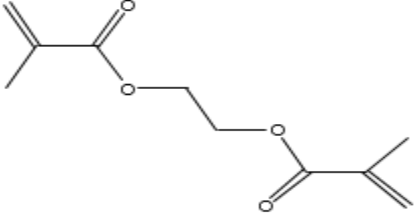
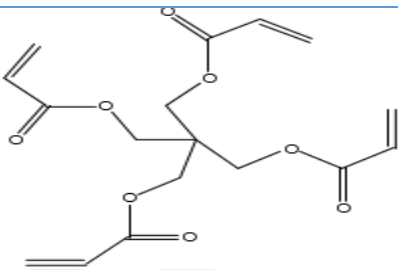
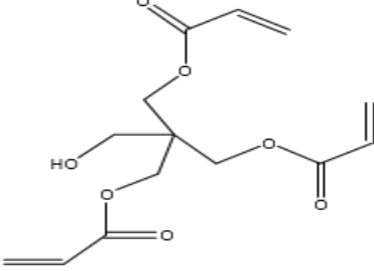
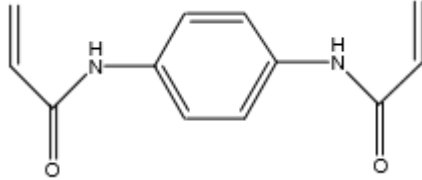
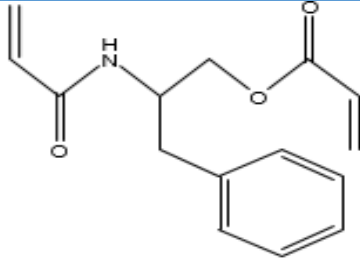
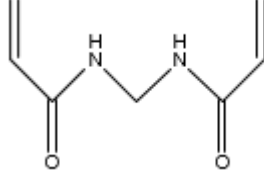
Fonksiyonel Monomer	Monomerin Açık Yapısı
Metakrilik asit (MAA)	
p-vinilbenzoik asit	
İtakonik asit	
N-(2-aminetil)-metakrilamid	
4-vinilpiridin(4-VP)	
4-(5)-vinilimidazol	
Metakrilamid	
Stiren	

1.1.5.3 Çapraz bağlayıcı

Çapraz bağlayıcılar yapıda polimer ağı oluşturmakla görevlidir. Bunun dışında bu bileşen baskılanmış kalıp moleküle spesifik bağlanma bölgelerinin kararlı olmasının sağlamakla da görevlidir ve polimerin sertliğinden de sorumludur (Komiya vd., 2003). Polimerlerin daha sonraki aşamalarında da çözücüde çözünmesini engelleyen bileşenler çapraz bağlayıcılardır. Polimerdeki apraz bağlayıcı ve monomer oranı da farklı sayıda bağlanma bölgesi oluşumuna neden olmaktadır ve seçiciliği de birinci dereceden etkiler (Dickert ve Haydan, 1999). Etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) en çok kullanılan çapraz bağlayıcı olmakla birlikte çok sık kullanılan çapraz bağlayıcılar aşağıdaki çizelgede verilmiştir.



Çizelge 1.4: Sıklıkla kullanılan çapraz bağlayıcılar

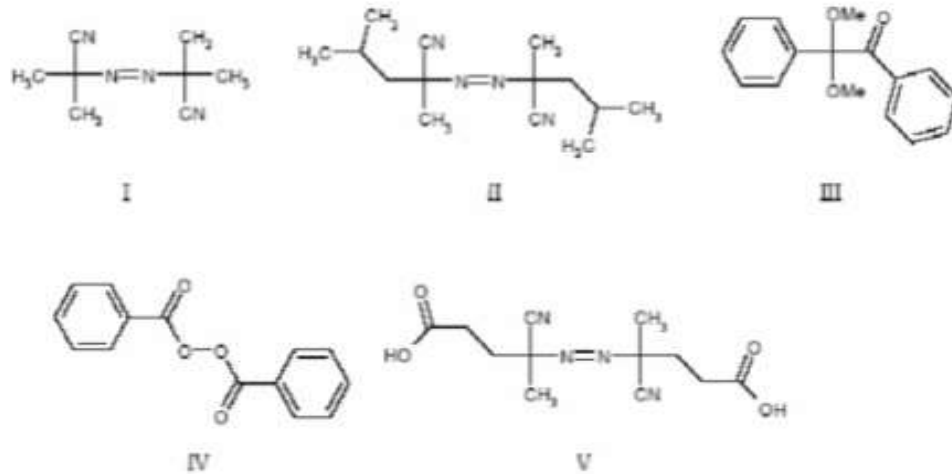
Çapraz Bağlayıcı	Çapraz Bağlayıcının Açık Yapısı
Etilen glikol dimetakrilat (EDMA)	
p-Divinilbenzen	
Pentaeritrol tetraakrilat	
Pentaeritrol triakrilat	
N,N'-1,4-fenilendiakrilamid	
N,O-bisakriloil-L-fenilalaninol	
N,N'-metilendiakrilamid	

1.1.5.4 Çözücüler

Moleküler baskılama teknolojisinde monomer, kalıp molekül, çapraz bağlayıcı, başlatıcı ve tüm bileşenleri bir arada tutan bileşen çözücü olduğundan ve aynı zamanda polimerin gözenekli yapısını oluşturduğundan oldukça önemlidir. Ayrıca yapıda çözücünün diğer bir görevi de kalıp molekülün bağlanma hızını arttırmaktır. Kullanılan çözücü yüksek çözünürlüğe sahip olmakla birlikte kalıp molekül ile monomer arasındaki etkileşimi de kolaylaştıran özelliklere de sahip olmalıdır. MIP’de kullanılacak çözücü seçimi baskılama çeşidini de belirlemektedir. Kovalent baskılama tekniğinde birçok çözücü rahatlıkla kullanılabilirken non-kovalent baskılamada bileşenler arasındaki etkileşim kompleks oluşumunu etkileyeceği için kritik bir rol oynar. En sık kullanılan çözücüler ise toluen, benzen, ksilen gibi dielektrik sabiti düşük olan çözücülerdir.

1.1.5.5 Başlatıcı

Moleküler baskılama tekniğinde polimerizasyonun başlamasını sağlayan bileşendir. MIP’de kullanılan bazı başlatma yöntemleri vardır. Bunlar radikal polimerizasyonu, radyasyon polimerizasyonu ve elektrokimyasal polimerizasyon yöntemleridir (Li vd., 2012). Polimerde kullanılan başlatıcı miktarı monomere kıyasla oldukça az kullanılır (Yan vd., 2006).



Şekil 1.6: Sıklıkla kullanılan başlatıcılar; I) azobisisobutyronitril
II) azobisdimetilvaleronitril III) dimetilasetal benzil IV)
Benzoil peroksit V) 4,4'-azo(4-siyanovalerik asit)

1.1.5.6 Sıcaklık

MIP’de polimerizasyonu başlatan aşama sıcaklık olduğundan dolayı önemlidir. Farklı çalışmalarla da sıcaklığın etkisi incelenmiştir. Mosbach ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada L-fenilalanin kalıp molekülü üzerinde sıcaklığı incelemişlerdir. Sıcaklıklar sırayla 60, 40 ve 0°C olarak ayarlanmış ve düşük sıcaklıkta hazırlanan polimerlerin daha iyi seçicilik gösterdiği görülmüştür (Sellergren vd., 1994). Piletsky ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada da çözücü ve hedef molekül gibi bileşenlerde bellekleme olabileceği gibi sıcaklık gibi bir faktörün de belleklenebileceği ispat edilmiştir (Haginaka vd., 1998).

1.1.6 MIP’nin oluşturulması

Başarılı şekilde bir baskılama yapmak için bazı şartlar gereklidir. Baskılamayı etkileyen faktörler;

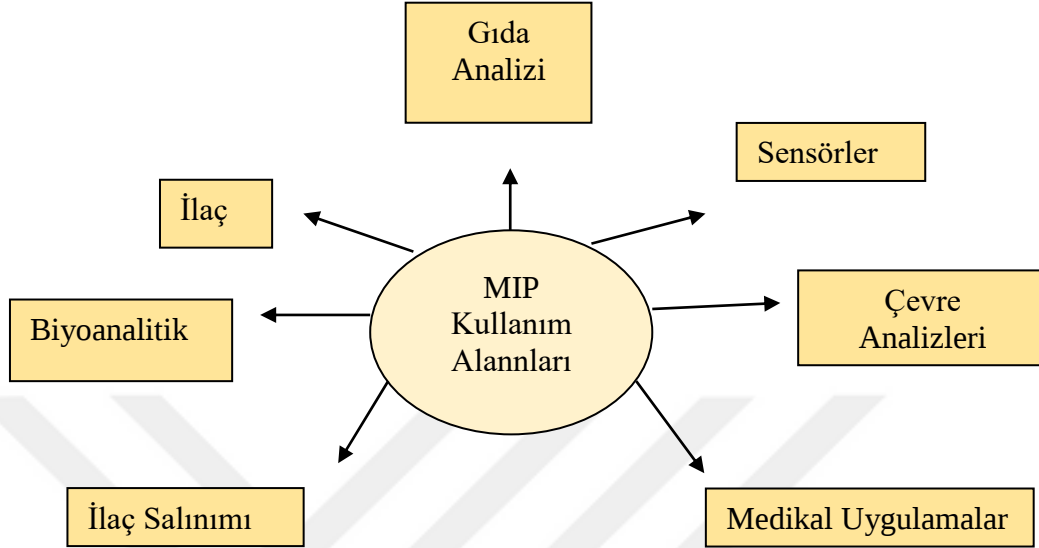
- a) Kalıp molekül ile fonksiyonel monomer oranı
- b) Fonksiyonel monomerin asidik ya da bazik karakterde olması
- c) Kullanılan çözücü seçimi
- d) Çapraz bağlayıcının miktarı ve oranı
- e) Kalıp molekül ve oluşan polimerin konformasyonu

Polimerizasyon sırasında dikkat edilmesi gereken en önemli aşama monomer-kalıp molekül oranının ayarlanmasıdır. Bu aşamada kalıp molekülün derişiminin monomer derişiminden fazla olması polimerizasyonda istenmeyen non kovalent etkileşimleri arttırırken düşük bir oranda kalıp molekül monomer kompleksleşerek uygun bağlanma bölgeleri oluşturur. En uygun monomer kalıp molekül oranı deneysel yollarla bulunabilmektedir. Başarılı bir polimerizasyon ile ilgili yapılan çalışmalarda ortamın dış sıcaklığı 80 °C ölçülmüşken reaksiyon ortamın sıcaklığı 187 °C ölçülmüştür (Mahony vd., 2005).

1.1.7 Moleküler baskılanmış polimerlerin kullanım alanları

Moleküler baskılanmış polimerlerin en sık kullanıldığı alanlar farmakolojik, analitik ve biyolojik seçici moleküler tanıma alanlarıdır (Zhong vd., 2001). MIP’lerin kullanımına yönelik çalışmaların sürekli artmakta olduğu teknikler ise sıvı kromatografi, kapiler elektroferez, katı faz ekstraksiyonudur. Moleküler baskılama

tekniki kullanarak hazırlanan polimerler ise günümüzde iyon seçici absorbanlar olarak başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Yu vd., 1997). Sıklıkla kullanılan alanlar şekil 1.7’de verilmiştir.



Şekil 1.7: Moleküler baskılanmış polimerlerin kullanım alanları

1.2 Serbest radikal (zincir uzaması) polimerizasyonu

Yapısında vinil gurubu gibi aktive edilebilir çift bağ içeren monomerlerin aktif bölgelere hızlı bir şekilde bağlanmasıyla zincir büyümesi şeklinde gerçekleşen yüksek molekül ağırlıklı polimerin oluşması reaksiyonudur. Reaksiyon süresince yüksek molekül kütleli polimer zinciri ve az miktarda da monomer bulunur. MIP’lerin hazırlanması aşamasında monomerin kolay bulunabilir olması ve maliyetinin hesaplı oluşu, ayrıca polimerizasyon koşullarının normal şartlara yani oda sıcaklığı, atmosferik basınçta hazırlanabilir olmasından dolayı serbest radikal polimerizasyonu kullanılır (Okutucu vd., 2007). Serbest radikal polimerizasyonu 3 basamakta gerçekleşir:

a) Başlama: Monomerlerin serbest radikal hale gelmesi aşamasıdır.

b) Zincir uzaması: Monomerlerin aktif bölgelere yani polimer zincirine katılması işlemidir.

c) Reaksiyon sonlanması: Büyümüş polimer zincirinin sonlandığı yani aktifliğini kaybettiği aşamadır.

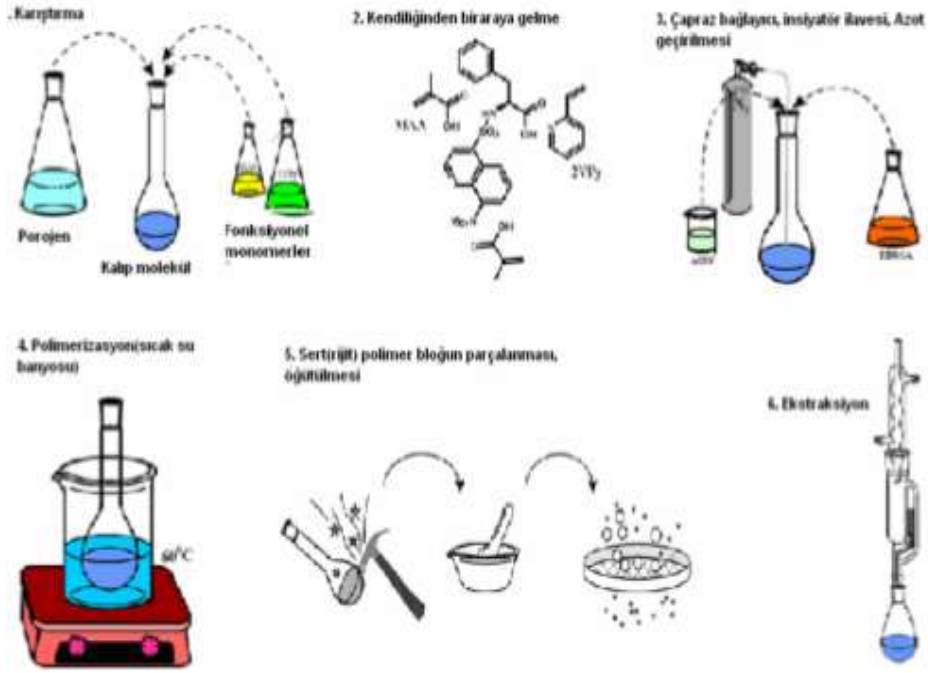
Serbest radikal polimerizasyonunda zincir uzaması adımı başlangıç aşamasına göre daha hızlıdır. Buna bağlı olarak düşük molekül ağırlıklı monomerden yüksek molekül ağırlıklı bir polimer oluşur.

Moleküler baskılama tekniğinde sıklıkla serbest radikal polimerizasyonu kullanılır. Bunun bazı olumsuz tarafları da vardır. Bu polimerizasyonun geri dönüşümsüz olması tek kısıtlayıcı yanındır. Reaksiyon sırasında ya da sonlandığında oluşan hatalar ya da istenmeyen etkileşimler düzeltilemez.

1.3 MIP Hazırlanmasında kullanılan polimerizasyon yöntemleri

1.3.1 Yığın polimerizasyon

Moleküler baskılama teknolojisinde ilk defa kullanılan polimerizasyon yöntemidir (Mosbach ve Ramson, 1996). En basit polimerizasyon türleri arasında sayılabilir. Bu nedenle de moleküler baskılama tekniğinde monolit olarak hazırlanırlar. Fakat bu polimerizasyon yöntemi MIP için çok emek ve zaman gerektiren bir yöntem olduğu için kısıtlamaları da vardır. Monolit olarak hazırlanan MIP işlem görmesi için öğütme ve sonrasında eleme işleminden geçirilir. Bu işlemler de madde kaybına neden olmaktadır. Ayrıca art arda uygulanan bu işlemler parçacık boyutlarında düzensizliğe neden olacağından bu düzensizlik kromatografik uygulamalarda verimsizliğe neden olmaktadır. Bu nedenle bu yöntemin sanayide kullanımı tercih edilmemektedir. Aşağıda ise yığın polimerizasyonun şematik gösterimi vardır (Şekil 1.8).



Şekil 1.8: Yığın polimerizasyonun yapılma aşaması

1.3.2 Süspansiyon polimerizasyonu

Süspansiyon polimerizasyonu sanayide en çok kullanılan polimerizasyon türüdür. Bunun nedeni ise çok büyük miktarlarda polimer üretimine olanak tanınmasıdır. Polimerizasyon sonucu polimerizasyon koşullarına bağlı olarak yaklaşık 100 μm çapında, gözenekli ya da gözeneksiz partiküller oluşturulur. Bu polimerizasyon çeşidinde monomer ve dağıtma olmak üzere iki faz vardır.

Polimerizasyon aşamasında en çok dikkat edilmesi gereken nokta monomerin kullanılacak olan dağıtma fazındaki çözünürlüğüdür. Monomerin dağıtma fazındaki çözünürlüğünün düşük olması beklenir. Bu nedenle hidrofilik monomerler için yağ, petrol eteri gibi hidrofobik sıvılar tercih edilir. Reaksiyon sonunda her monomer damlası bir polimer partikülüne dönüşmektedir.

Bu yöntemin bazı dezavantajları da vardır. Karşılaşılabilecek en önemli sorun ise partiküllerin birbirlerine yapışarak birikmesidir. Bunu engellemek için ortama yani dağıtma fazına partikülleri stabil olarak tutabilecek maddeler eklenir. Oluşan partiküllerin çapı ise ortamın karıştırma hızına bağlı olarak değişiklik gösterir.

1.3.3 Çöktürme polimerizasyonu

Çöktürme polimerizasyonu süspansiyon polimerizasyonu ile tek bir farkla aynıdır. Çöktürme polimerizasyonunda yüzey aktif madde ya da stabilizatöre gerek olmaması aralarındaki farktır. Kurulacak sistem açısından ise yığın polimerizasyon sistemine benzemektedir. İkisi arasındaki fark ise ortama çözücünün fazla miktarda eklenmesidir.

Monomer ile başlatıcı organik fazda bileşerek oligomerleri oluştururlar. Polimerizasyon başladıktan sonra yavaş yavaş mikrojeller oluşmaya başlar ve her bir mikrojel ortamdaki oligomerleri kullanarak yuvarlak düzgün mikrokürecikleri oluşturur.

1.3.4 Basamaklı polimerizasyonu

Birden fazla adımda gerçekleştiği için çok adımlı şişme polimerizasyonu olarak isimlendirilir. İlk defa Hosoya ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır (Hosoya vd., 1994). Basamaklı polimerizasyon fonksiyonel gruplar arasında aşama aşama ilerler. Önce en küçük birim olan monomerler bir araya gelerek dimerleri, dimelerde diğer monomerlerle etkileşerek trimer veya daha büyük yapıları oluştururlar. Polimerizasyon işlemi gerçekleşirken her büyüklükteki molekül polimerizasyona katılabilir ve böylelikle polimerin mol kütlesi artarak polimerizasyon gerçekleşir.

1.4 Polimerlerin karakterizasyon basamakları

Baskılanmış polimerlerin molekülleri tanıyabilmeleri moleküler baskılanmış polimerlerin kromatografisi, sensör ve katalizlerde kullanılabilmesi temeline dayanmaktadır. Baskılanma işlemini doğrulamak için uygulanan farklı yöntemler vardır:

SEM

NMR

FTIR

Parçacık büyüklüğü analizi (Kullanılan çözücünün etkisini belirlemek için yapılan analiz)

Bağlayıcı olan bölgeler

Langmuir izotermi (Farklı dağılım modeli)

Freundlich izotermi (Sürekli dağılım modeli)

Langmuir-Freundlich izotermi

Afinite dağılım analizleri

Nitrojen sorpsiyon analizleri

Gaz izoterm analizi

1.5 Biyomoleküllerin ayrılmasında moleküler baskılamamanın yeri

Moleküler baskılanmış polimerler vücutta bulunan doğal reseptörlerin özelliklerini de taşımaktadır. Bu özellik ise kalıp moleküle spesifik olarak bağlanabilmesidir. Antibadi ve antijen kompleksinden antijenin ayrımı için katı faz yüzeyine antibadi immobilizasyonuna dayanmaktadır. Bu da göstermektedir ki bağlanmada antibadilerin yerine moleküler küresele tanecikler kullanılabilir (Haupt ve Mosbach, 1998). Moleküler baskılanmış polimerlerin antibadilerin yerine kullanılabilirliği ilk defa 1993 yılında gerçekleştirilmiştir (Vlatakis vd., 1993).

Biyomoleküllerin ayrılmasına yönelik yapılan çok farklı çalışmalar da vardır. Bunardan başka bir çalışma da vücudumuzdaki kolesterolün tanınmasına yönelik yapılan araştırmalardır. İlk çalışma kolesterolü baskılamaya yönelik yapılmış ve kovalent baskılama yöntemi kullanılmıştır (Perez vd., 2001).

1.6 Tirosol

1.6.1 Zeytin ve içeriği

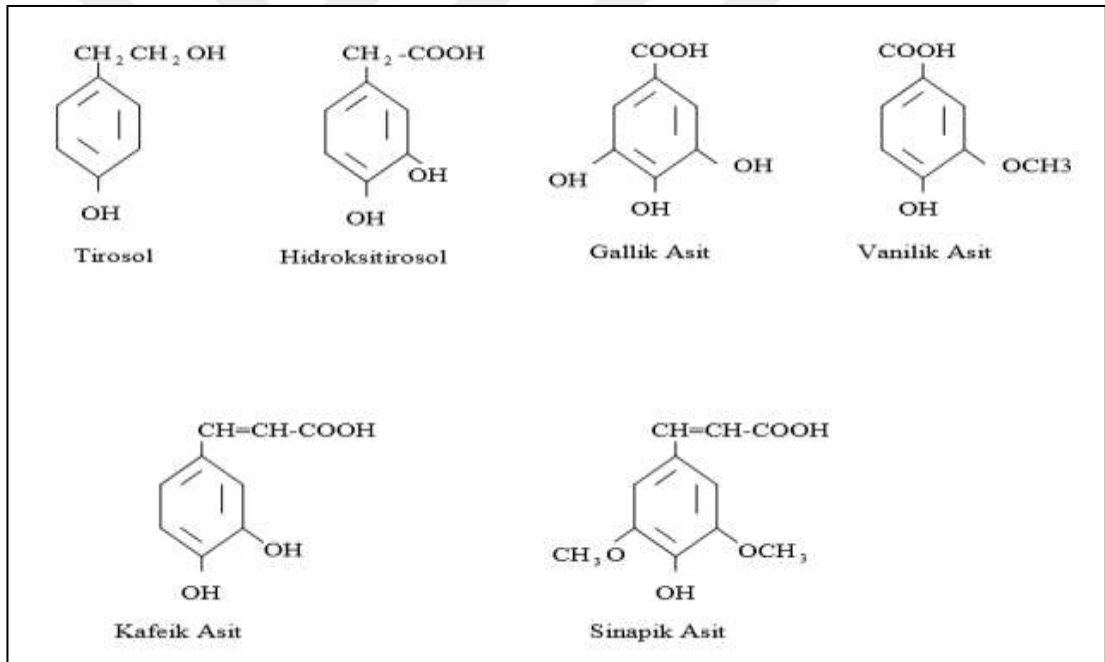
Zeytin (*Olea Europea L.*) Türkiye'nin 4. Sıra üreticiliğini yaptığı bir bitkidir. Son yıllarda da doğal antioksidan madde içeriğinden dolayı araştırma konusu haline gelmiş ve sağlık üzerine olumlu etkileri bulunmuştur (Ersus ve Esen, 2008). Yapılan çalışmalara göre zeytinden elde edilen zeytinyağının koruyucu yağ asidine sahip olduğu ve bunun da özellikle meme kanserine karşı koruyucu ve tedavisinde de etkili olduğu gözlenmiştir (Ramirez vd., 2010). Son zamanların ilgi odağı haline gelmesinin başka bir sebebi ise hipertansiyon üzerindeki olumlu etkisidir (Alonso., 2004).

Zeytinin yapısında çokça fenolik bileşik yer almaktadır. Bunlar şöyledir; tirosol, hidroksitirosol, oleuropein, hidroksitirosol asetat, 3,4-DHPEA-EDA (3,4 dihidroksifeniletanol-elenolik asit dialdehit), 3,4 DHPEA-EA (3,4 dihidroksifeniletanol-elenolik asit). Bu fenolik bileşikleri meme, mide,

kolonkanserine karşı inhibe edici etkisine rastlanmıştır (Menendez vd., 2005). Zeytin yapısındaki fenolik bileşiklerden özellikle bazılarının ise güçlü antioksidan olduğu gözlenmiştir (Owen vd., 2000). Fenolik bileşikler aromatik bir halkaya bir yada daha fazla sayıda hidroksil grubunun bağlanmasıyla oluşan moleküllerdir. Bitkilerde ise genel olarak ester ya da glikozid yapıda bulunurlar.

Zeytin yaprağında da çok önemli fenolik yapılar bulunmaktadır. Bunlardan başlıcaları da şöyledir: tirosol, hidroksitirosol, hidroksitirosol asetat, oleuropein'dir (Bülbül., 2008). Bu fenolik yapılar çok önemli olup hem zeytinin meyvesinde hemde yağında yüksek miktarda bulunmaktadır.

Fenolik yapıların insan sağlığına bilinen faydaları bulunmaktadır. Sağlıklı yaşamayı kalıcı hale getirmek, yaşlanmayı geciktirmek gibi etkileri kanıtlanmıştır (Alkın., 2003). Şekil 1.9'da zeytinin yapısındaki fenolik bileşiklerin moleküler yapıları verilmiştir.

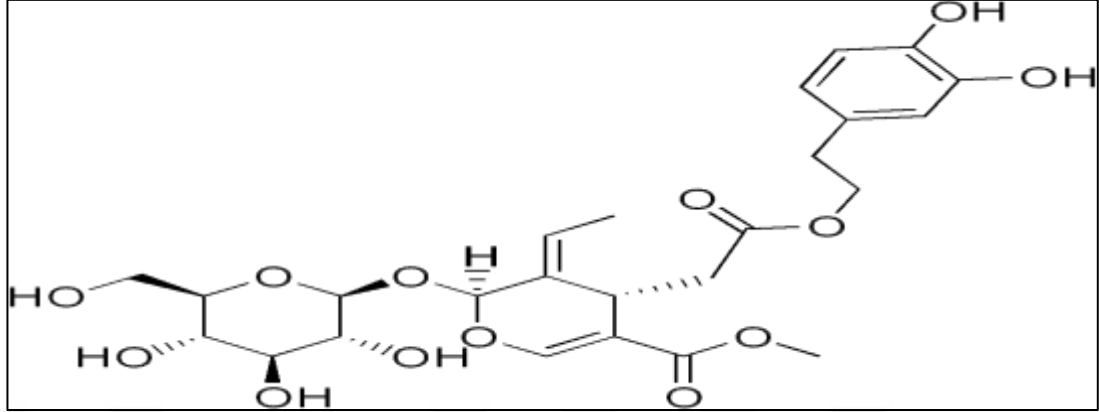


Şekil 1.9: Zeytinin yapısındaki fenolik bileşiklerin moleküler yapıları

1.6.2 Zeytin ve zeytin yaprağındaki başlıca bileşen oleuropein

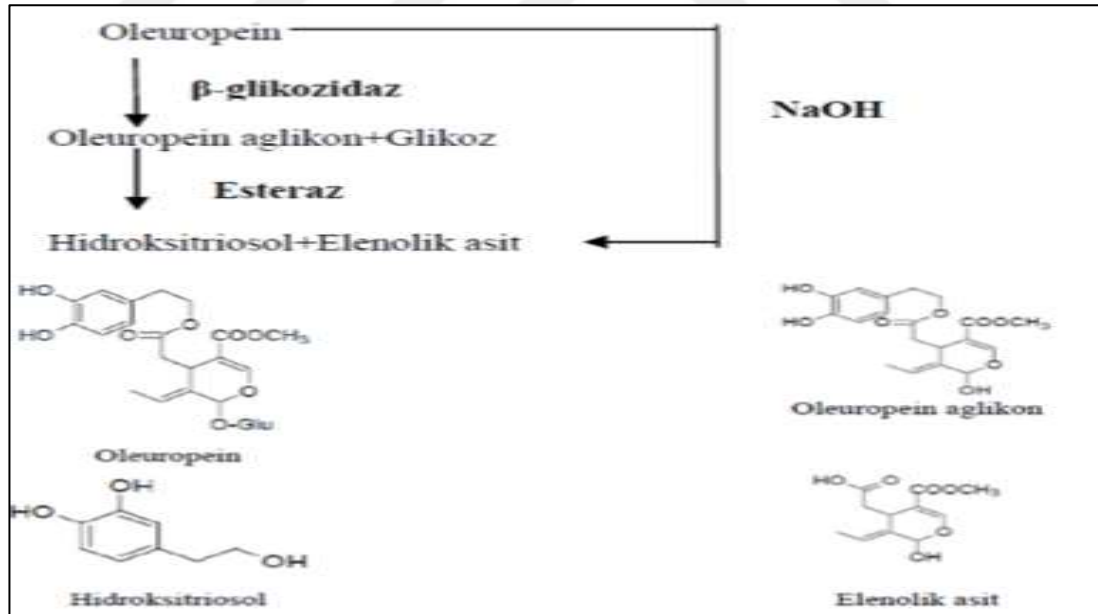
Oleuropein birçok bitkide bulunmakla birlikte zeytin ve bileşiklerinde de bolca bulunan bir yapıdır. Oleuropein (C₂₅H₃₂O₁₃), moleküler ağırlığı 540.51 g/mol olan feenolik bir yapıdır. Moleküler olarak incelendiğinde ise 3 alt gruba ayrılmaktadır. Bunlardan ilk alt yapı birimi 4-(2-hidroksietil) benzen-1,2-diol (hidroksitirizol),

ikinci alt birim molekril elenolik asit ve sonuncusu da glikozdur. Bunlar ise hidroliz yolu ile hidroksitrirosle dönüşmektedirler. Oleuropeinin görevi ise reaktif oksijeni uzaklaştırmaktır (Ersus ve Esen, 2008).



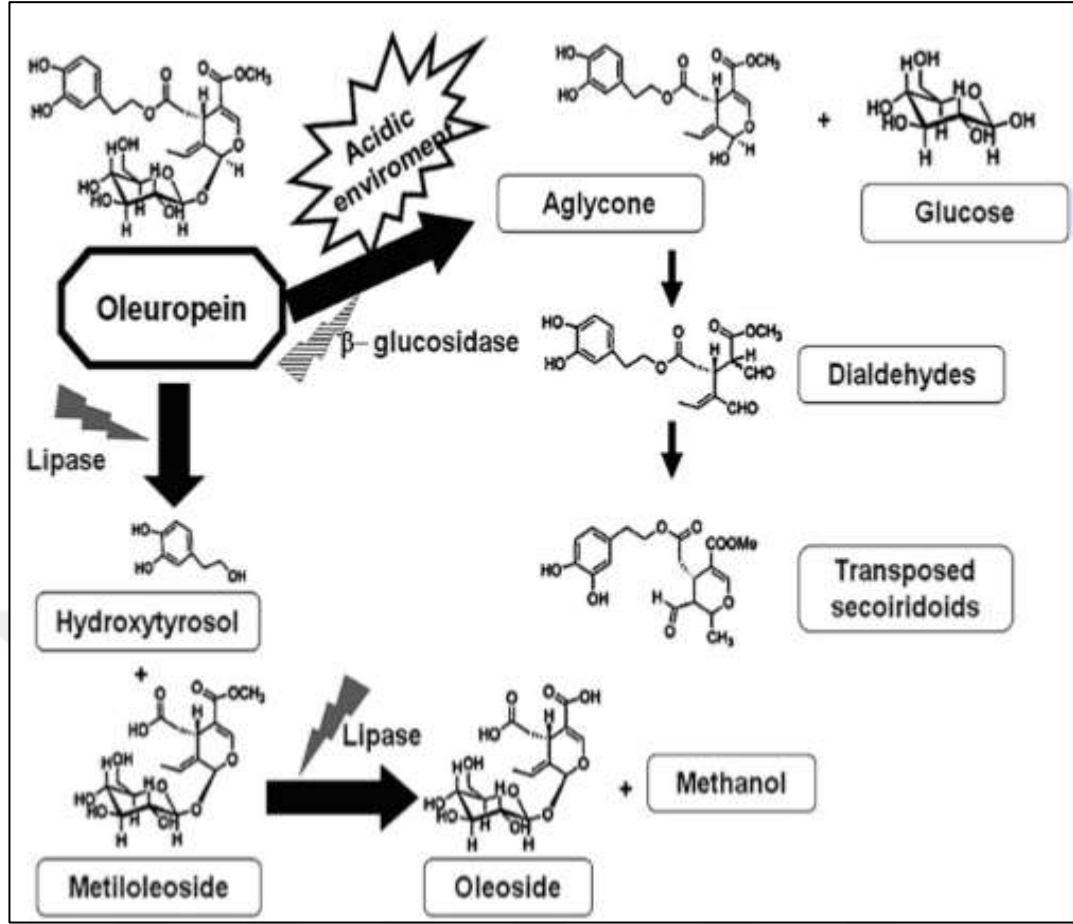
Şekil 1.10: Oleuropein'in moleküler yapısı

Oleuropein vücuda girdikten sonra hidroliz yolu ile oleuropein β -glikozidaz enzim aktivitesiyle glikoz ve oleuropein aglikona parçalanmaktadır. (Şekil 1.11) (Marsillo ve Lanza, 1998).



Şekil 1.11: Oleuropeinin β -glikozidaz enzimi ile hidrolizi

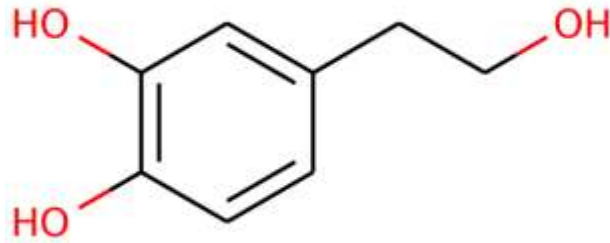
Sonraki aşamada ise esterase enzimi hidroksitrirosol ve elenolik asit oluşmaktadır (Şekil 1.12) (Furneri vd., 2009).



Şekil 1.12: Oleuropeinin vücuda alındıktan sonraki şematik metabolizması
(Furneri vd., 2009)

1.6.3 Hidroksitirozol (HT)

Zeytin ve ürünlerinin yapısında bulunan hidroksitirozol, oleuropeine ve tirosole oranla daha güçlü bir antioksidandır (Tuck vd., 2002).



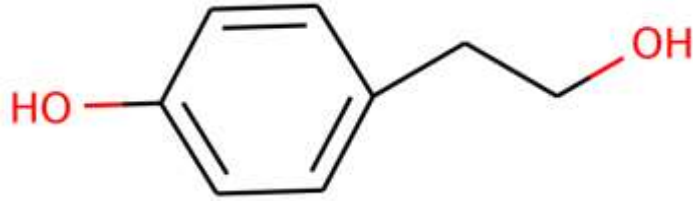
Şekil 1.13: Hidroksitirozolün moleküler yapısı

Zeytin ve zeytin yaprağında yer alan fenolik bileşiklerden hidroksitirozil (HT) vücutta doğrudan tüketildiğinden dolayı daha fazla araştırma konusu haline gelmiştir (Erbay vd., 2008). Yapılan diğer çalışmalar da hidroksitirozolün antikanserojen etkiye sahip

olduğunu göstermekte ve ayrıca tansiyon ve şekeri düşürdüğü de bilinmektedir. Kanser tedavisinde de apoptosisi teşvik ederek timörlü hücrelerin çoğalmasına engel olmaktadır (Alkın., 2003).

1.6.4 Tirosol

IUPAC ismi 4-(2-hidroksietil)fenol olan tirosol zeytinde bulunan önemli fenolik bileşiklerdendir. Önemli bir antioksidan olan tirosol hücreleri yaralanmaya karşı koruyabilir(Giovannini vd.,1999). Zeytin ve yağında bulunan diğer fenolik bileşikler kadar güçlü bir antioksidan olmayan tirosol yine de yüksek konsantrasyonlarda yüksek bir etkiye sahip olacağı görülmektedir (Miro-Casas vd.,2003).



Şekil 1.14: Tirosolün moleküler yapısı

Fareler üzerinde yapılan tirosol çalışmalarında tirosolün strese karşı koruyucu ve kalp için de yaşlanma karşıtı olduğu görülmektedir (Samuel vd.,2008).

Zeytindeki tirosol miktarı zeytinin olgunlaşmasıyla beraber artmaktadır ve zeytindeki tirosol miktarının fazlalığı da zeytinin kalitesini belirlemektedir (Cimato vd., 1990).

2. LİTERATÜR ÖZETLERİ

Odabaşı vd., (2007); yumurta beyazındaki lizozimi saflaştırmak amacı ile lizozim baskılanmış polimerler hazırlamışlardır. İlk aşamada yığın polimerizasyon yöntemi kullanılarak lizozim baskılanmış polimer elde etmişler ve daha sonra lizozimi NaCl çözeltisi kullanılarak polimerden uzaklaştırmışlardır. Polimerizasyonda N-methacryloyl-(L)-histidine metil ester (MAH) monomer, etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) ise çapraz bağlayıcı olarak kullanılmıştır. Yaptıkları çalışmanın sonucuna göre maksimum lizozim adsorpsiyonu 12,1 mg/g polimerdir. Lizozim baskılanmış polimerlerin adsorpsiyon kapasiteleri önemli ölçüde düşmemekte ve birçok kez kullanılabilir.

Hwang ve Lee (2002); kolestrol baskılanmış polimerleri kovalent ve non kovalent olarak hazırlamışlardır. Çalışmalarında yığın polimerizasyon yöntemini kullanmışlar ve kovalent baskılanmış polimerlerin hazırlanmasında EGDMA, AIBN ve kolesteril(4-vinil) fenil karbonat kullanmışlardır. Kovalent olmayan baskılama yönteminde ise metakrilik asit ve monomer olarak 4-vinil piridin kullanarak polimerler hazırlanmıştır. Yaptıkları çalışmanın sonucuna göre ise kovalent baskılama yöntemine göre hazırlanan polimerlerin kolestrol saflaştırılmasında elde ettikleri seçicilik kovalent olmayan baskılamaya göre daha fazla olmuştur. Yani kovalent baskılama tekniği ile hazırlanan polimerler kolestrolü daha fazla tutmaktadır.

Chandramohan vd., (2014); fenolik bileşik olan tirozolün diyabetik sıçanlarda hiperglisemiye olan etkilerini araştırmak için çalışmalar yapmışlardır. Yapılan çalışmada farklı ağırlıktaki deney sıçanlarına 45 gün boyunca, günde birer defa tirozol uygulanmıştır. 45 günün sonunda diyabetik olarak kontrol edilen sıçanlar, plazma glukoz ve glikozlu hemoglobinde önemli bir artış göstermekle birlikte, plazma insülinde toplam hemoglobin ve vücut ağırlığında da önemli derecede düşüş görülmüştür. Tirozolün 20 mg/kg vücut ağırlığına göre uygulanması diğer iki doz oranına göre en yüksek ve gözle görülür etkiyi sağlamıştır. Yapılan çalışmanın sonucuna göre tirozol antioksidan etkisi ile hiperglisemiyi azaltmaktadır.

Eduardo ve Juristo (2016); atık zeytinyağından hidroksitirosol saflaştırılması ve etkilerini araştırmışlardır. HT, hafif hiperlipidemi hastalarına 8 hafta boyunca günlük 45mg dozunda uygulamışlardır. Kardiyovasküler hastalık riskini, hematoloji, antioksidan parametreleri, vitamin ve minarel değerlerini başlangıçta (T0), 4 hafta sonra (T4), 8 hafta sonra (T8) ölçmüşlerdir. T4 ve T8’ de alınan değerleri başlangıca göre kıyaslamışlar ve değerlendirmişlerdir. Uygulanan HT dozunun güvenli olduğu ve çoğunlukla kardiyovasküler hastalık, kan lipidleri, karaciğer veya böbrek fonksiyonlarını etkilemediği sonucuna varmışlardır. Serum demir seviyeleri sabit kalırken T4 ve T8 ölçümlerinde anlamlı azalmalar tespit etmişlerdir ($p<0,005$). Kırmızı kan hücresi folat düzeylerinin T4 ve T8’de azaldığı görülmüş ve C vitamini miktarının başlangıca göre iki kat arttığı tespit edilmiştir. Deneysel sonuçlara göre ise HT’ün C vitamini seviyesini arttıran bir antioksidan olduğu görülmüştür.

Andaç vd., (2004); iyon baskılanmış polimerler üzerine çalışmalar yaparak insan plazmasındaki fazla miktarda bulunan Cd(II) iyonlarını uzaklaştırmayı hedeflemişlerdir. Yaptıkları çalışmada maksimum adsorpsiyon kapasitesini 32.5mmol olarak tespit etmişlerdir.

Bu vd., (2006); deney hayvanları üzerinde tirosolün nöroprotektif etkisini araştırmışlardır. Çalışmalarında geçici orta serebral arter oklüzyon sıçan modelini (oklüzyon 2 saat, reperfüzyon 22 saat) kullanmışlardır. İskemi sonrası tirosolün infarkt hacmi üzerine etkileri araştırılmış ve 30mg/kg tirosol ile muamele edilen sıçanlarda %64,9 oranında nöroprotektif etki gösterdiğini saptamışlardır. Saptanan bulgulara göre tirosol, duyuşal motor disfonksiyona karşı koruyucu etkiler göstermiştir. Youngmin ve arkadaşlarına göre tirosol inme ve tedavisinde kullanılmaya aday bir bileşiktir.

Bakas vd., (2012); tarafından yapılan çalışmada zeytinyağında bulunan methidathion’un ekstraksiyonu için baskılanmış polimerler hazırlanmıştır. Monomer olarak N,N'-metilenbisakrilamid (MBAA), çapraz bağlayıcı olarak ise etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) kullanmıştır. Sentezlenen polimerler katı faz tutucu olarak görev yapmış ve daha sonra çözeltiler HPLC-UV ile analiz edilmiştir. Sonuçlara göre ise methidathion molekülünün ekstraksiyon için tayin sınırı 0,1 ppm olarak bulunmuş ve gözlenebilme sınırı ise 0,002 ppm olarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre moleküler baskılanmış polimerlerin methidathion için

HPLC’de C18 kolonuna göre etkin olduğu ve daha verimli sonuçlar elde edildiği görölmüşür.

Dai vd., (2013); fonksiyonel monomer olarak 2-vinilpiridin kullanılan bir çalışmada iki farklı molekül baskılanmıştır. Kalıp molekül olarak karbamazepin (CBZ) ve klofibrik asiti (CA) kullanılmıştır. Çift kalıplı baskılanmış polimerler çöktürme polimerizasyonu yöntemi ile sentezlemiş ve çalışılmıştır. Moleküler baskılanmış polimerlerin sonuçları Freundlich izoterm modeline uygun bulunmuştur. Adsorpsiyon deney sonuçlarına göre ise MIP’lerin karbamazepin ve klofibrik asite karşı seçici davrandığı bulunmuştur. Sentezlenen baskılanmış polimerlerin göz suyu, baraj suyu gibi örneklerinden CBZ ve CA’nın geri kazanımı için çalışmalar yürütölmüşür.



3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1 Malzemeler

Deneyde kullanılan kalıp molekül tiroso1 (4-(2-Hidroxyethyl) pohenol), çapraz bağlayıcı olan etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) (%98), özücü ve esorpsiyon ajanı olarak kullanılan metanol ve başlatıcı olarak kullanılan benzoil peroksit (BPO) Sigma Aldrich firmasından temin edilmiştir. Monomer olaak kullaılan metakrilik asit Alfa Aesar firmasından sağlanmıştır. Seçimli adsorpsiyon için kulanılan pyrogallol ve 2-nitro-1naphthol Merck firmasından temin edilerek kullanılmıştır. Tampon özelti ve yıkama ajanı olarak saf su kullanılmıştır. Saf su yüksek akışlı selüloz asetat membran (Barnstead D2731) ile ters ozmoz Barnstead (Dubuque, IA) ROpure LP® birimi ve ardından Barnstead D3804 NANOpure® organik/kolloid uzaklaştırma birimi ve iyon değiştirici dolgulu kolon sistemi kullanılarak saflaştırılan sistemden kullanılmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Tiroso1 molekülünün (kalıp molekül) dalga boyunun belirlenmesi

Tiroso1 molekülü ile sulu ortamda ve nicel bir analiz yapılacağı için çalışılacak dalga boyunun belirlenmesi önemli bir yere sahiptir. alışmalar boyunca kullanılan saf su ile tiroso1 çözeltisi hazırlanarak UV-VIS spektrofotometresinde (Shimadzu, Tokyo, Japonya, Model 1601) 190 nm ile 500 nm dalga boyu aralığında tarama yapıldı. Tiroso1 özeltisinin adsorpsiyon taramasında adsorpsiyon değerleri dalga boyuna karşı grafiğe geçirildi ve adsorpsiyon spektrumu çıkarıldı. Buna göre maksimum dalga boyu belirlendi ve sonraki aşamalarda belirlenen maksimum dalga boyu kullanıldı.

3.2.2 Tiroso1 molekülünün kalibrasyon doğrusunun belirlenmesi

Kalibrasyon doğrusunun belirlemesi, çalışmanın gidişatı için oldukça önemlidir. 1M, 0.75M, 0.5M, 0.25M, 0.125M ve 0.0625M olarak hazırlanan standart tiroso1

çözeltileri dalga boyu taramasında belirlenen maksimum dalga boyunda, UV-VIS spektrofotometresinde (Shimadzu, Tokyo, Japonya, Model 1601), 1:10 seyreltme oranına göre okutuldu. Okunan adsorbans değerleri standart çözeltilerin bilinen derişimlerine karşı grafiğe geçirildi ve kalibrasyon doğrusu elde edildi.

3.2.3 Tirosol baskılanmış polimerlerin hazırlanması

Polimerizasyonda *Yığın Polimerizasyon* yöntemi uygulandı. Kalıp molekül olarak kullanılan 1 mg tirosol, 0,521 mL metanolde çözüldü ve 0,197 µL metakrilik asit monomeri bu çözeltiye ilave edilerek metakrilik asit-tirosol moleküllerinin ön kompleksinin oluşması sağlandı, ardından çağraz bağlayıcı olarak 1,174 µL etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) bu karışıma ilave edildi. Başka bir tüpte başlatıcı olarak kullanılan 70 mg benzoil peroksitin (BPO) 3 mL metanolde çözünmesiyle hazırlanan çözeltinin de polimerizasyon çözeltisine ilavesinden sonra toplam karışım 5 mL'lik şırıngaya alındı ve 80°C sıcaklıkta sonikatörde 40 dakika boyunca bekletilerek polimerizasyonun tamamlanması sağlandı (Şekil 3.1). Sert olarak elde edilen polimer, şırıngadan dikkatlice kesilerek alındı. Elde edilen silindirik şeklindeki polimer eşit büyüklükte olmasına dikkat edilerek kesici yardımı ile 3 ayrı parçaya kesildi. Bu polimerlerin ağırlıkları tartılarak hesaplamalarda kullanmak üzere not edildi. Eş büyüklükteki polimerler hazırlandıktan sonra reaksiyona girmeyen monomer ya da çözücüyü ortamdan uzaklaştırmak için bir dizi yıkama işlemi gerçekleştirildi. 2 gün boyunca saf su ile yıkama işlemi ve ardından saf su/metanol karışımı (%50) ile yıkama işlemi gerçekleştirilerek ortamdaki istenmeyen maddelerin uzaklaştırılması sağlandı.

Trizol baskılanmamış polimerlerin yapılmasında ise ortamda kalıp molekül tirozolun bulunmadığı polimerizasyon işlemleri, olduğu gibi gerçekleştirildi.



Şekil 3.1: Polimerizasyon işlemi tamamlanmış polimer

3.2.4 Polimerden kalıp molekül tirosol'ün uzaklaştırılması

Hazırlanıp eş büyüklükte kesilen polimerler 2 gün boyunca saf su ile yıkanarak safsızlıklardan arındırıldı. Ardından kalıp molekülü uzaklaştırmak için iki farklı yol izlendi. Eş polimerlerden birine kalıp molekülü uzaklaştırmak için 1 M NaCl çözeltisi, diğer polimere metanol/su karışımı uygulandı. Çalışmalar sonucunda uygun desorpsiyonda ajanının metanol/su (%50) karışımı olduğu spektrofotometrik olarak tespit edildi.

3.2.5 Sulu ortamdan tirosol adsorpsiyon denemeleri

Sulu ortamda tirosol adsorpsiyonuna pH, derişim, sıcaklık ve iyonik şiddetin etkileri araştırıldı. Adsorpsiyon denemeleri 25°C'da çalkalayıcı su banyosunda, pH 6'da (0,001 M fosfat) ve başlangıç derişimi 1 mg/mL olan 5 mL'lik tirosol çözeltisi ile 30 dakikalık bir sürede gerçekleştirildi. Ölçümler 5'er dakika ara ile 228 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak okundu. Yıkama işlemi için 25 mL yıkama çözeltisi kullanıldı. Çalışmalar boyunca desorpsiyon ajanı olarak su/metanol (%50, v/v) karışımı kullanıldı. Adsorpsiyon çalışmaları kesikli sistem ile çalışıldı ve bu nedenle eş zamanlı çalışmalar yapıldı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2:Kesikli sistem ile eş zamanlı çalışmalar

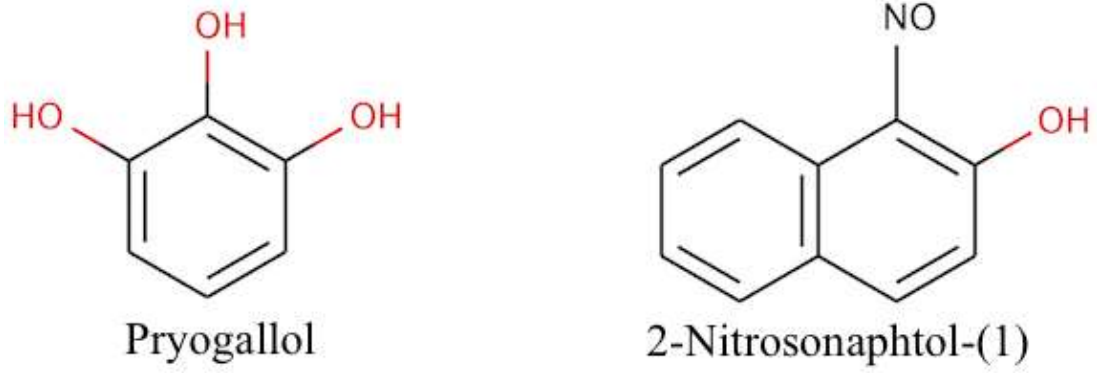
Adsorpsiyon çalışmaları için ortam pH'sının etkisi pH 5 (0,001 M asetat), 6 ve 7 (0,001 M fosfat) tamponlarında çalışıldı. Tirosol başlangıç derişiminin adsorpsiyona etkisi için 0,001-2 mg/mL aralıkları incelendi. Sulu ortamdan tirosol adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi araştırılırken 5°C-35°C sıcaklık aralığı çalışıldı. İyonik şiddetin adsorpsiyona etkisini incelemek için ise 0,025M-0,5 M aralıkta NaCl içeren çözeltiler kullanıldı. Adsorplanan tirosol miktarı aşağıdaki eşitlikle hesaplandı:

$$Q = (C_0 - C) \times V / m \quad (3.1)$$

Eşitlikte Q birim polimere adsorbe olan tirozol miktarı ($\mu\text{mol/g}$); C_0 ve C başlangıç ve sonuç çözeltilerdeki tirozol derişimlerini (mM). V sulu fazın hacmi (mL); ve m kullanılan polimerin ağırlığıdır (g).

3.2.6 Seçimli adsorpsiyon çalışmaları

Tirosol baskılanmış polimerlerin tirosole karşı seçiciliğinin belirlenmesi için yapıcı tirosole benzerlik gösteren iki farklı molekül olan pyrogallol ve 2-Nitrosonaphtol-(1) molekülleri ile de çalışıldı (Şekil 3.3). Her iki molekül için dalga boyu taraması yapılarak maksimum adsorpsiyon gösterdiği dalga boyu tespit edildi ve farklı derişimlerde moleküllerin çözeltileri hazırlanarak kalibrasyon doğruları çıkarıldı. Aynı ayrı 0,5mg/mL' lik çözeltileri ile aynı koşullarda adsorpsiyon gerçekleştirildi ve değerlendirmeler yapıldı.



Şekil 3.3: Pryogallol ve 2-Nitrosonaphtol-(1) moleküllerinin yapıları

3.2.7 Desorpsiyon işlemleri ve tekrar kullanılabilirlik

Polimerden tirosolün desorpsiyon işlemleri için metanol/su karışımı kullanıldı. Yapılan tüm taramalardan sonra desorpsiyon işlemi sırasında tirosol miktarı 228 nm dalga boyunda UV-VIS Spektrofotometre ile ölçülerek belirlendi. Desorpsiyon oranını hesaplamak için ise denklem 3.2 kullanıldı.

$$\%Desorpsiyon = \frac{Desorpsiyon ortamındaki tirosol}{Adsorplanan tirosol} \times 100 \quad (3.2)$$

Desorpsiyon işleminden sonra polimerin tekrar kullanılabilirliği için saf su ile yıkama yapıldı.

3.3 Polimerin karakterizasyon çalışmaları

3.3.1 Baskılanmış ve baskılanmamış polimerlerin şişme testleri

Tirosol baskılanmış ve baskılanmamış polimerlerin şişme değerleri saf su ortamında değerlendirilmiştir. Kuru haldeki ağırlıkları alınan belirli bir miktardaki polimerler 5 mL saf su içeren bir petride 25°C de, her 10 dk' da bir ağırlıkları tartılarak bekletildi. Son 3 tartımda sabit değere ulaşıncaya test sona erdirildi. Tartımla virgülden sonra 4 sayısal terazi ile yapıldı. Polimerlerin su içerikleri aşağıdaki denklem ile hesaplandı:

$$\text{Şişme oranı (\%)} = [(W_s - W_0)/W_0] \times 100 \quad (3.3)$$

Burada; W_0 : partiküllerin kuru ağırlığı (g) W_s : partiküllerin şiştikten sonraki ağırlığını (g) vermektedir.

3.3.2 Baskılanmış ve baskılanmamış polimerlerin yüzey alan ölçümleri

Tirosol baskılanmış ve baskılanmamış polimerlerin yüzey alanları azot adsorpsiyonu ile BET cihazı kullanılarak (Quantochrome SI, Automated Surface Area and Pore Size Analyzer, Quantochrome, ABD) belirlendi. Belirli bir miktardaki kuru polimer örneğinin 150°C’da gözeneklerindeki gazı uzaklaştırıldı. Daha sonra örnek haznesindeki polimerik yapılara -196°C’da N₂ adsorpsiyonu, oda sıcaklığına ise desorpsiyonu gerçekleştirildi ve bu aşamada elde edilen sayısal değerler baskılanmış ve baskılanmamış polimerlerin yüzey alanı ölçümlerinde kullanıldı.

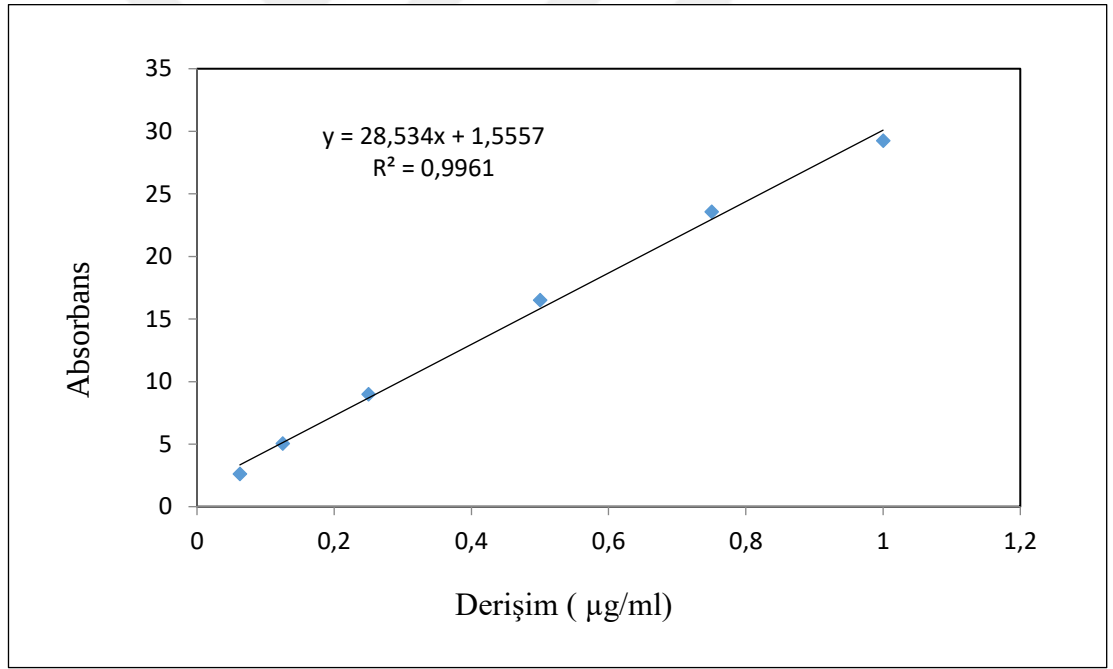
3.3.3 Polimerlerin taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizleri

Tirosol baskılanmış ve baskılanmamış polimerlerin yüzey morfolojileri taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak incelendi. Örnekler hazırlanırken polimerler önce suda bekletilerek şişirildi, daha sonra %98’ lik etanolde bekletilerek alkolün polimer içine difüzyonu ile su ve alkolün yer değiştirmesi sağlandı. Son olarak, alkolde bekletilen polimer 50°C’ da vakum etüvde kurutularak alkolün hızlı buharlaşması sağlandı ve geriye ezilmeden iç yapısını koruyan kuru polimerler elde edildi. Elde edilen polimerler vakum altında altın-palladyum (40:60) ile kaplatıldıktan sonra, taramalı elektron mikroskobu (EVO LS 10 ZEISS, Japonya) ile incelendi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Tirosol molekülünün dalga boyunun belirlenmesi ve kalibrasyon doğrusu

UV-VIS Spektrofotometre ile yapılan ölçümler için saf su kullanılarak hazırlanan tirosol çözeltisinin maksimum adsorpsiyon yaptığı dalga boyunun belirlenmesi aşamasında, hazırlanan standart çözeltiler kullanılarak 190-300 nm aralığında tarama yapıldı ve maksimum adsorpsiyonun gerçekleştirdiği dalga boyu 228 nm olarak tespit edildi. Elde edilen maksimum dalgaboyunda farklı derişimler için absorbans değerleri alınarak kalibrasyon doğrusu çizildi (Şekil 4.1)



Şekil 4.1: Tirosol için kalibrasyon denklemleri ve doğrusu

4.2 Baskılanmış ve baskılanmamış polimerlerin şişme testleri

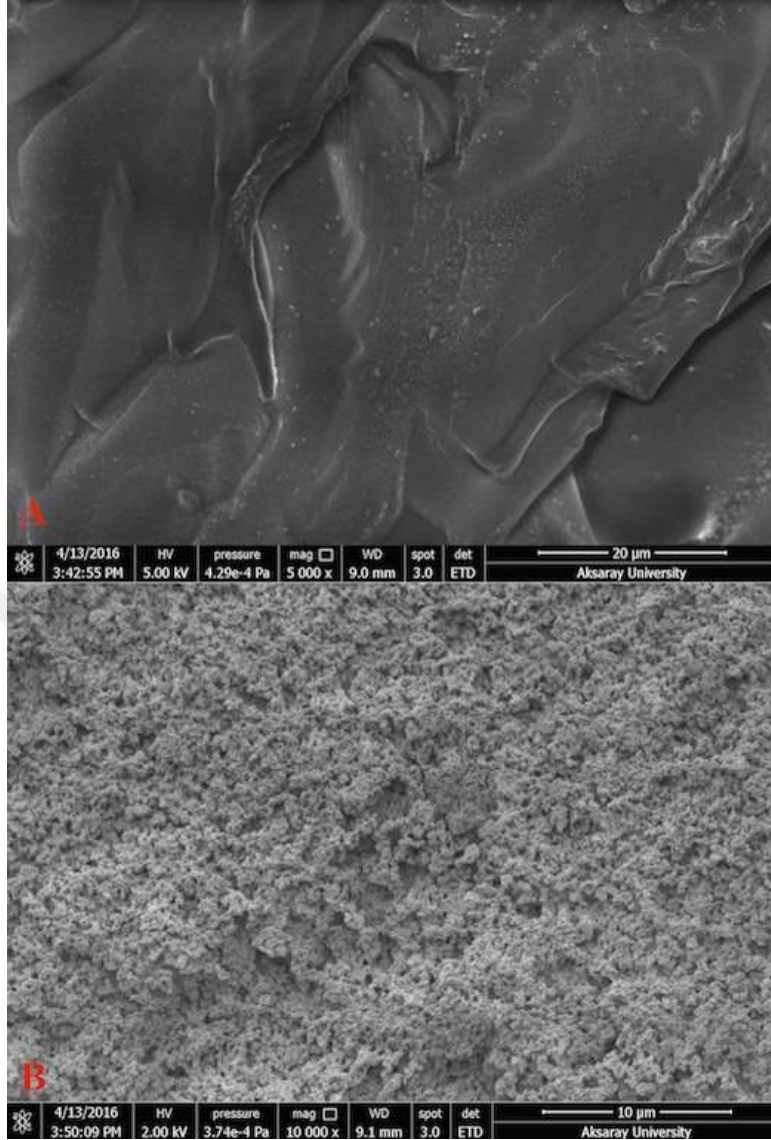
Tirozol baskılanmamış ve baskılanmış polimerlerin sudaki şişme davranışları da incelenmiş ve tirozol baskılanmış polimerlerin yüzde şişme değerleri %185, baskılanmamış polimerlerinki ise %89, olarak bulunmuştur. Sonuçlardan, baskılanmış polimerlerin su alma kapasitelerinin daha fazla olduğu görülmektedir. Baskılanmış polimerlerde moleül desorbe edildikte sonra oluşan boşluklar su molekülleri ile dolmaktadır. Bu durum, baskılanmış polimerlerin su alma kapasitelerini arttırmaktadır.

4.3 Baskılanmış ve baskılanmamış polimerlerin yüzey alan ölçümleri

Yüzey alan ölçümleri gerek moleküler baskılanmış polimerler gerekse genel adsorbenler için incelenmesi gereken önemli parametrelerdir. Bu parametre hem tirozol baskılanmış hem de baskılanmamış polimerler için incelenmiş ve baskılanmış polimerler için 35,7 m²/g, baskılanmamış polimerler için ise 14,1 m²/g olarak bulunmuştur. Aradaki fark ise moleküler baskılanmış polimerlerdeki molekül boşluklara atfedilebilir.

4.4 Tirozol baskılanmış ve baskılanmamış polimerlerin SEM analizleri

Tirozol baskılanmış ve baskılanmamış polimerlerin taramalı elektron mikroskopu (SEM) görüntüleri incelenmiş ve Şekil 4.2’de verilmiştir. Şekil 4.2A baskılanmamış polimerlerin yüzey morfolojisini gösterirken, Şekil 4.2B’ de ise tirozol baskılanmış polimerlerin morfolojisii göstermektedir. Şekiller arası farktan açıkça görülmektedir ki, baskılanmış polimerler gözenekli bir yüzeye sahiptirler. Bu gözenekli yapı, difüzyon kısıtlamasını minimize ederek, kütle transfer direncini düşürmekte ve gözeneklerden dolayı artan yüzey alanı nedeniyle konvektif kütle taşınımı kolaylaşmaktadır.



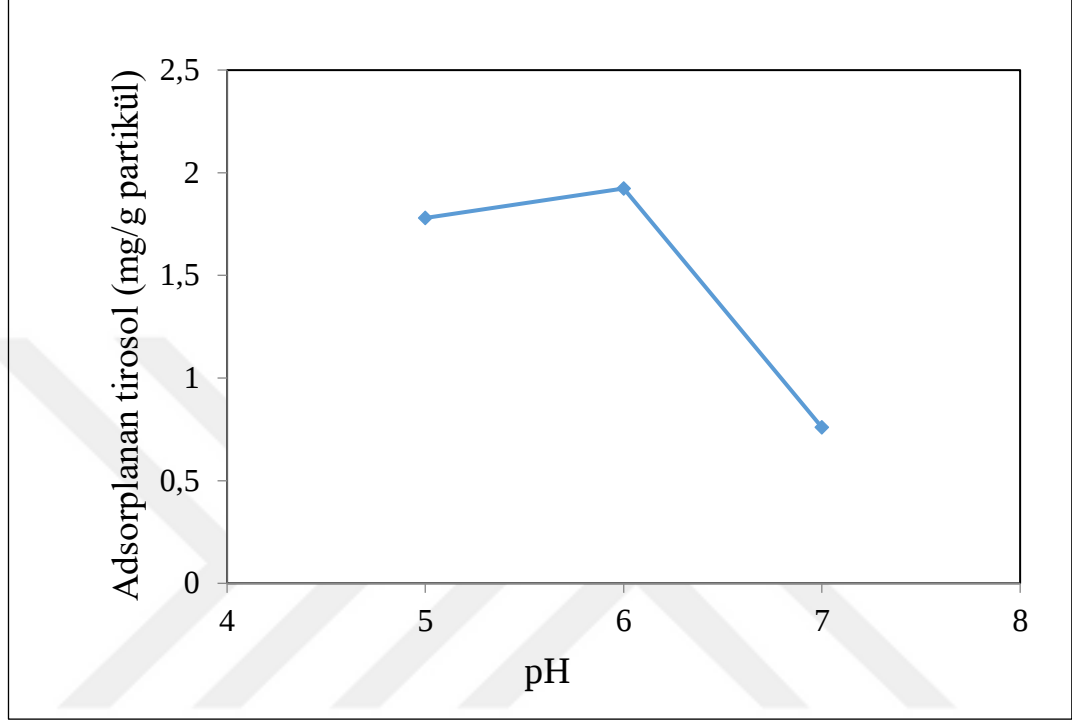
Şekil 4. 2:Tirosol baskılanmış (A) ve baskılanmamış polimerlerin (B) SEM görüntüleri

4.5 Baskılanmış polimerlerin tirosol adsorpsiyon çalışmaları

4.5.1 pH etkisi

Tirosol baskılanmış polimerlere tirosol molekülünün bağlanma miktarlarının pH' ya bağlılığını ölçmek için pH 5 (0,001 M asetat), 6 ve 7 (0,001 M fosfat) tamponlarında çalışıldı. Şekil 4.3'te baskılanmış polimerlerde tirosol adsorpsiyonuna pH' nın etkisine yönelik çalışmanın grafiği verildi. Şekilden de görüleceği gibi maksimum adsorpsiyon pH 6' da gerçekleşmiştir. Bu pH' nın öncesinde ve sonarsında adsorpsiyonda düşüşler gözlenmiştir. MIP çalışmalarında genelde polimerizasyonun gerçekleştiği ortam şartlarında hafıza etkisinden dolayı

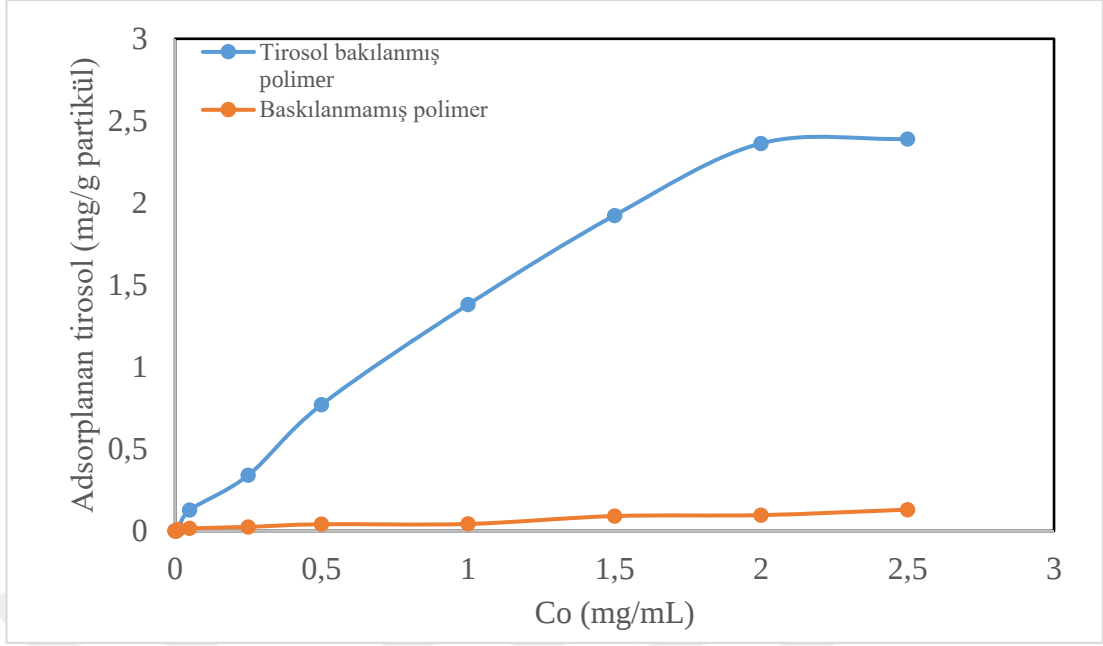
maksimum adsorpsiyon gerçekleştiğinden dolayı bu pH’ da maksimuma ulaşılmıştır (Yu ve Mosbach, 1997). Maksimum adsorpsiyonun bulunduğu bu pH’ da tirosol molekülünün yüklenmesine bağlı olarak polimere non-kovalent bağlanma etkisi de maksimumdur.



şekil 4.3: Tirosol adsorpsiyonuna pH’nın etkisi (Co: 1 mg/mL,T: 25°C)

4.5.2 Tirosol başlangıç derişiminin etkisi

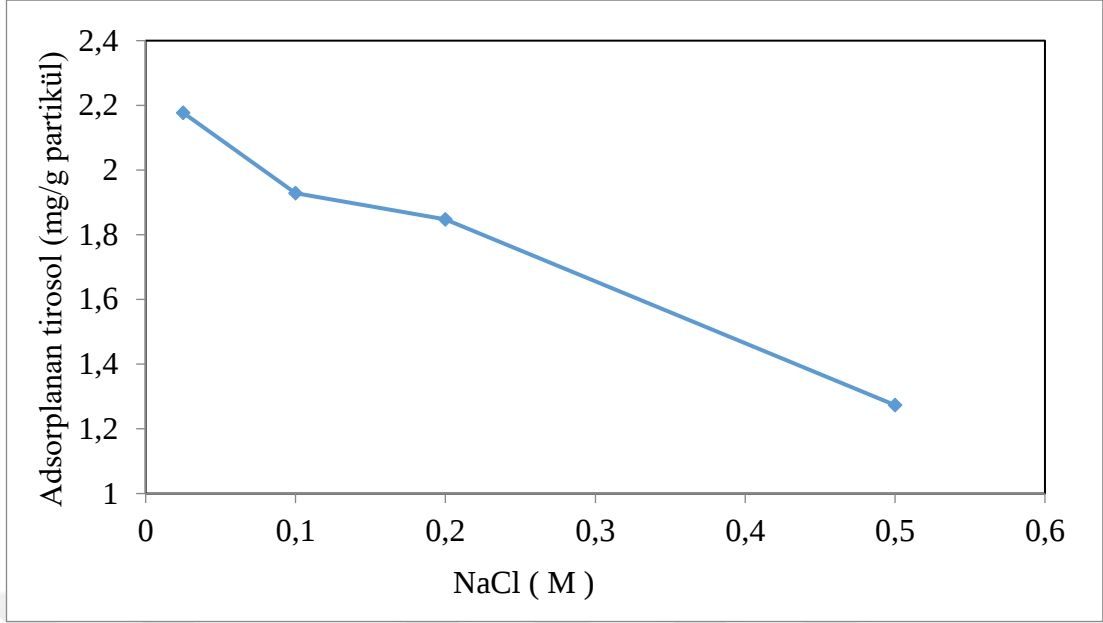
şekil 4.4’ de, tirosol baskılanmış ve baskılanmamış polimerlere tirosol adsorpsiyonuna başlangıç derişiminin etkisi verilmiştir. şekilden de görüleceği gibi baskılama yapılmamış polimerde tirosol adsorpsiyonu 2,5 mg/mL’ lik başlangıç derişiminde 0,13 mg/g olurken, baskılanmış polimere olan spesifik adsorpsiyon 2,39mg/g partikül’e çıkmaktadır. Deneysel verilere göre tirosol baskılanmış polimerlere, 2 mg/mL’lik başlagıç tirosol derişiminde platoya ulaşılmış ve bağlanma aktif bölgelerinin doğgunluğundan dolayı dengeye ulaşmıştır.



Şekil 4.4: Tirosol adsorpsiyonuna başlangıç derişiminin etkileri (pH:6 (0,001 M fosfat), T: 25°C)

4.5.3 Tirosol adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi

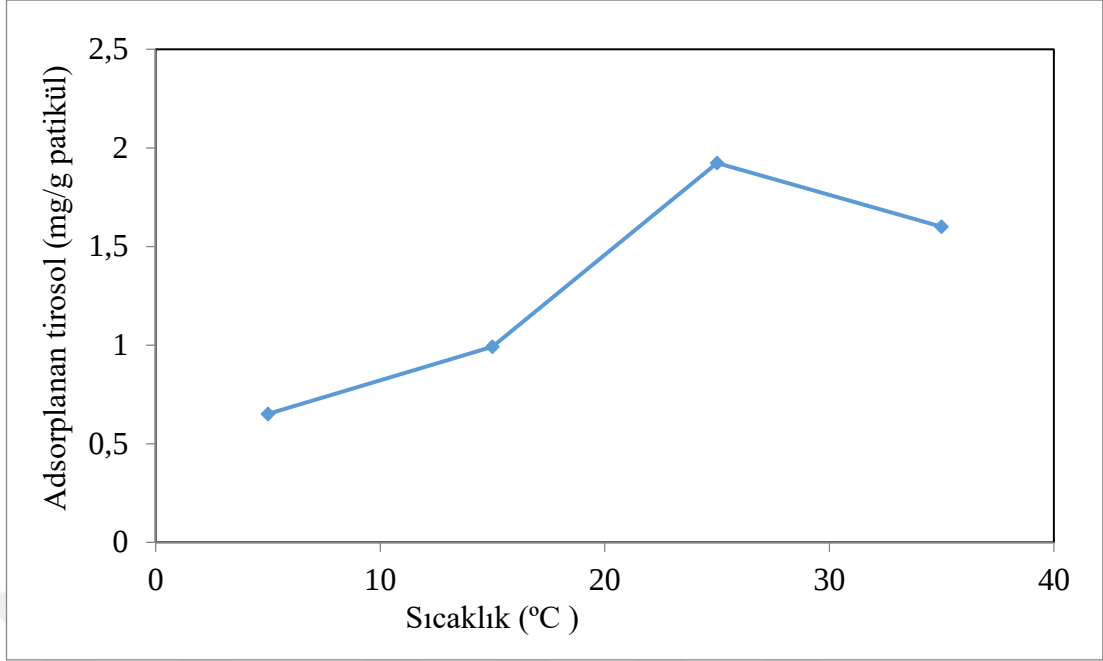
Baskılanmış polimerlerde tirosol adsorpsiyonuna iyonik şiddetin (NaCl) etkileri incelenmiş ve sonuçlar Şekil 4.6'da verilmiştir. Şekilden de açıkça görüldüğü gibi iyonik şiddetin artması ile birlikte adsorpsiyon kapasitesi düşmektedir. Bu durum, NaCl miktarının artması sonucu, sodyum ve klor iyonlarının gerek tirosol ve gerekse kalıp bölgeler arasındaki elektrostatik etkileşimlerinden dolayı adsorpsiyon kapasitesindeki düşüş olarak açıklanabilir.



Şekil 4.5: Tirozol adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi (Tirozol derişimi: 1 mg/mL, pH 6 (0,001 M fosfat), T: 25°C).

4.5.4 Tirozol adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi

Tirozol adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisini araştırmak için 5, 15, 25 ve 35°C sıcaklıklar çalışıldı ve sonuçlar Şekil 4.7’de verildi. Şekilden de görüleceği gibi, tirozol baskılanmış polimerler için maksimum adsorpsiyon 25°C’da gerçekleşmiştir. Polimerizasyonun gerçekleştiği sıcaklıkta maksimum adsorpsiyonun da gerçekleşmesi moleküler baskılanmış polimerlerdeki hafıza etkisi ile açıklanabilir (Yu ve Mosbach, 1997).



Şekil 4.6: Tirosol adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi (Tirosol derişimi: 1 mg/mL, pH 6 saf su tamponu).

4.6 Denge modelleri

Adsorpsiyon denge izotermi adsorbanın birim kütlesine adsorbe edilen miktarının dengedeki çözelti konsantrasyonu arasındaki ilişkiyi temsil etmektedir. Tirosol baskılanmış polimerler ile tirosol molekülleri arasındaki küte transferi Langmuir izotermi ile incelenmiştir. Bu izotermin genel gösterimi olan denklem 4.1 düzenlediğinde denklem 4.2 oluşur.

$$\frac{dQ}{dt} = k_1 C_e (Q_m - Q_e) - k_2 Q \quad (4.1)$$

$$Q_e = \frac{Q_m C_e}{K_d C_e} \quad (4.2)$$

Polimer bir yüzeyde etkileşimlerin bağımsız bölgelerdeki varlığını göstermek için denklem 4.2’de bir dizi dönüşümler yapılarak denklem 4.3 ve buradan heterojen kooperatif bağlanmaya olan duyarlılığından dolayı Scatchard (Scatchard ve Ann, 1949) grafiği elde edilebilir.

$$\frac{Q_e}{C_e} = \frac{Q_m}{K_d} - \frac{Q_e}{K_d} \quad (4.3)$$

Denklemden,

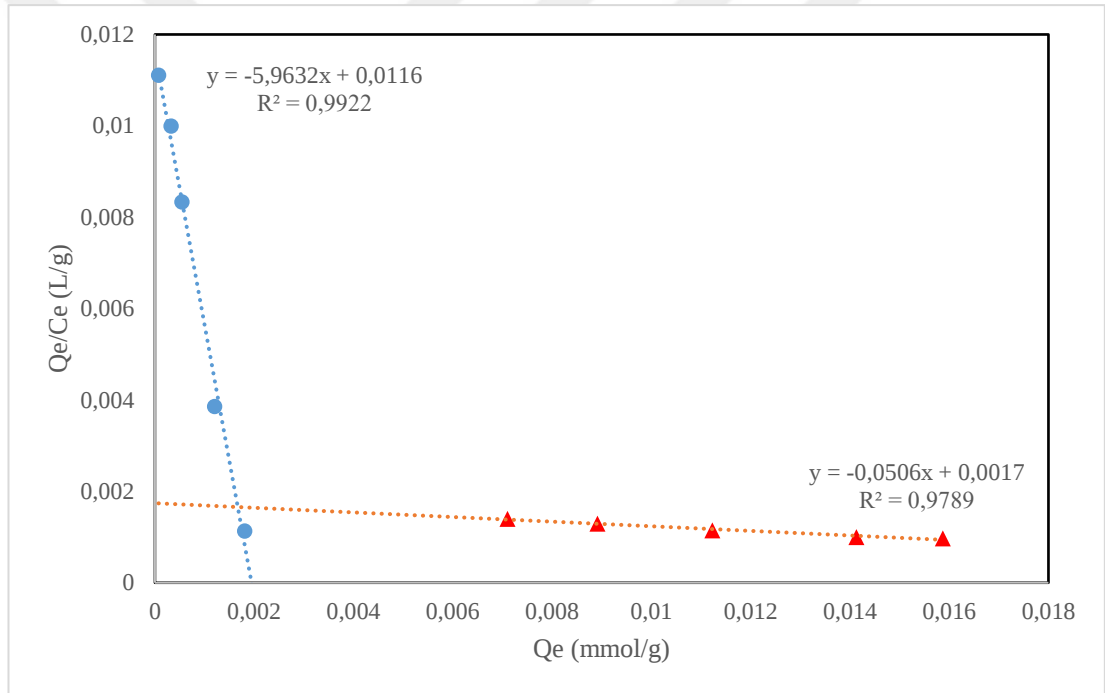
Q_e = Adsorbentin adsorpsiyon kapasitesi (mg/g, mol/g)

Q_m = adsorbentin maksimum adsorplama kapasitesi (mg/g, mol/g)

K_d = Ayırma sabiti

C_e = Adsorplanan maddenin denge durumunda çözeltideki derişimi (mg/L, mol/L) olarak tanımlanır.

Scatchard denkleminde Q_e/C_e 'ye karşı Q_e için çizilen grafikte elde edilecek doğrunun lineer çıkması, bağlanan moleküller ile bağlandığı bölgeler arasında bağımsız etkileşimlerin varlığını gösterecektir.



Şekil 4.7:Tirosol baskılanmış polimerik partiküllere tirozol adsorpsiyonu için Scatchard grafiği

Tirosol baskılanmış polimerik partiküllere tirozol adsorpsiyonu dair çizilen Scatchard grafiği Şekil 4.7'de verilmektedir. Şekilden de görüleceği gibi tirosol baskılanmış polimerler için düşük ve yüksek derişimlerde olmak üzere iki farklı bölge için lineer grafikler elde edilmiştir. Bu lineer bölgeler, Langmuir eşitliğine uyum göstererek etkileşimde bağımsız bölgelerin olduğunu teyid etmektedir ve partiküller üzerindeki tirosolün adsorpsiyon bölgelerinde kooperativitenin bulunmadığını

göstermektedir. Ayrıca, moleküler baskılanmış bölgelerde baskılanmış molekülün yüzeye olan afinitesinin heterojen bir yapıya sahip olduğu ve iki farklı bağlanma sabitli bir adsorpsiyonun ortaya çıktığını göstermektedir (Chen vd., 2001, Wang vd., 2003). Bu bölgelerden elde edilen değerler çizelge 4.1’de verilmektedir.

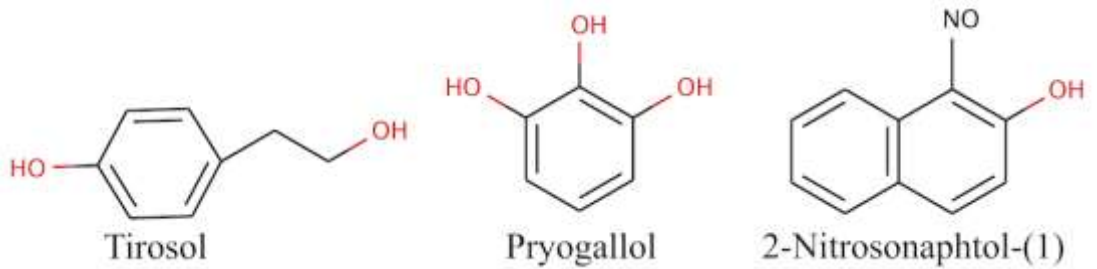
Çizelge 4.1: Scatchard grafiğinden elde edilen, düşük ve yüksek derişim bölgelerine ait değerler

Düşük derişim bölgesi			Yüksek derişim bölgesi		
Q_{max} (mg/g)	K_d (mol/L)	R^2	Q_{max} (mg/g)	K_d (mol/L)	R^2
0,27	$1,68.10^{-4}$	0,99223	3,19	$1,97.10^{-2}$	0,97893

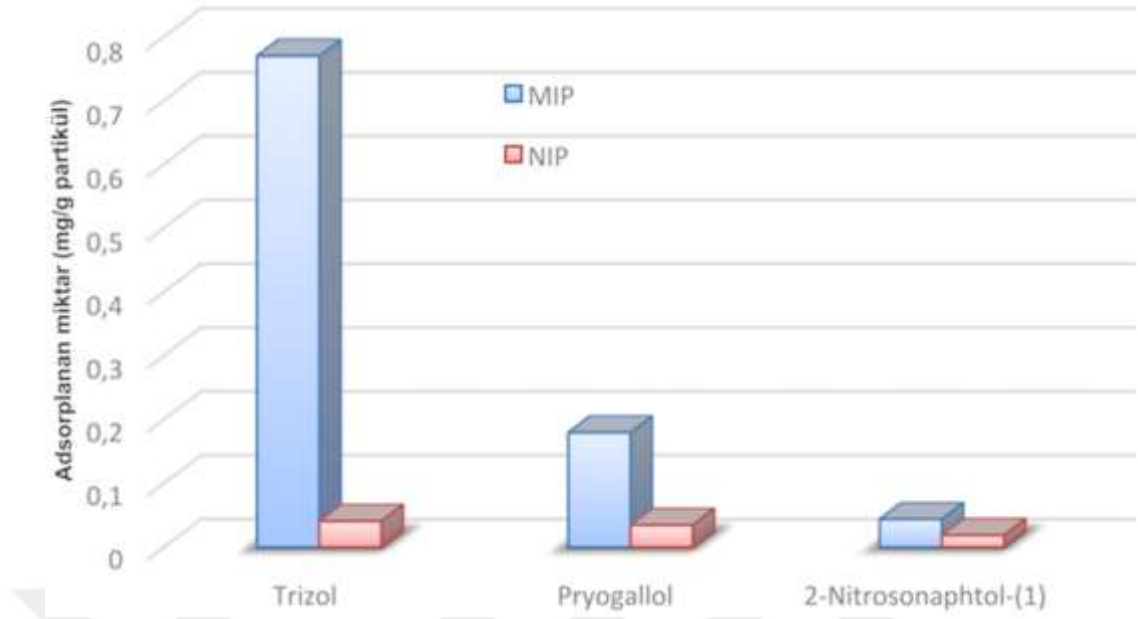
Düşük derişimlerde, seçici bağlanma bölgelerindeki adsorpsiyon daha güçlüdür (Chen vd., 2001).Tablo 4.1’de K_d değerleri (denge ayrışma sabitleri) göz önüne alındığında, düşük derişim bölgesinde yüksek seçicilik (yüksek afinite, düşük K_d), yüksek derişim bölgesinde ise düşük seçicilik (düşük afinite, büyük K_d) görülmektedir. Yine tablodan görüldüğü gibi, düşük ve yüksek derişim bölgelerinde maksimum adsorpsiyon sırasıyla 0,27 ve 3,19 (mg/g) olarak gerçekleşmiştir.

4.7 Seçicilik çalışmaları

Tirosol baskılanmış polimerik partiküllerin, yapıca tirosole benzer farklı moleküllere karşı seçicilik davranışları da bu tez kapsamında çalışılmıştır. Yarışmacı moleküllerin, bazı özellikler açısından (moleküler ağırlık, büyüklük, moleküler yapı gibi) benzerlik taşıması önemlidir. Tirosol baskılanmış ve baskılanmamış polimerik partiküllerin, Şekil 4.8’ de verilen pryogallol ve 2-nitrosonaphtol-(1) moleküllerine karşı adsorpsiyon davranışları incelenmiş ve şekil 4.9’da verilmiştir.



Şekil 4.8: Seçicilik çalışmalarında kullanılan moleküller



Şekil 4.9.:Baskılanmış ve baskılanmamış polimerlerin tirozol ve yarışmacı moleküllere karşı adsorpsiyon davranışları

Deneyler kapsamında, tirozol baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) polimerlerin sulu çözeltideki tirozol ve yarışmacı moleküller karşı adsorpsiyon kapasiteleri kullanılarak statik dağılma sabitleri $K_D(L/g)$ ve baskılama faktörleri (İmprinting faktör, (İ.F.)) incelenmiştir.

$$K_D = Q/C_e \quad (4.4)$$

Burada Q , adsorpsiyon kapasitesi (mol/g), C_e , adsorplanan maddenin çözeltideki denge derişimini vermektedir. MIP ve NIP'ler için hesaplanacak olan K_D 'lerden yola çıkarak ise eşitlik 4.5'teki İ.F. hesaplanır.

$$İ. F. = \frac{K_D (MIP)}{K_D (NIP)} \quad (4.5)$$

Deklem 4.5'in kullanılmasıyla hesaplanan İ.F değerleri çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2: Kalıp ve yarışmacı moleküllerin MIP ve NIP'e karşı İ.F. değerleri

	$K_D(L/g)$	İ.F.	$K_D(L/g)$	İ.F.	$K_D(L/g)$	İ.F.
	Tirosol		Pryogallol		2-Nitrosonaphtol-	
MIP	1,54	18,78	0,36	5,14	0,088	2,32
NIP	0,082		0,07		0,038	

Çizelge 4.2’den de görüldüğü gibi, tirozol molekülünün baskılanmış ve baskılanmamış polimerler için verdiği İ.F. değeri, diğer yarışmacı moleküllerin oluşturduğu İ.F. değerlerinden büyüktür. Bu sonuç, polimer üzerinde tirozol için üç boyutlu bölgelerin oluştuğunu göstermektedir.

Ayrıca, baskılanmış molekül olan tirozol ve her bir yarışmacı molekül için statik dağılma sabitleri K_D ’ler hesaplanarak, seçicilik katsayısı (α) (denklem 4.6) ve bağıl seçicilik katsayısı (β) (denklem 4.7) da aşağıdaki eşitliklerden hesaplanabilir. Bağıl seçicilik katsayısının 1’e eşit olması durumu, seçiciliğin olmadığı anlamına gelir.

$$\alpha = \frac{K_D (\text{tirozol})}{K_D (\text{yarışmacı molekül})} \quad (4.6)$$

$$\beta = \frac{\alpha_{MIP}}{\alpha_{NIP}} \quad (4.7)$$

Hesaplamalar sonucu elde edilen, statik dağılma katsayısı K_D , seçicilik katsayısı (α) ve bağıl seçicilik katsayısı (β) Çizelge 4.3’de verilmiştir.

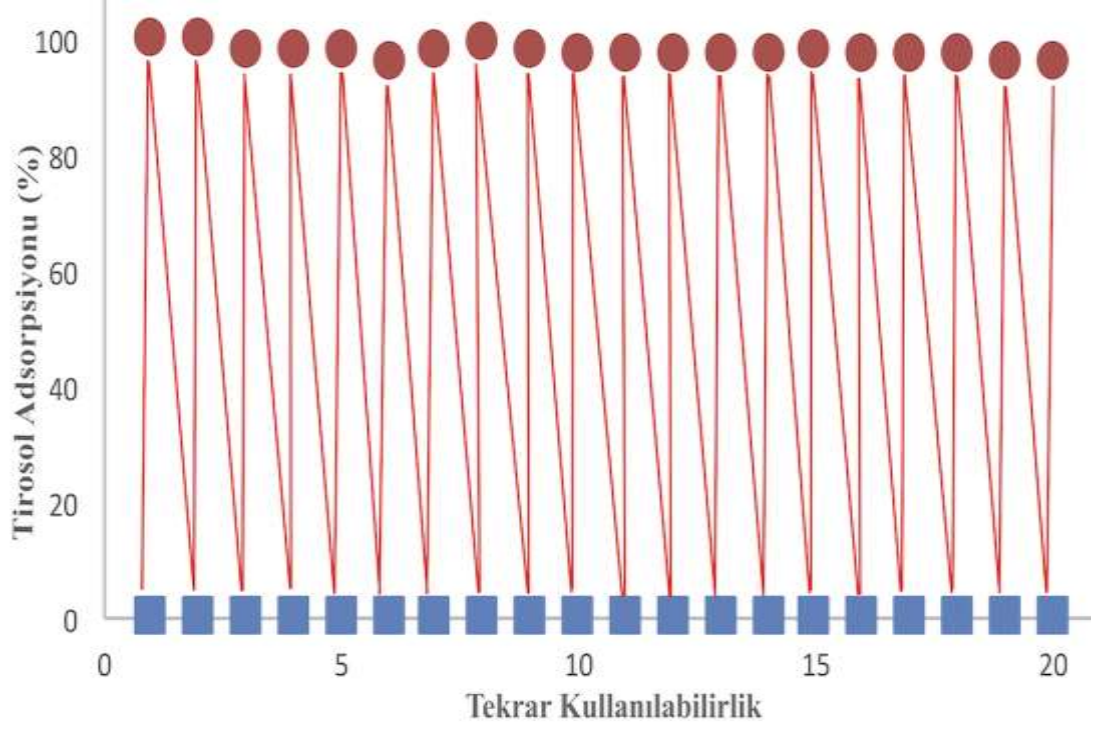
Çizelge 4.3: Tirozol ve yarışmacı moleküllerin seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları

	$K_D(\text{L/g})$		α	β	$K_D(\text{L/g})$	α	β
	Tirosol	Pryogallol			2-Nitrosonaphtol-(1)		
MIP	1,54	0,36	4,28	3,65	0,088	17,5	8,11
NIP	0,082	0,07	1,17		0,038	2,15	

Çizelge 4.3’ten de açıkça görüldüğü gibi tirozol baskılanmış polimer, tirozol için pryogallole karşı 3,65 kat, 2-Nitrosonaphtol-(1)’e karşı ise 8,11 kat daha fazla özgülük göstermektedir. Bu durum hem pryogallol hem de 2-Nitrosonaphtol-(1) molekülünün diğer iki molekül ile kıyaslandığında yapıcı daha büyük ve farklı olması ve tirozol için uyarlanan üç boyutlu bölgeye girememesi ile açıklanabilir.

4.8 Tekrar kullanılabilirlik

Şekil 4.10’da tirosol baskılanmış partiküllerin oldukça kararlı olduğu ve 20 adsorpsiyon döngüsünden sonra bile kararlılığını %97 oranında koruduğu görülmektedir.



Şekil 4.10.: Tirosol baskılanmış polimerlerin tekrar kullanılabilirliği

5. SONUÇLAR

Çalışılan bu tez kapsamında tirosol saflaştırılmasına yönelik farklı bir teknik olan moleküler baskılama (MIP) tekniği kullanılmıştır. Tirosol baskılanmış polimerler yığın polimerizasyon yöntemi ile hazırlanmış ve baskılanmamış polimerlerle aynı yöntemle çalışılmıştır. Hazırlanan polimerler diskler şeklinde kesilerek eş parçalara ayrıldıktan sonra bir dizi yıkama işlemi yapılarak kalıp molekül olan tirosol polimerden uzaklaştırılmış ve kesikli sistemde çalışmalar yapılmıştır. Yüzey alan ölçümleri baskılanmış polimerler için $35,7 \text{ m}^2/\text{g}$ iken aradaki moleküler boşluklardan dolayı baskılanmamış polimerlerde $14,1 \text{ m}^2/\text{g}$ olarak bulunmuştur. Polimerlerin taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntülerinden baskılanmış polimerlerin gözenekli bir yapıya sahip olduğu ve bundan dolayı da kütle transfer direncinin düşük olduğu görülmektedir. Tirosol baskılanmış polimerler ile adsorpsiyon çalışmaları yapılmıştır. Maksimum adsorpsiyon pH 6'da fosfat tamponunda ve 25°C oda sıcaklığında $2,5 \text{ mg/ml}$ başlangıç derişiminde baskılanmış polimere olan spesifik adsorpsiyon $2,39 \text{ mg/g}$ partikül olarak gerçekleşmiştir. Adsorpsiyon modeli olarak Langmuir adsorpsiyon modeli incelenmiş ve 0,992 korelasyon katsayısı ile bu çalışma için uygun adsorpsiyon modeli olduğu belirlenmiştir. Tirosol baskılanmış polimere iyonik şiddetin (NaCl) etkisi incelenmiş ve iyonik şiddetin artmasıyla adsorpsiyon kapasitesinin düştüğü görülmüştür. Bu tez kapsamında tirosol baskılanmış polimerik partiküllerin yapıcı tirosole benzer farklı moleküllere karşı seçicilik davranışları da incelenmiştir. Tirosole yapıcı benzeyen pryogallol ve 2-nitrosonaphtol-(1) moleküllerine karşı adsorpsiyon davranışları incelenmiş ve baskılanmış polimerlerde tirosol için üç boyutlu bölgelerin oluştuğu gözlemlenmiştir. Baskılanmış polimerlerin tekrar kullanılabilirliği incelenmiş ve çalışmaları sonunda bile kararlılığın %97 oranında korunduğu görülmüştür. Sonuç olarak ise tirosolün saflaştırılmasına yönelik MIP tekniği ile sentezlenen polimerlerin sulu çözeltiden tirosol adsorpsiyonunda saflaştırmaya olumu sonuçlar verdiği görülmüştür.

KAYNAKLAR

- Alexander, C., Andersson, H.S., Andersson, L.I., Ansell, R.J., Kirsch, N. ve Nicholls I.A. 2006. "Mahony, J., Whitcombe, M.J., Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003, in Journal Molecular Recognition, 19, 106-180.
- Alkın, E. 2003. Zeytin meyvesinde bulunan hydroxytyrosol' ün özellikleri ve insansalığı üzerine etkileri, Türkiye 1. Zeytinyağı ve Zeytin Sempozyumu Bildirileri, 113-119s.
- Alonso, A., Perona, J.S., Valentina, Ruiz-Gutiérrez V. ve Martínez-González M.A. 2004. Olive oil consumption and reduced incidence of hypertension, Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention, 801-805p.
- Andaç, M, Say, R. ve Denizli, A. 2004. Molecular Recognition Based Cadmium Removal from Human Plasma. Journal of Chromatography B 811: 119-126.
- Anderson, L.I. ve Klaus, M, 1990. Enantiomeric resolution on molecularly imprinted polymers prepared with only non-covalent and non-ionic interactions. Journal of Chromatography A 1 516 (2): 313-322.
- Andersson, L.I. 2000, Molecular imprinting for drug bioanalysis A review on the application of imprinted polymers to solid phase extraction and binding assay, J.Chromatography. B., 739, 163-173.
- Arshady, R. ve Mosbach, K, 1981. Synthesis of substrate-selective polymers by host-guest polymerization. Macromol. Chem; 182: 687-692.
- Bakas, I., Oujji, N.B., Moczko, E., Istamboulie, G., Piletsky, S., Piletska, E., Ichou, I.A, Addi, E.A., Noguer, T. ve Rouillon, R. 2012. Molecular imprinting solid phase extraction for selective detection of methidathion in olive oil. Analytica Chimica
- Basıbuyuk, M. ve Forster, C.F. 2003. An Examination of Adsorption Characteristics of a Basic Dye (Maxilon Red BL-N) on to Live Activated Sludge System. Process Biochem., 38: 1311-1316.
- Boonpangrak, S., Whitcombe, M., Prachayasittikul, V., Mosbach, K., ve Ye, L., 2006. Preparation of molecularly imprinted polymers using nitroxide-mediated living radical polymerization Elsevier; 349-354.

Bülbül, E. 2008. Her Yönüyle Zeyticilik, İnkılap Kitabevi, 2. Baskı, 236s

Caro, E., Masqué, N., Marcé, R.M., Borrull, F., Cormack, P.A.G. ve Sherrington, D.C. 2002. Non covalent and semi-covalent molecularly imprinted polymers for selective on-line solid-phase extraction of 4-nitrophenol from water samples, J. Chromatogr. A; 963: 169–178.

Cazes, J. 2006. Handbook of Affinity Chromatography, Taylor & Francis Group, 2. Baskı.

Chandramohan, R., Pari, L., Rathinam, A. ve Sheikh, A. 2015. Tyrosol, a compound, ameliorates hyperglycemia by regulating key enzymes of carbohydrate metabolism in streptozotocin induced diabetic rats, Materials Science, 44-55.

Chen, Y., Kele, M., Quinones, I., Sellergren, B. ve Guichon, G. 2002. Influence of the pH on the Behavior of an Imprinted Polymeric Stationary Phase Supporting Evidence for a Binding Site Model, J. Chromatogr. A, 927, 1.

Cimato, A., Mattei, A. ve Osti, M. 1990. Variation of polyphenol composition with harvesting period. Acta Horticulturae, 286, 453-456.

Dai, C.M., Zhang, J., Zhang, Y.L., Zhou, X.F., Duan, Y.P. ve Liu, S.G. 2012. Removal of carbamazepine and clofibric acid from water using double templates molecularly imprinted polymers. Environmental Science and Pollution Research, doi: 10.1007/s11356-013-1565-5.

Dickert, F.L. ve Hayden, O. 1999. Imprinting with sensor development On the way to synthetic antibodies, Fresenius J. Anal. Chem., 364, 506-511.

Dong, X.C., Sun, H., Lu, X.Y., Wang, H.B., Liu S.X. ve Wang, N. 2002. Separation of ephedrine stereoisomers by molecularly imprinted polymers influence of synthetic conditions and mobile phase compositions on the chromatographic performance, Analyst 127, 1427–1432

Eduardo, Lopez-Huertas. ve Juristo, Fonolla. 2016. Hydroxytyrosol supplementation increases vitamin C levels in vivo. A human volunteer trial, Redox, 12 - 014.

Erbay, Z. ve İçier, F. 2008, Zeytin ağacından faydalanmanın yeni bir yolu olarak zeytin yaprağı ve gıda endüstrisindeki potansiyel uygulama alanları, Akademik Gıda, 6(3), 27–36s.

Ersus, S. ve Esen, Y. C. 2008. Zeytin yaprağındaki oleuropein ve diğer fenolik maddeler ile bunların sağlık açısından yararları, Akademik gıda, 6(2), 3436s.

Furneri, P.M., Piperno A. ve Bisignano G. 2009. Antimycoplasmal activity of oleuropein. In: V.R. Preedy, R.S. Watson (Eds.), Olives and olive oil in health and disease prevention. UK: Academic Press, s.1355-1361.

Haginaka, J., Sakai Y. ve Naimatsu S. 1998. Analytical Sciences; 14: 823-26.

- Haupt, K. ve Mosbach K. 1998. Plastic antibodies: developments and applications, *Tiptech*; 16: 468-475.
- Hjerten, Liao. 1996. Gels mimicking antibodies in their selective recognition of proteins, *Chromatographia* 44 (5): 227-234.
- Hosoya, K., Yoshikazo, K., Tanaka, N., Kimata, K., Araki, T. ve Haginaka, J. 1994, *Chemistry Letters*; 1437-38.
- Hwang, CC. ve Lee, WC. 2002. Chromatographic characteristics of cholesterol-imprinted polymers prepared by covalent and non-covalent imprinting methods, *Journal of Chromatography A*; 962: 69-78.
- Ikegami, T., Mukawa, T., Nariai H. ve Takeuchi, T. 2004. Bisphenol A- recognition polymers prepared by covalent molecular imprinting, *Anal. Chim. Acta.*, 504, 131-135.
- Katz, A. ve Davis, M.E. 1999. Investigations into the Mechanisms of Molecular Recognition with Imprinted Polymers, *Macromolecules*, 32, 4113-4121.
- Kim, H. ve Spivak, D.A. 2003. New Insight into Modeling Non-Covalently Imprinted Polymers. *Journal of the American Chemical Society*, 125(37), 11269-11275.
- Kirsch, N., Alexander, C., Lübke, M., Whitcombe, M.J. ve Vulfson, E.N. 2003. Enhancement of selectivity of imprinted polymers via post-imprinting modification of recognition sites. *Polymer*, 41(15), 5583-5590.
- Komiyama, M., Takeuchi, T., Mukawa, T. ve Asanuma, H. 2003. Molecular imprinting from fundamentals to applications. Weinheim: Wiley-VCH ; p: 17.
- Kriz, D., Ramstrom, O. ve Mosbach, K. 1997. Molecular imprinting: new possibilities for sensor technology, *Anal. Chem*; 69: 345-349.
- Li, J., Wei, G. ve Zhang, Y. 2012. Molecularly Imprinted Polymers as Recognition Elements in Sensors, in *Handbook of Biosensors and Biochips*, K. Haupt, Belmont, A. S., Editor, 35-55.
- Mahony, JO., Nolan, K. ve Smyth, MR. 2005. Molecularly imprinted polymers potential and challenges in analytical chemistry, *Anal. Chim. Acta*; 534: 31-39.
- Mallik, S., Plunkett, S.D., Dhal, P.K., Johnson, R.D., Pack, D.W., Shnek D.R. ve Arnold, F.H. 1994. Towards materials for the specific recognition and separation of proteins, *New Journal of Chemistry*, 18, 299-304.
- Marsillo, V. ve Lanza, B. 1998. Characterization of an oleuropein degrading strain of *Lactobacillus plantarum*. Combined effects of compounds present in

- olivefermenting brines (phenols, glucose and NaCl) on bacterial activity. *J.Sci.FoodAgric*; 76:520-524.
- Matsui, J., Nicholls, I.A., Takeuchi, T., Mosbach, K. ve Karube, I. 1996. Metal ion mediated recognition in molecularly imprinted polymers. *Analytica Chimica Acta*, 335(1-2), 71-77.
- Menendez, J.A., Papadimitropoulou, A., Vellon, L. ve Lupu R. 2006. A genomic explanation connecting ‘Mediterranean diet’, olive oil and cancer: Oleic acid, the main monounsaturated Fatty acid of olive oil, induces formation of inhibitory “PEA3 transcription factor-PEA3 DNA binding site” complexes at the Her-2/neu(erbB-2) oncogene promoter in breast, ovarian and stomach cancer cells, *European Journal of Cancer*, 42, 2425-2432p.
- Miró-Casas, E., Covas, M., Fitó, M., Farré-Albadalejo, M. ve Marrugat, J. de la Torre R 2003. Tyrosol and hydroxytyrosol are absorbed from moderate and sustained doses of virgin olive oil in humans. *European journal of clinical nutrition*. 57 (1):186–190. doi:10.1038/sj.ejcn.1601532. PMID 12548315.
- Mosbach, K. ve Ramson, O. 1996. The emerging technique of molecular imprinting and its future impact on biotechnology. *Biotechnology*, 14: 163-170.
- Odabaşı, M., Say, R. ve Denizli, A. 2007. Molecular imprinted particles for lysozyme purification, *Materials Science and Engineering, C*, 27 (1), 90-99.
- Okutucu, B. 2007. Serotonin’e Spesifik Moleküler Damgalı Polimerlerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu, Doktora Tezi, Fen Bilimler Enstitüsü, Ege Üniversitesi
- Owen, R.W., Giacosa, A., Hull, W.E., Haubner, R., Spiegelhalder, B. ve Bartsch, H., 2000. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil, *European Journal of Cancer*, 36, 1235-1247p.
- Perez, N., Whitcombe, M.J. ve Vulfson, E.N. 2001. *Macromolecules* ; 34: 830-36.
- Ramírez-Expósito, M.J., Carrera, M.P., Cortés, P. ve Martínez-Martos, J.M., 2010. Dietary Fat Including Olive Oil and Breast Cancer in the N-methyl Nitrosourea (NMU) Animal Model, *Olive and Olive Oil in Health and Disease Prevention*, 969-979p.
- Romani, A., Mulinacci, N., Pinelli, P., Vincieri, F. F. ve Cimato, A. 1999. Polyphenolic content in five Tuscany cultivars of *Olea europaea* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 964-967.
- Scatchard, G. ve Ann, N. Y., 1949. *Acad. Sci.* 51, 658.
- Sellergren, B. 1994. *Journal of Chromatography A*; 673: 133-41.
- Sellergren, B., Lepistö, M. ve Mosbach, K. 1988. “Highly enantioselective and substrate selective polymers obtained by molecular imprinting utilizing

- noncovalent interactions-NMR and chromatographic studies on the nature of recognition,” *J. Am. Chem. Soc.*; 110: 5853–5860.
- Steinke, J., Sherrington, D. ve Dunkin, I. 1995. Imprinting of synthetic polymers using molecular templates, *Adv. Polym. Sci.* ; 123: 80-125.
- Takagishi, T. ve Klotz, M., 1972. Macromolecule-small molecule interactions: introduction of additional binding sites in polyethyleneimine by disulfide cross-linkages, *Biopolymers* ; 11; 483-491.
- Tuck, K.I., Hayball, P.J. ve Stupans, I., 2002. Structural characterization of the metabolites of hydroxytyrosol, the principal phenolic component in olive oil, in rats, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2404-2409p.
- Tüzmen, N., Kalburcu, T. ve Denizli, A. 2012. Immobilization of catalase via adsorption onto metal-chelated affinity cryogels. *Process Biochemistry*, 47(1), 26-33.
- Verheyen, E., Schillemans, J. P., Wijk, M., Demeniex, M-A., Hennink, W. E. ve Nostrum, C. F. 2011. Challenges for the effective molecular imprinting of proteins, *Biomaterials*, 32, 3008-3020.
- Vlatakis, G., Andersson, L.I., Müller, R. ve Mosbach, K. 1993. Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting. *Nature*; 361, 645–647.
- Whitcombe, M.J., Rodriguez, M.E., Villar, P. ve Vulfson, E.N. 1995. A New Method for the Introduction of Recognition Site Functionality into Polymers Prepared by Molecular Imprinting: Synthesis and Characterization of Polymeric Receptors for Cholesterol. *Journal of the American Chemical Society*, 117(27), 7105-7111.
- Wulff, G., Grobe-Einsler, R. ve Sarhan, A. 1977. Enzyme-analogue built polymers, on the specificity distribution of chiral cavities prepared in synthetic polymers, *Macromol. Chem.* ; 178: 2817-2825.
- Wulff, G. ve Sarhan, A. 1972. Use of polymers with enzyme-analogous structures for the resolution of racemates. *Angew Chem Int Ed Engl*; 11: 3-341.
- Yan, H., ve Row, K., 2006. Characteristic and Synthetic Approach of Molecularly Imprinted Polymer. *International Journal of Molecular Sciences*, 7(5), 1551-78.
- Yoshizako, K., Hosoya, K., Iwakoshi, Y., Kimata, K., ve Tanaka, N. 1999. “Porogen imprinting effects,” *Anal. Chem.*, 70, 386–389.
- Yu, C. ve Mosbach, K. 1997. Molecular imprinting utilizing an amide functional group for hydrogen bonding leading to highly efficient polymers, *J. Org. Chem.*, 62, 4057-4064.
- Zhong, N., Byun, H.S. ve Bittman, R. 2011. Hydrophilic cholesterol-binding molecular imprinting polymers. *Tetrahedron Letter* ; 42: 1839-1841.



ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Miren ŞEN

Doğum Tarihi ve Yeri: 18.09.1990 - Bulgaristan

E-posta adresi : meren_sen59@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ (Kurum ve Yıl)

Lisans : Aksaray Üniversitesi, 2009-2014

Yüksek Lisans : Aksaray Üniversitesi, 2014-2017

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLERİ

1. Danone Tikveşli Gıda ve İçecek San.Ve Tic.A.Ş./Yaz Stajı
2. Eczacıbaşı Baxter/Yaz Stajı
3. Ozturk Quebap Produccion SL/Erasmus Staj