

T.C. CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ *FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TRİFLOKSİSTROBİN DAMGALI POLİMERLERİN HAZIRLANMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GİZEM KAZIMLAR

Anabilim Dalı : Kimya

Programı : Biyokimya

MANİSA 2013

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ* FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TRİFLOKSİSTROBİN DAMGALI POLİMERLERİN HAZIRLANMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gizem KAZIMLAR

Celal Bayar Üniversitesi Kimya Bölümünde Kabul Edilen
Yüksek Lisans Tezidir.

Tezin Teslim Tarihi: 29 Ağustos 2013

Tezin Sözlü Savunma Tarihi: 17 Eylül 2013

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ayşe DİNÇER

Jüri Üyesi: Prof. Dr. Ali ÇELİK

Jüri Üyesi: Prof. Dr. Sinan AKGÖL

Jüri Üyesi: Doç. Dr. Ayşe DİNÇER

MANİSA 2013

İÇİNDEKİLER

ŞEKİLLER DİZİNİ	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ	V
KISALTMALAR	VI
TEŞEKKÜR	VII
ÖZET	VIII
ABSTRACT	IX
1.GİRİŞ.....	1
1.1 Moleküler Damgalama Yöntemleri.....	1
1.2 Moleküler Damgalamanın Temel Bileşenleri.....	3
1.2.1 Kalıp Molekül.....	3
1.2.2 Fonksiyonel Monomerler.....	4
1.2.3 Çapraz Bağlayıcılar.....	5
1.2.4. Çözgen (Porojen).....	7
1.2.5. İnsiyatörler (Başlatıcılar).....	7
1.3 Moleküler Damgalama Teknolojisinde Uygulanan Kimyasal Stratejiler	8
1.3.1 Kovalent Damgalama.....	9
1.3.2 Boronat Esterleri ile Damgalama.....	10
1.3.3 Karbonat Esterler ile Damgalama.....	11
1.3.4 Ketal ve Asetaller ile Damgalama.....	11
1.3.5 Schiff Bazları ile Damgalama.....	12
1.3.6 Disüfit Bağları ile Damgalama.....	12
1.3.7 Koordinasyon Bağı ile Damgalama.....	13
1.3.8 Non-Kovalent Damgalama.....	14
1.3.9 Tek Fonksiyonel Monomer ile Non-Kovalent Damgalama.....	14
1.3.10 Monomer Kombinasyonları ile Non-Kovalent Damgalama.....	15
1.3.11 Tasarlanmış Monomerler ile Non-Kovalent Damgalama.....	16
1.3.12 Semi-Kovalent Damgalama.....	16
1.4 Moleküler Damgalı Polimer Hazırlama Yöntemleri.....	16
1.4.1 Yığın(Bulk) Polimerizasyonu.....	16

1.4.2 In-Situ Polimerizasyon.....	17
1.4.3 Süspansiyon Polimerizasyon.....	19
1.4.4 Çok Adımlı Şişme Polimerizasyonu.....	20
1.4.5 Çöktürme Polimerizasyonu.....	20
1.4.6 Yüzey Damgalama Polimerizasyonu.....	22
1.5 Moleküler Damgalı Polimerlerin Kullanım Alanları.....	23
1.5.1 Kromatografi.....	23
1.5.1.1 Katı Faz Ekstraksiyonu (SPE).....	23
1.5.1.2 Kesikli (off-line) MISPE Çalışmaları.....	25
1.5.1.3 Kesiksiz (on-line) MISPE Çalışmaları.....	25
1.5.2 Kapiler Elektrokromatografi.....	26
1.5.3 Sıvı Kromatografisi.....	27
1.5.4 Sensör Uygulamaları.....	27
1.6 Pestisitler.....	28
1.6.1 Pestisitlerin Sınıflandırılması.....	29
1.7 Trifloksistrobinin Yapısı.....	31
2. MATERYAL VE METOD.....	32
2.1 Materyal.....	32
2.2 Yöntem.....	32
2.2.1 Trifloksistrobin Standart Grafiğinin Oluşturulması.....	32
2.2.2 Yığın Polimerizasyon Yöntemi ile Trifloksistrobin Damgalı Polimerlerin Hazırlanması.....	32
2.2.3 Hazırlanan Polimerlerin Damgalama Etkinliklerinin Hesaplanması.....	33
2.2.4 Geri Bağlama Çalışmalarının Optimizasyonu.....	34
2.2.4.1 Geri Bağlama Üzerine pH'ın Etkisi.....	34
2.2.4.2 Optimum Polimer Miktarının Belirlenmesi.....	34
2.2.4.3 Optimum Geri Bağlama Sürenin Belirlenmesi.....	34
2.2.4.4 Kesikli Sistemle Damgalı Polimerin Trifloksistrobin Bağlama Kapasitesinin Belirlenmesi.....	35
2.2.5 Trifloksistrobin Damgalı Polimerlerin Katı Faz Ekstraksiyonunda (SPE) Dolgu Materyali Olarak Kullanılması.....	35

2.2.5.1 Gerçek Örneklerin Uygulanması.....	35
2.2.5.2 Üzüm Örneklerine Standart Katma Yönteminin Uygulanması.....	35
2.2.5.3 Üzüm Örneklerinin Katı Faz Ekstraksiyonuna Uygulanması.....	36
2.2.6 Trifloksistrobin Damgalı Polimerin Karakterizasyonu.....	36
2.2.6.1 Trifloksistrobin Damgalı Yığın Polimerlerin FT-IR Analizi.....	36
2.2.6.2 Trifloksistrobin Damgalı Yığın Polimerlerin SEM Analizi.....	36
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	37
3.1 Trifloksistrobin Damgalı Polimerlerin Hazırlanması.....	38
3.2 Trifloksistrobin Standart Grafiğinin Oluşturulması.....	38
3.3 Hazırlanan Polimerlerin Geri Bağlama Çalışmalarının Değerlendirilmesi.....	39
3.3.1 Trifloksistrobin Damgalı Yığın Polimerlerin Geri Bağlama Koşullarının Optimize Edilmesi.....	39
3.3.2 Geri Bağlama Üzerine pH'ın Etkisi.....	40
3.3.3 Optimum Polimer Miktarının Belirlenmesi.....	41
3.3.4 Geri Bağlanma Çalışmalarında Geri Bağlama Süresinin Belirlenmesi.....	42
3.3.5 Trifloksistrobinin Değişen Konsantrasyonlarında Geri Bağlanma Çalışmalarının İncelenmesi.....	42
3.3.5.1 Langmuir ve Freundlich Adsorpsiyon İzotermlerinin Çizilmesi.....	43
3.4 Trifloksistrobin Damgalı Polimerlerin Katı Faz Ekstraksiyon Çalışmaları.....	46
3.4.1 Üzüm Örneklerinin MIP-SPE Kolonuna Uygulanması.....	46
3.5 Trifloksistrobin Damgalı Polimerin Karakterizasyonu.....	47
3.5.1 Trifloksistrobin Damgalı Polimerin FT-IR Analizi.....	47
3.5.2 Trifloksistrobin Damgalı Polimerin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Analizi.....	49
KAYNAKLAR.....	51
ÖZGEÇMİŞ.....	56

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1	Moleküler Damgalı Polimer Hazırlama Aşamaları	2
Şekil 1.2	Kovalent ve Kovalent olmayan Moleküler Damgalama Yönteminin Şematik Görünümü	3
Şekil 1.3	Kovalent Moleküler Damgalama Yönteminin Şematik Görünümü	9
Şekil 1.4	Trigonal Boronik Asit ve Tetragonal Boronik Asit Oluşumu	10
Şekil 1.5	Ketallerin Monomer Olduğu Kovalent Damgalama	11
Şekil 1.6	Schiff Bazlarının Fonksiyonel Monomer Olduğu Kovalent Damgalama	12
Şekil 1.7	Disülfid Bağ Üzerinden Gerçekleştirilen Damgalama İşlemi	13
Şekil 1.8	Çinko(II)Porfirin Kompleksi ve Metakrilik Asitin Fonksiyonel Monomer Olarak Kullanıldığı Çinhonidin(cinchonidine) Damgalı Polimer	13
Şekil 1.9	Non- Kovalent Moleküler Damgalama Yönteminin Şematik Görünümü	14
Şekil 1.10	Yığın Polimerizasyon Oluşum Şeması	17
Şekil 1.11	In-Situ Polimerizasyonu	18
Şekil 1.12	Süspansiyon Polimerizasyon ... a) Organik faz b) Su Fazı	19
Şekil 1.13	Düzgün Küresel MIP 'lerin Çok Adımlı Şişme Polimerizasyonu Yöntemi ile Hazırlanması	20
Şekil 1.14	Çöktürme Polimerizasyonu	21
Şekil 1.15	Farklı Polimerizasyon Metodlarıyla Elde Edilen Polimer Örnekleri	23
Şekil 1.16	Katı Faz Ekstraksiyon Basamakları	24
Şekil 1.17	MIP ile Dolu Kapiler Kolonun Hazırlanması	26
Şekil 1.18	MIP-Sensör Sistemi	27
Şekil 1.19	Trifloksistrobinin Yapısı	31
Şekil 3.1	Trifloksistrobin Damgalı Polimerlerin Standart Grafiği	39
Şekil 3.2	pH 4.0- 10.0 Aralığında Yapılan Geri Bağlama Çalışmasının Grafiği	40
Şekil 3.3	Değişen Polimer Miktarlarına Karşı Geri Bağlanmanın İncelenmesi	41
Şekil 3.4	İnkübasyon Süresinin Geri Bağlanma Çalışmaları Üzerine Etkisi	42
Şekil 3.5	Değişen Trifloksistrobin Konsantrasyonlarında Geri Bağlama Çalışması	43
Şekil 3.6	NIP, 1-VI-EGDMA polimerinin Langmuir İzotermi	44
Şekil 3.7	MIP, 1-VI-EGDMA Polimerinin Langmuir İzotermi	44
Şekil 3.8	NIP, 1-VI-EGDMA polimerinin Freundlich İzotermi	45
Şekil 3.9	MIP, 1-VI-EGDMA polimerinin Freundlich İzotermi	45
Şekil 3.10	Standart Katma Yöntemi ile Standart Eğrisinin Oluşturulması	47
Şekil 3.11	Trifloksistrobin Damgalı Polimerlerin FT-IR Analizi	48-49
Şekil 3.12	NIP SEM Görüntüsü	49
Şekil 3.13	Trifloksistrobin Damgalanmış Yıkanmamış Polimer SEM Görüntüsü	50
Şekil 3.14	Trifloksistrobin Damgalanmış Yıkanmış Polimer SEM Görüntüsü	50

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1	Moleküler Damgalı Polimer Sentezinde Kullanılan Bazı Fonksiyonel Monomerler	4-5
Çizelge 1.2	Moleküler Damgalı Polimer Hazırlarken Kullanılan Çapraz Bağlayıcılar	5-6
Çizelge 1.3	Moleküler Damgalı Polimer Hazırlarken Kullanılan Başlatıcılar	7-8
Çizelge 1.4	Yığın Polimerizasyon Oluşumlarının Karşılaştırılması	18
Çizelge 1.5	Moleküler Damgalı Polimer Hazırlama Yöntemleri	22
Çizelge 1.6	MIP'lerin Katı Faz Ekstraksiyonunda Kullanımlarının Avantaj ve Dezavantajları	25-26
Çizelge 1.7	Trifloksistrobinin Teknik Özellikleri	31
Çizelge 2.1	Hazırlanan Trifloksistrobin Damgalı Polimerlerin Kompozisyonu	33
Çizelge 3.1	Farklı monomerler kullanılarak hazırlanan polimerlerin Trifloksistrobini Bağlama Etkinliği Açısından Karşılaştırılması	40
Çizelge 3.2	Langmuir ve Freundlich İzoterm Verileri	46
Çizelge 3.3	MIP-SPE Kolonuna Üzüm Örneklerinin Uygulaması	47

KISALTMALAR

ACN Asetonitril
CE Kapiler Kromatografi
DOLPA Dioleil Fosforik Asit
EGDMA Etilen Glikol Dimetakrilat
EtOH Etanol
FTIR Fourier Transform Infrared Spectroscopy
GC Gaz Kromatografisi
HEMA Hidroksi Metil Metakrilat
HPLC Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
LC Sıvı Kromatografisi
MeOH Metanol
MIP Moleküler Damgalı Polimer
NIP Kontrol Polimer
QCM Kuartz Kristal Mikrodenge
SEM Scanning Electron Microscope
SPE Katı Faz Ekstraksiyonu
UV-Vis Ultraviyole-Görünür Işık Spektroskopi
1-VI 1-Vinil İmidazol
4-VP 4-Vinil Piridin

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmam boyunca değerli görüş ve deneyimlerinden yararlandığım danışman hocam sayın Doç. Dr. Ayşe DİNÇER'e , beni her konuda destekleyen ailem ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

.

ÖZET

Moleküler tanıma özellikle biyolojik sistemlerde birçok olayın oluşumu ve devamındaki olayların mekanizmasını açıklamaya çalıştığı için oldukça önemlidir. Araştırmacılar bu doğal tanıma mekanizmasını taklit ederek moleküler tanıma yeteneğine sahip materyaller sentezlemeye çalışmaktadırlar. Yapay biyomoleküllerin oluşum mekanizmalarından biri de moleküler damgalı polimerler (MIP)' dir. Moleküler damgalama teknolojisi ile spesifik moleküler tanıma özelliklerine sahip polimerlerin hazırlanmasına olanak sağlayan, hızlı bir şekilde gelişen kolay ve etkili bir tekniktir. Moleküler damgalı polimerlerin (MIP) hazırlanması sırasıyla kalıp molekül ile fonksiyonel monomer(ler)'in bir porojen içerisinde etkileşime girmesi, ortama çapraz bağlayıcı eklenmesi, polimerizasyonu başlatıcı bir ajan varlığında karışımın polimerizasyonu ve kalıp molekülün polimerden uzaklaştırılması şeklinde gerçekleşir. Moleküler damgalama yönteminde, kalıp molekül ve fonksiyonel monomerler arasında pre-polimerizasyon aşamasında kovalent veya kovalent olmayan etkileşimler ile spesifik kimyasal yapılar meydana gelir. Kalıp (hedef) molekül olarak proteinler, peptidler, aminoasitler, pestisitler, karbohidratlar, koenzimler, hormonlar, nükleotid bazları, steroidler, şekerler ve ilaçlar gibi çeşitli moleküller kullanılabilir. Moleküler damgalı polimerler başta katı faz ekstraksiyonunda dolgu materyali, kesikli sistem bağlama denemeleri, biyosensörler ve kromatografik ayrımlar gibi çok farklı alanlarda uygulama alanı bulmaktadır.

Bu çalışmada üzümderde külleme hastalığının önlenmesinde farklı aşamalarda uygulanan trifloksistrobin pestisiti kalıp molekül olarak seçildi. Trifloksistrobin, strobilurin grubundan aktif bir maddedir. Doğal ortamda gelişen bir mantar türünden elde edilen bir metabolit olan trifloksistrobin, mitokondri solunumunu engelleyen bir pestisittir. Trifloksistrobinin moleküler yapısı göz önüne alınarak akrilamid, hidroksietil metakrilat(HEMA), 4-Vinil piridin(4-Vpy) ,1-vinil imidazol(1-VI) gibi fonksiyonel monomerler, çapraz bağlayıcı etilen glikol dimetakrilat (EGDMA), porojen olarak asetonitril ve başlatıcı olarak da 1-1 azobis-sikloheksankarbonitril kullanılarak yığın polimerizasyon yöntemi ile polimerler oluşturuldu. Polimerler elde edildikten sonra ezildi, öğütüldü ve metanol-asetik asit(9:1) ile yıkanarak kalıp molekülün polimerin yapısından ayrılması sağlandı. Aynı koşullar altında kontrol polimerde kalıp molekül olmadan hazırlandı. Trifloksistrobinin, hazırlanan kontrol ve yıkamış damgalı polimer üzerine geri bağlama koşulları kesikli sistemde optimize edildi. Bu amaçla, geri bağlama üzerine pH'nın etkisi, inkübasyon süresinin etkisi, trifloksistrobin konsantrasyonu gibi parametreler incelendi. Bununla birlikte üzüm örneklerinde trifloksistrobin pestisidinin geri kazanılmasına yönelik uygulama katı faz ekstraksiyon yöntemi ile dolgu materyali olarak da hazırlanmış damgalı polimerin kullanılmasıyla gerçekleştirdi.

Anahtar Kelimeler: Moleküler Damgalı Polimerler, Pestisit ,Trifloksistrobin ,Geri Bağlama, Katı Faz Ekstraksiyonu (SPE)

ABSTRACT

Molecular recognition is crucially important as it aims to explain various formations especially in biological systems and the mechanism of the following incidences. Researchers have been trying to synthesize materials having the ability of molecular recognition by imitating this natural identification mechanism. One of the formation mechanisms of artificial biomolecules is the molecular imprinted polymers (MIP). Molecular imprinting technology is an effective and easy technique which develops expeditiously and enables polymers having specific molecular identification feature to be prepared. The preparation of molecular imprinted polymers go through these phases respectively: interaction with template molecule and functional monomers in a porogen, insertion of crosslinker into the medium, polymerization of the mixture by an agent which initiates polymerization, and removal of template molecule from polymer. In the method of molecular imprinting, interactions of the template molecule and functional monomers can be covalent or non-covalent and specific chemical structure occurs in the step of pre-polymerization. Various molecules such as proteins, peptides, amino acids, pesticides, coenzymes, hormones, nucleotide bases, steroids, carbohydrates and drugs can be used as a template molecule. Molecular imprinted polymers have various application fields such as extender material in solid phase extraction at first, trials of connection of discrete systems, biosensors and chromatographic separations.

In this study, trifloxystrobin pesticide which is applied in different phases of preventing powdery mildew in grapes has been chosen as a template molecule. Trifloxystrobin, is an active agent from strobilurins group. Trifloxystrobin, which is derived from a mushroom species growing in natural environment, is a pesticide that prevents mitochondria respiration. By taking the molecular structure of trifloxystrobin into account, the polymers were constituted with the bulk polymerization method using functional monomers such as acrylamide, hydroxyethyl methacrylate (HEMA), 4-Vinylpyridine (4-Vpy), 1-Vinylimidazole (1-VI), crosslinker ethylene glycol dimethylacrylate (EGDMA), acetonitrile as a porogen and 1-1 Azobis-cyclohexanecarbonitrile as an initiator. After the polymers had been obtained, they were pressed, grinded and by washed with methanol-acetic acid (9:1), template molecule was separated from the polymer structure. Under the same circumstances, nonimprinted polymers (NIP) were prepared under the same conditions but without using the template molecule. The parameters like effect of pH, effect of incubation time, effect trifloxystrobin concentration on rebinding had been examined. Besides, recovery of trifloxystrobin pesticides from grape samples had been done by the using of imprinted polymer which had been prepared as a adsorbent material by the method of solid phase extraction.

Keywords: Molecular Imprinted Polymers, Pesticide, Trifloxystrobin, Rebinding Study, Solid Phase Extraction (SPE).

1. GİRİŞ

Moleküler etkileşim kavramı oldukça eski bir kavram olup ilk kez 1894'de Fischer'in enzim-substrat etkileşimini ortaya koyan ünlü "anahtar-kilit" modelini ortaya atmasıyla birlikte konuyla ilgili modern fikirler ortaya çıkmaya başlamıştır. Bu tanıma göre enzim molekülünün yüzeyinde substrat molekülünün şeklini tamamlayan ve bu şekle uygun yapılar bulunmaktadır. Moleküler etkileşim kavramının en yeni ve büyük çapta ilgi gören uygulamalarından biri de moleküler damgalama yöntemidir. Bu teknikte seçici moleküler tanıma özelliklerine sahip olan oldukça kararlı polimerler hazırlanmaktadır. Hazırlanan bu polimer matrislerindeki tanıma yerleri, analitin fonksiyonel gruplarının biçim ve konumlarını tamamlayıcı niteliktedir. Bu polimerlerin bazıları monoklinal antiadiler ve reseptörler gibi doğal tanıma sistemleriyle karşılaştırılabilir ölçüde yüksek seçicilik ve afiniteye sahiptirler, bu da onları analitik kimya için oldukça uygun bir kimyasal sensör üyesi yapmaktadır(1).

1.1 Moleküler Damgalama Yöntemleri

Moleküler damgalamada, hedef molekül çevresi ile etkileşen bir kalıp olarak davranır, çapraz bağlı monomerler hedef molekül çevresinde düzenlenir ve kalıp benzeri bir tabaka oluşturmak üzere birlikte polimerleşirler. Temel olarak monomerler kovalent veya non-kovalent etkileşimler yoluyla yuva molekül ile bir kompleks oluşturur. Polimerizasyondan sonra yuva molekül uzaklaştırılır ve bağlanma bölgeleri yuva moleküle büyüklük, şekil ve fonksiyonel grupların yerleşimi olarak tamamlayıcıdır. Böylece esas olarak yuva molekülü seçici olarak tekrar bağlayabilen polimer üzerine bir moleküler 'bellek' damgalanmıştır. Moleküler damgalı polimerler biyolojik reseptörlerin en önemli iki özelliğine yani tanıma yeteneği ve spesifik hedef molekülleri bağlama yeteneğine sahiptirler. Moleküler damgalı polimer hazırlama yöntemi genellikle üç basamaktan oluşur:

BASAMAK I: Ön-kompleksleşme

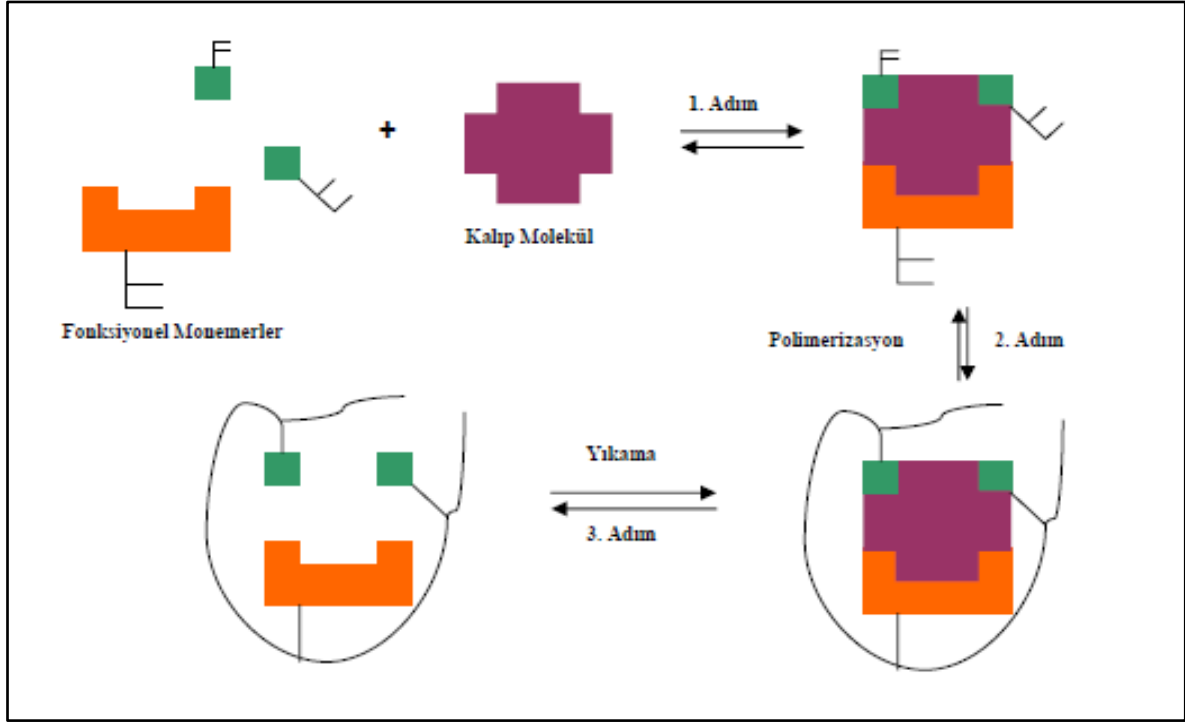
Fonksiyonel gruplar içeren polimerleşebilen uygun monomerler, kalıp ya da başka bir deyişle hedef moleküle kovalent veya non-kovalent etkileşimlerle bağlanarak kompleks oluşturur. Bu basamakta kalıp etrafında fonksiyonel monomerin bağlandığı bir yapı oluşumu söz konusudur. Bu etkileşimde hedef molekülün üç boyutlu yapısı ve kimyasal özellikleri önemli bir yer tutar.

BASAMAK II: Polimerizasyon

Monomer-kalıp kompleksi , uygun bir çapraz bağlayıcının da kullanılmasıyla fonksiyonel monomer üzerinden polimerleştirilir.

BASAMAK III: Kalıp (hedef) molekülün uzaklaştırılması

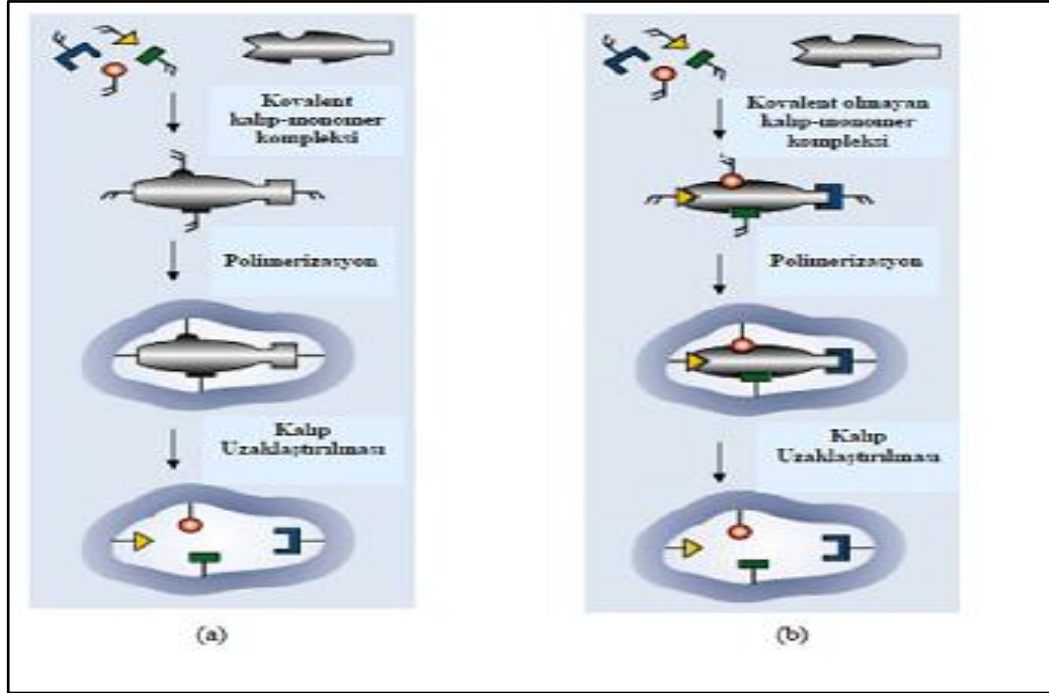
Yapıda hedef molekülün yerini alacak boşlukların oluşturulması amacıyla, kalıp molekül polimerden uzaklaştırılır. Uygun koşullar altında, bu boşluklar kalıp molekülün boyutunu, yapısını ve fizikokimyasal özelliklerini tanır, seçici ve etkin olarak kalıp molekülü bağlar.



Şekil 1.1 Moleküler damgalı polimer hazırlama aşamaları

Moleküler damgalı polimerler çok iyi termal ve kimyasal stabiliteye sahip olduklarından sert koşullarda kullanılabilirler. Moleküler damgalı polimerler düşük maliyet, hazırlama kolaylığı, depolama stabilitesi, aktivite kaybı olmadan bir çok kez kullanılabilmeleri, yüksek mekanik kararlılık, sıcaklık ve basınca dayanıklılık, sert kimyasal koşullarda kullanılabilme gibi bir çok avantaja sahiptir(2-6). Moleküler damgalı polimerler (MIP), kolay hazırlanabilir, kararlı, ucuz ve moleküler tanıma yeteneğine sahip olmaları gibi çekici özellikleriyle, yeni bir tür adsorbent olarak araştırmacıların gözdesi olmuştur.

Moleküler damgalı polimerleri hazırlamak için kalıp molekül ve fonksiyonel monomerler arasındaki etkileşime göre iki farklı yaklaşım kullanılır. Bunlardan biri ön-organizasyon yöntemidir(7). Bu yöntemde kalıp molekül ve fonksiyonel monomerler birbirlerine kovalent bağlanma ile bağlanırlar ve polimerizasyon boyunca bu kompleks yapı kararlılığını korur. (Şekil 1.2a). Diğer yaklaşım geliştirilmiş olan kovalent bağlanma yerine kalıp molekül ve fonksiyonel monomerler arasında hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler, van der Waals etkileşimleri ve iyonik gruplar arasında gerçekleşen Coulomb etkileşimleri gibi etkileşimleri içine alan kovalent olmayan yaklaşımdır(8-9)(Şekil 1.2b).



Şekil 1.2 (a) Kovalent ve (b) Kovalent olmayan moleküler damgalama yönteminin şematik görünümü

1.2 Moleküler Damgalamanın Temel Bileşenleri

Moleküler damgalı polimerlerin hazırlanması aşamasındaki polimerizasyon bileşenleri kalıp molekül, fonksiyonel monomer(ler), çapraz bağlayıcı, inisyatör (başlatıcılar) ve uygun porojenin (çözgen)'dir. Uygun bileşenlerin seçilmesi hazırlanan polimer için çok önemlidir. Ayrıca polimerizasyon sırasında seçilen çözgen, sıcaklık ve basınçta etkileşimlerin kalitesini belirler. Bileşenler ve sahip olmaları gereken genel özellikleri aşağıda özetlenmiştir.

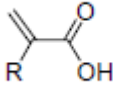
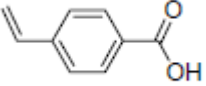
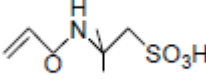
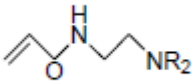
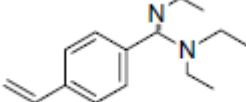
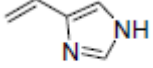
1.2.1 Kalıp Molekül

MIP prosesinde, fonksiyonel monomerler ile kovalent/non-kovalent bağlanabilen kalıp moleküller, moleküler damgalama tekniğinin en önemli yönlerinden birini oluşturur. İdeal kalıp molekül serbest radikal polimerizasyon sürecinde kimyasal olarak inert olmalıdır. Polimerizasyona kalıp molekülün doğrudan ya da dolaylı olarak katılması damgalı polimer oluşum kinetiğini olumsuz etkiler. Kalıp molekülün polimerize olabilen gruba sahip olmaması, serbest radikal polimerizasyonunu inhibe edici tiyol yada hidrokinon gibi grupları olmaması, yüksek sıcaklıklara ya da UV ışına dayanıklı olması istenen özellikleridir(10-18). Kullanılan kalıp moleküller ; ilaçlar, pestisitler, amino asitler, peptitler, koenzimler, hormonlar, nükleotit bazları, steroidler ,şekerler hücreler ve virüsler gibi pek çok küçük organik molekül olabilir(19).

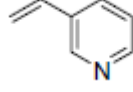
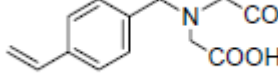
1.2.2 Fonksiyonel Monomerler

Damgalı polimerlerde bağlanma bölgeleri oluşurken kalıp molekül ile etkileşen monomerlerin fonksiyonel grupları sorumludur. Non-kovalent etkileşimlerde polimerizasyon ortamına fonksiyonel monomerlerin kalıp moleküle göre aşırısı konarak dengenin kalıp molekül-monomer kompleksi oluşumu yönüne kayması sağlanır. Kalıp molekül:monomer oranı bu tip etkileşimlerde 1:4 veya daha fazla alınmaktadır.

Çizelge 1.1 Moleküler damgalı polimer sentezinde kullanılan bazı fonksiyonel monomerler

Fonksiyonel Monomer	Monomerin Yapısal Formülü
Akrilik asitler (R=H, CH ₃ , CF ₃ , CH ₂ COOH)	
Vinilbenzoik asitler	
Akrilamidosülfonik asitler	
Aminometakril amidler	
N,N'-Dietil-4-vinilbenzamin	
Vinilimidazoller	

Çizelge 1.1 (Devam) Moleküler damgalı polimer sentezinde kullanılan bazı fonksiyonel monomerler

Vinilpiridinler	
4-(Vinilbenzil)iminodiasetik asit	

1.2.3 Çapraz Bağlayıcılar

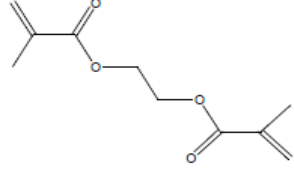
Çapraz bağlayıcı, kalıbın polimerden uzaklaştırılmasından sonra kararlı ve analiti hafızasında tutan polimer ağ örgüsü oluşturmak için kullanılır(20).

Moleküler damgalı polimer hazırlanmasında çapraz bağlayıcıların üç işlevi vardır. Bunlar ;

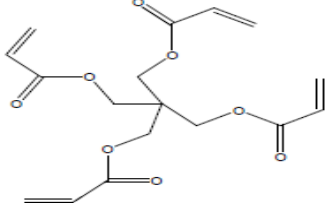
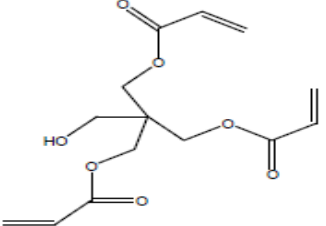
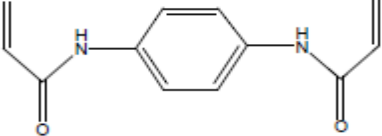
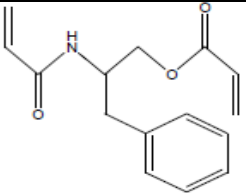
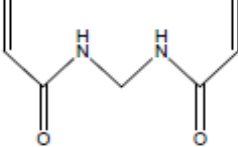
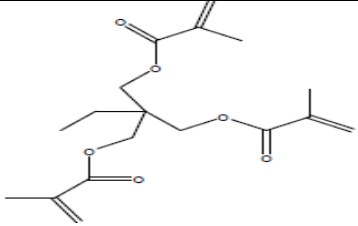
- (1) Polimerin morfolojisinin kontrolü (jel tip, makroporöz ya da mikrojel formatı),
- (2) Polimerde oluşan bağlanma bölgelerinin stabilizasyonu ,
- (3) Polimerin mekanik stabilitesini sağlamaktır.

Makroporöz yapılı polimer oluşturmak için yüksek oranda çapraz bağlayıcı kullanılması(polimer karışımının %80'ni oranında) ve polimerizasyon esnasında çapraz bağlayıcı ile monomerler arasındaki etkileşimin kontrol altında tutulması gerekir. Çoğu kez istenmeyen etkileşimlerin gerçekleşmesi (vinil monomerleri bir çok çapraz bağlayıcı ile reaksiyon verebilir) polimerin tanıma etkinliği olumsuz etkiler.

Çizelge 1.2 Moleküler damgalı polimer hazırlarken kullanılan çapraz bağlayıcılar

Çapraz Bağlayıcı	Çapraz Bağlayıcının Moleküler Yapısı
Etilen glikol dimetakrilat (EGDMA)	
p-Divinilbenzen	

Çizelge 1.2 (Devam) Moleküler damgalı polimer hazırlarken kullanılan çapraz bağlayıcılar

Pentaeritrol tetraakrilat	
Pentaeritrol triakrilat	
N,N'-1,4-fenilendiakrilamid	
N,O-bisakriloil-L-fenilalaninol	
N,N'-metilendiakrilamid	
Trimetilolpropan trimetakrilat (TRIM)	

1.2.4. Çözgen (Porojen)

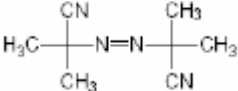
Çözgen ; kalıp molekül, monomer, çapraz bağlayıcı ve insiyatörü tek faz halinde çözmesini sağlar. Aynı zamanda polimerde kavite oluşumundan da sorumlu olduğu için porojen olarak da adlandırılır. Polimerin morfolojisi ve porların boyutları çözgenden doğrudan etkilenir. Por oluşumunun yanı sıra non-kovalent damgalamada kalıp molekül ile monomer arasındaki etkileşimin hangi bağ türünde olacağını da kullanılan porojen belirler. Çözücü polimerizasyon bileşenlerini çözmesine, tüm bileşenlerin tek fazda bulunmasına ilaveten gözenek oluşumunu ve sıcaklık dağılımını sağlar. Genellikle sentez için polar olmayan organik çözücülerin kullanıldığı MIP'ler polar organik çözücülerin kullanıldığı MIP'lerden daha iyi seçiciliğe sahiptir (21). MIP'ler farklı çözücülerde farklı şişme özellikleri gösterirler. Şişme fonksiyonel grupların üç boyutlu yapısını değiştirdiği için ve bu MIP'in seçiciliğinin değişmesine yol açtığından analit tanıma basamağında daha zayıf bağlanmalar oluşmaktadır. Hidrojen bağı oluşumu çözgenin polaritesine ve hidrojen bağı yapabilme etkinliğine, iyonik etkileşimler düşük sıcaklıkta, dipolar etkileşimler polar çözgenlerde oluşur. Genelde kalıp molekülün yapısına ve çözünürlüğüne bağlı olarak uygun ve yüksek bağlanma afinitesini sağlayacak çözgenler seçilir. Hidrojen bağı oluşumuna dayanan polimerlerde genelde asetonitril, kloroform, diklorometan, toluen, tetrahidrofuran seçilebilir. Hidrofobik etkileşimlere dayalı bir polimer hazırlanacaksa en uygun çözgen sudur.

1.2.5. İnsiyatörler (Başlatıcılar)

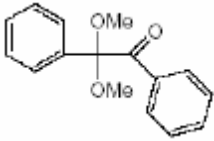
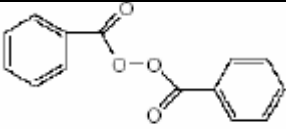
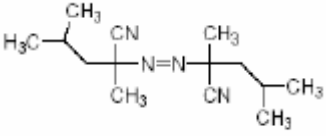
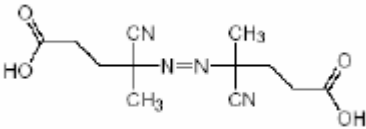
İnsiyatörler ; farklı kimyasal özellikte olup serbest radikal polimerizasyonu başlatma görevini üstlenir. Başlatıcıların radikal formuna dönüşme hızı ve şekli kimyasal yapısına bağlıdır. Bu yapılar ısı, ışık veya kimyasal/elektrokimyasal etkiyle oluşabilir.

Oksijen serbest radikal polimerizasyonunu engeller. Bu nedenle çözünmüş oksijenin polimerizasyondan önce monomer çözeltisinden uzaklaştırılması gerekmektedir. Çözünmüş oksijenin uzaklaştırılması ultrasonikasyonla veya çözeltiden azot veya argon gibi inert bir gazın geçirilmesi ile sağlanır(5).

Çizelge 1.3 Moleküler damgalı polimer hazırlarken kullanılan başlatıcılar

İnsiyatör	İnsiyatörün Molekül Formülü
Azobisisobutironitril	

Çizelge 1.3 Moleküler damgalı polimer hazırlarken kullanılan başlatıcılar (Devam)

Azobisdimetilvaleronitril	
Dimetilasetal benzil	
Benzoil peroksit	
4,4'-azo(4-siyanovalerik asit)	

1.3 Moleküler Damgalama Teknolojisinde Uygulanan Kimyasal Stratejiler

Kalıp moleküle spesifik moleküler damgalı polimerin oluşması esnasında kalıp molekül ve monomer(ler) arasında oluşan kimyasal bağlar ; kovalent ,kovalent olmayan bağlar (non-kovalent) ve metal iyon etkileşimi olabilir. Genelde kovalent ,yarı-kovalent ve kovalent olmayan damgalama stratejileri kullanılır.

Moleküler damgalamada kalıp molekülün fonksiyonel monomer(ler) ile kovalent veya non-kovalent olarak etkileşmesini esas alan iki ana strateji mevcuttur. Bu iki stratejinin avantaj ve dezavantajları şu şekilde sıralanabilir:

Non-kovalent Etkileşimlerin Avantajları

- 1) Non-kovalent etkileşimler pre-polimerizasyon kompleksinin oluşturulması için sentetik bir adıma ihtiyaç duymaz. Monomer ve kalıp molekül arasındaki etkileşimler tüm bileşenlerin çözelti içinde karıştırılmasıyla kolayca elde edilir.
- 2) Kalıp molekülün polimerden uzaklaştırılması nispeten daha kolaydır ve sürekli bir ekstraksiyonla kalıp molekül ortamdan uzaklaştırılır.
- 3) Non-kovalent yöntemler kullanılarak MIP bağlanma bölgelerine farklı özellikte fonksiyon gösteren yapılar katılabilir. Kalıp molekülün bağlanması ve salınması hızlıdır.

Non-kovalent Etkileşimlerin Dezavantajları

- 1) Damgalama işlemi açık değildir (monomer-kalıp molekül kompleks oluşumu tamamıyla stokiometrik değildir).
- 2) Karışımlarda non-kovalent etkileşimleri maksimum düzeyde tutabilmek için polimerizasyon koşullarının çok iyi seçilmesi gereklidir.
- 3) Dengenin kompleks oluşum yönüne kayması için ortama fonksiyonel monomerlerin aşırısı konulmakta ve bu da nonspesifik bağlanma bölgelerinin oluşumuna neden olmaktadır.

Kovalent Etkileşimlerin Avantajları

- 1) Monomer-kalıp molekül konjugatları stabil ve stokiometriktir. Moleküler damgalama işlemi ve ayrıca polimerdeki bağlanma bölgelerinin yapısı non-kovalent etkileşimlere göre daha açıktır.
- 2) Konjugatlar kovalent etkileşimler ile gerçekleştiğinden stabildir ve yüksek sıcaklık, düşük ve yüksek pH , polar çözümler gibi farklı polimerizasyon koşulları uygulanabilir.

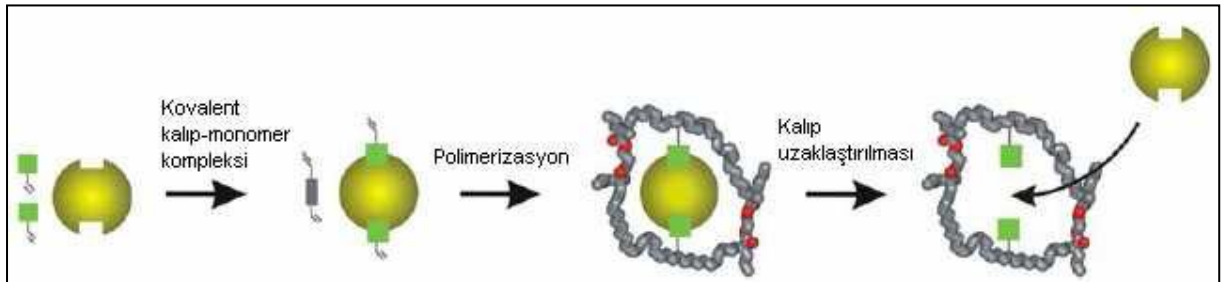
Kovalent Etkileşimlerin Dezavantajları

- 1) Monomer-kalıp molekül konjugatının sentezi zordur ve ekonomik değildir.
- 2) Kullanılan kovalent etkileşimlerin sayısı sınırlıdır.
- 3) Kovalent bağların kırılması adımı zor koşullarda gerçekleştiğinden damgalama etkisi azalmaktadır(22-23).

1.3.1. Kovalent Damgalama

Kovalent damgalama; bir ya da daha fazla polimerize olabilen gruba sahip monomerler ile kovalent bağ yapan kalıp molekül arasındaki kimyasal reaksiyon sonucu gerçekleşir. Kalıp molekül-monomer kompleksinin etkileşmesinden sonra ortama yüksek oranda çapraz bağlayıcı ve porojen eklenir. Ardından kalıp molekül ortamdan hidrolitik yöntemlerle uzaklaştırılır(Şekil 1.3).

Kovalent damgalamada; monomer- kalıp molekül kompleksleri stabil ve stokiometriktir. Bu yüzden oluşan bağlanma bölgelerinin karakterinin açıklanması oldukça kolaydır. Yüksek sıcaklık, düşük/yüksek pH, yüksek polaritede çözümler kullanılarak hazırlanan polimerlerde monomer ile kalıp molekülün oluşturduğu kompleks arasındaki kovalent bağların stabil olması sağlanır. Ancak monomer- kalıp molekül kompleksinin hazırlanması zaman alıcı ve pahalıdır.



Şekil 1.3 Kovalent moleküler damgalama yönteminin şematik görünümü

Başarılı bir kovalent damgalama için ;

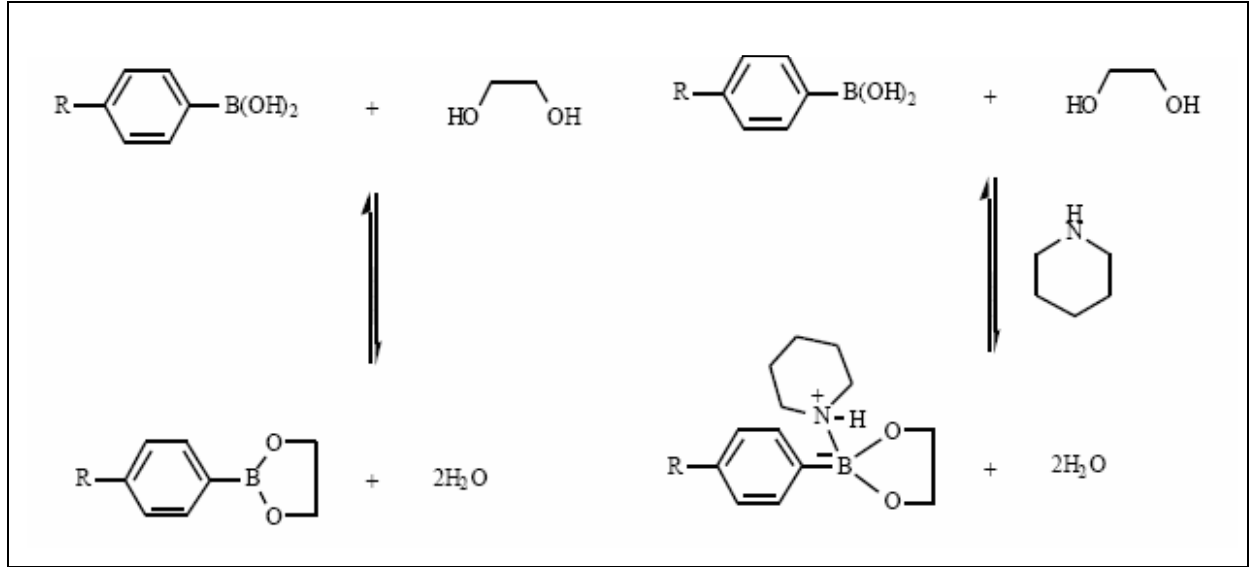
a) Fonksiyonel monomer- kalıp molekül arasında oluşturulacak kovalent bağın (stabil ve geri dönüşümlü bağlar) iyi seçilmesi gerekir.

b) Ayrıca polimerizasyon aşamasından etkilenmemeli ve damgalı bölgelere zarar vermeden kalıp molekül ortamdan uzaklaştırılmalıdır. Bu özelliklere sahip kovalent bağlar sınırlıdır.

Kovalent moleküler damgalı polimerlerde kullanılan bağlar; boronik asit esterleri, asetaller, ketaller, schiff bazları, disülfid bağları, koordinasyon bağlarıdır.

1.3.2 Boronat Esterleri ile Damgalama

Boronik asit esterleri, boronik asit ve cis- 1,2- ya da cis-1,3-diol bileşiklerinden sentezlenir. Ester oluşumu ve dissosiyasyonu hızlı ve kolaydır. Susuz ortamda geri reaksiyon meydana gelmez. Polimerizasyondan sonra hidroliz ile bu bağlar kırılır ve konjugatlardaki boronik asit grupları hedef molekülün tekrar bağlanabilmesi için uygun bir şekilde düzenlenir. Bağı parçalanma reaksiyonu hızlı gerçekleşir ve kalıp molekül polimerden % 85- 95 oranında uzaklaşır. Kalıp molekülün tekrar polimere bağlanması yavaştır. Boronat esterleri iki ya da daha fazla cis-diol formu ile sahip olduğu için en çok karbohidrat damgalı polimerlerde hazırlanır.



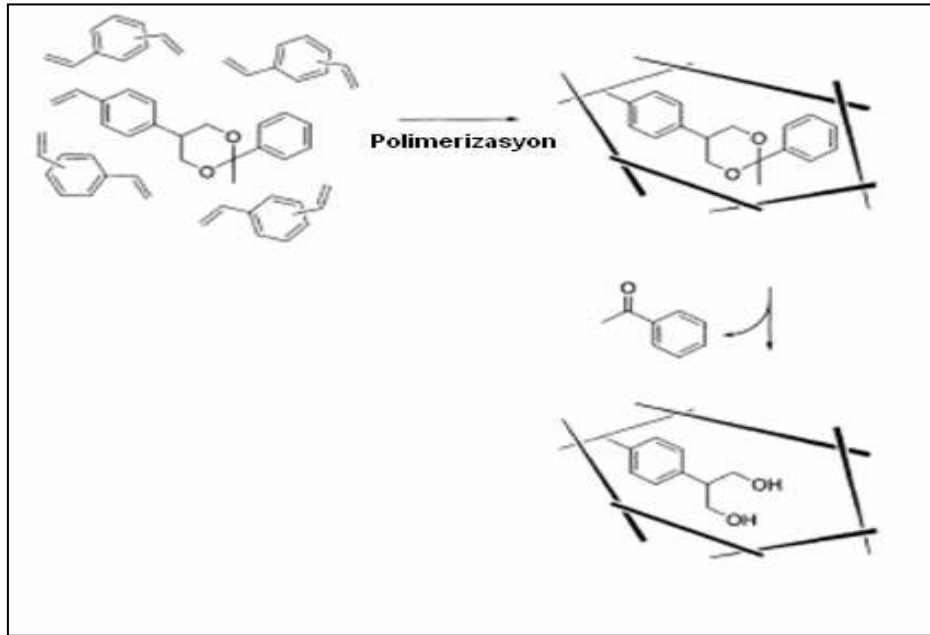
Şekil 1.4 Trigonal boronik asit ve tetragonal boronik asit oluşumu

1.3.3 Karbonat Esterler ile Damgalama

Polimerize monomer kalıp molekül ile divinil benzen tabanlı polimer arasında oluşan ester bağları oldukça güçlü kovalent bağlardır. Kalıp molekül ortamdan uygun reaktifler veya hidrolize ile uzaklaştırılır. Kalıp molekülün polimere tekrar bağlanması alkol bileşikleriyle birlikte açıl klorür ya da karboksilik asitin bromür tuzunun yer değiştirmesiyle gerçekleşir. Karboksilik asit oluşumuyla gerçekleştirilen polimerlerin yavaş geri bağlanma kinetiği ve ilave kimyasal kullanımı nedeniyle güçlü kovalent bağ oluşumu ile damgalamanın kullanımı sınırlıdır.

1.3.4 Ketal ve Asetaller ile Damgalama

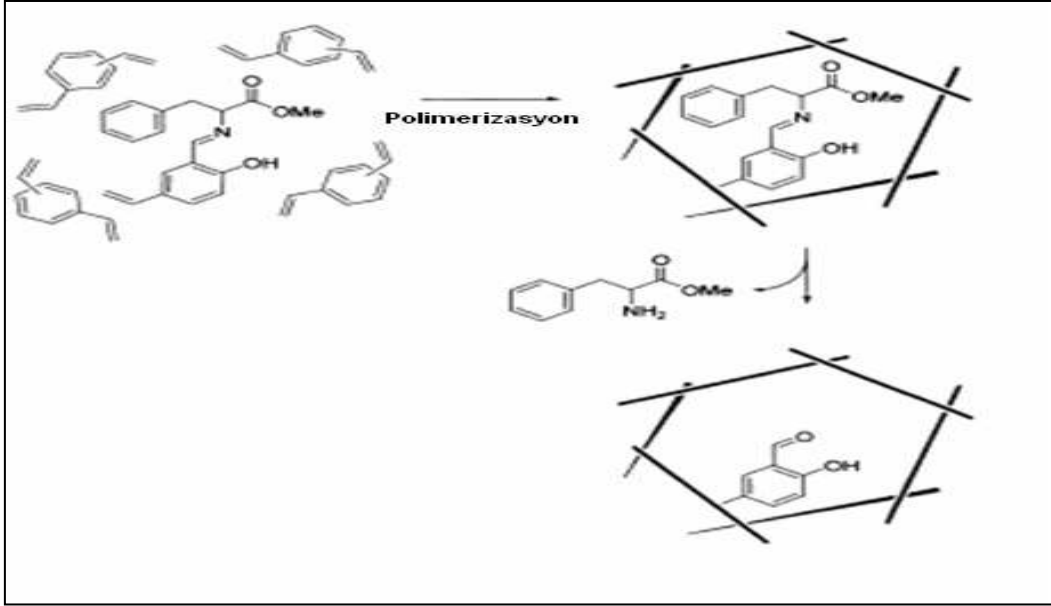
Keton ve aldehit bileşikleri 1,3-dioller ile reaksiyona girdiğinde oluşan ketal ve asetal ürünleri fonksiyonel monomer olarak kullanılır. Bağlanma bölgelerinde yer alan 1,3 diol grupları kalıp molekülün yapısına uygun bir şekilde düzenlenmiş olur.



Şekil 1.5 Ketallerin monomer olduğu kovalent damgalama

1.3.5 Schiff Bazları ile Damgalama

Aldehit bileşiklerinin amino bileşikleri ile reaksiyona girmesi sonucu Schiff bazı oluşur. Bu reaksiyonların oluşumu kolaydır. Bağlanma bölgelerinde amino grubu barındıran yapılar olduğunda bu yapılar aldehit gruplarını bağlamak amacıyla kullanılır. Amino asit türevlerinin damgalanmasında Schiff bazlarıyla çalışmalar bulunmaktadır. Ancak oluşan polimerlerde kalıp molekülün değişimi çok yavaş olduğu için kromatografik uygulamalarda kullanılmak için uygun değildir(24)(25).

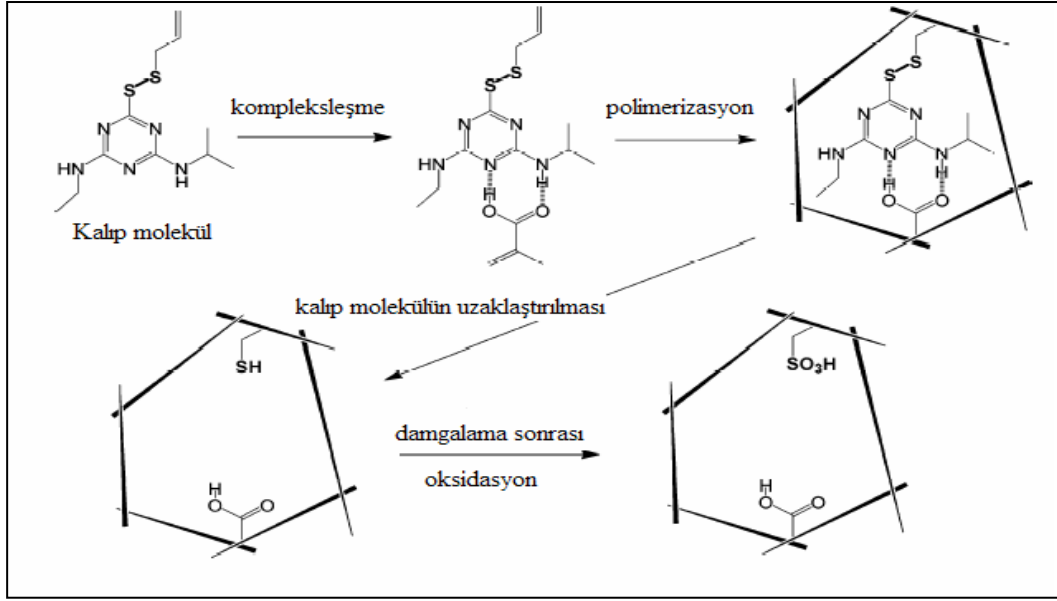


Şekil 1.6 Schiff bazlarının fonksiyonel monomer olduğu kovalent damgalama

1.3.6 Disülfid Bağları ile Damgalama

Polimerdeki -SH grupları hedef molekülü bağlar. -SH ve -OH grupları arasındaki hidrojen bağı -SH ve -HS 'den biraz daha kuvvetlidir. Bu nedenle bu tip polimerlerde OH grubu içeren moleküller tiyol grubu içerenlere göre daha kuvvetli bağlanırlar. Oksijen ve kükürdün atomik büyüklüğündeki farklılık tanımlama bu farklanmayı yaratır.

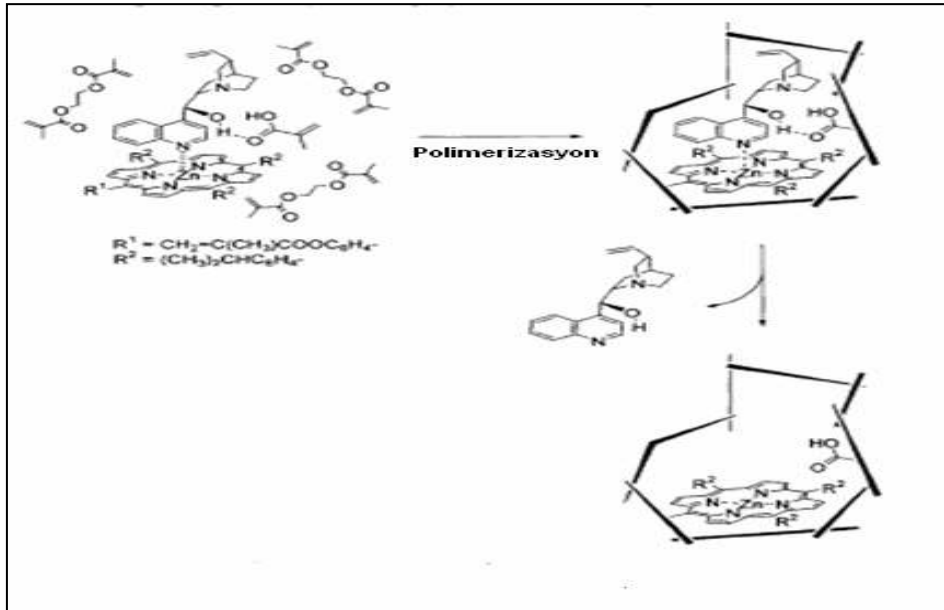
Disülfid bağları polimerizasyon koşulları altında hem yeteri kadar kararlı hem de indirgenme koşullarında kolayca kırılabilir(26-27).



Şekil 1.7 Disülfid bağ üzerinden gerçekleştirilen damgalama işlemi

1.3.7 Koordinasyon Bağı ile Damgalama

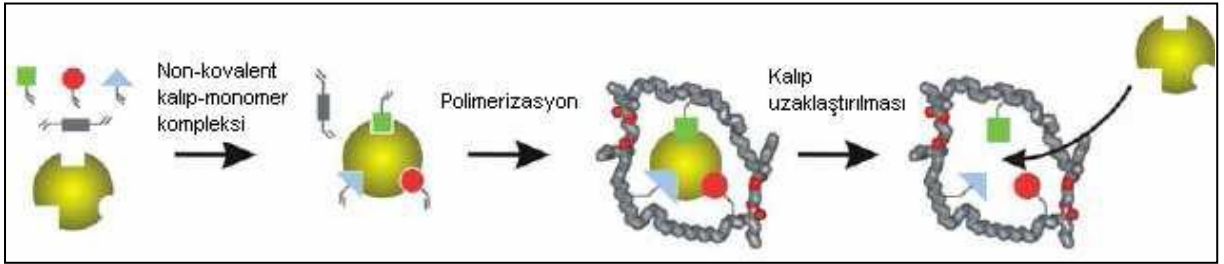
Metal iyonları ile bazı ligandlar arasındaki koordinasyon bağları kovalent damgalama için yeteri kadar stabildir. Vinil grupları metal komplekslere bağlanır ve bu polimerize olabilen metal kompleksleri fonksiyonel monomer olarak kullanılır. Uygun bir ligand (hedef molekül) varlığında polimerize edildiklerinde tüm yapı polimer içinde donar ve ligand uzaklaştırıldığında aynı koordinasyon bağı ile hedef molekülün tekrar bağlanması için kavite oluşur.



Şekil 1.8 Çinko(II)Porfirin kompleksi ve metakrilik asitin fonksiyonel monomer olarak kullanıldığı çinhonidin(cinchonidine) damgalı polimer

1.3.8 Non-Kovalent Damgalama

Non-kovalent damgalamada pre-polimerizasyon aşamasında monomer ve fonksiyonel monomerler uygun porojen, insiyatör ve çapraz bağlayıcı varlığında etkileşirler. Polymer oluşumu gözlemlendikten sonra kalıp molekül basit bir yıkama işlemiyle polimerden uzaklaştırılır ve bağlanma bölgeleri oluşur (Şekil 1.9). Non-kovalent damgalamanın en önemli avantajları kalıp molekül-monomer etkileşimi sonucu oluşan yapıların benzerlerinin hazırlanmasına gerek olmaması, kalıp molekülün polimerden basit bir yıkama ile uzaklaştırılması ve kalıp molekülün polimere hızlıca geri bağlanmasıdır. Ancak monomer-kalıp molekül kompleksinin oluşum kinetiğinin tam olarak aydınlatılmaması bu tekniğin kullanımını sınırlar. Polymerizasyon karışımındaki polymerizasyon koşullarının iyi seçilmesi non-kovalent etkileşimlerin maksimum düzeyde olmasını sağlar. Non-kovalent damgalamanın dezavantajı ise ortama monomerin aşırısının konulması ile non-spesifik bağlanma bölgelerinin oluşumunu artırır.



Şekil 1.9 Non- Kovalent moleküler damgalama yönteminin şematik görünümü

Non-kovalent damgalamada görülen bağlanmalar hidrojen bağları, iyonik etkileşimler, dipol-dipol etkileşimler ve Van der Waals kuvvetleridir. Kalıp molekül ile fonksiyonel monomer polimer çözeltisinde bir araya geldiklerinde uygun olan bağlanmalar kendiliğinden oluşur. Polymerizasyonun başlangıcında oluşan pre-polimer kompleksi oldukça dayanıksızdır ve polymerizasyonun oluşum süresine bağlı olarak arada bir tekrar oluşur. Polymerizasyon oluşum kinetiğinin izlenmesinde bu kararsız ara bileşikten faydalanılır. Monomerler polymerizasyon süresince kalıp molekülün etrafını sarar ve kalıp molekül yıkama işlemi sonucunda monomerlerden uzaklaştıkça uygun boşluklar meydana gelir.

1.3.9 Tek Fonksiyonel Monomer ile Non-Kovalent Damgalama

En basit ve en yaygın non-kovalent damgalama işlemidir. İşlem basit olsa da kalıp molekül ve fonksiyonel monomer arasında oluşan pre-polimer kompleksinin yapısı basit değildir. Ortamda fonksiyonel monomer ve kalıp molekülün konsantrasyonundan daha fazla konsantrasyonda çapraz bağlayıcı olması istenmeyen etkileşimlere neden olur. Ayrıca, fonksiyonel monomer türevlerinin benzeri reaksiyon vermesi de polimerin tanıma kapasitesini olumsuz etkiler. Non-kovalent damgalamada kullanılan monomerler asidik, bazik ya da nötral olarak sınıflandırılabilir.

1) Asidik Monomer : Non-kovalent damgalamada yüksek konsantrasyon, düşük çözgen polaritesi varlığında monomer olarak en fazla metakrilik asit kullanılır. Kolaylıkla bağ yapabilmeleri, kalıp molekül ile H-bağ donörleri, akseptörleri, iyonik oluşum ve zayıf dipol-dipol etkileşimler oluşturmalarından dolayı tercih edilirler. Metakrilik asit ayrıca metil gruplarının birleştirilmesinden de sorumludur ve böylelikle ilave van der Waals etkileşimleri oluşur.

Asidik monomerlere ;metakrilik asit , p-vinil benzoikası ,Akrilik asit ,itakonik asit, Trifloro metakrilik asit ve akrilamido-(2-metil)-propan sülfonik asit örnek gösterilir.

2) Bazik monomerler : Bilinen bazik monomerler 4-vinilpiridin, 2-vinilpiridin, 4-vinilimidazol, 1-vinilimidazol, allilamin, N,N'-dietilaminoetil metakrilamid, N-(2-aminoetil) metakrilamid, N,N'-dietil-4-stirilamidin, N,N,N-trimetil aminoetilmetakrilat, N-vinil pirrolidon, üronik etil ester olarak bilinmektedir. En fazla kullanılanlar vinil-piridinlerdir. Zayıf baz karakterli 4-Vinilpiridin; 2-Vinilpiridin, asidik bileşikler ve e⁻ ihtiyaç duyan aromatik halkalı bileşikler ile reaksiyona girerek asit- baz etkileşimleri meydana getirilir. Vinil- piridinlerin kalıp molekül ile güçlü etkileşimlerde bulunmasıyla geniş uygulama alanları bulmuştur. Polimerde kalıp molekül ile istenmeyen non-spesifik bağlanmalar sulu ortamlarda π - π etkileşimi meydana gelmesi nedeniyle olur. Vinil-imidazol monomerinin hazırlanması zaman alıcıdır. Bu yüzden tercih edilen bazik monomerler arasında değildir. Sadece metal kompleks sistemlerinde kullanılır. Diğer bazik monomerler tersiyer amino monomerlerdir. Bu monomerler de uzun zincirli yapıda olması nedeniyle pek tercih edilmez.

3) Nötral monomerler : Bilinen nötral monomerler akrilamid, metakrilamid, 2-hidroksi metakrilat, trans-3-(3-piridil)akrilik asit, akrilonitril, metil metakrilat ,stiren ,etil stirendir. En fazla kullanılan nötral monomer akrilamid ve N-alkil türevleridir. Akrilamid, düşük polariteli çözgenlerde metakrilik asit ile etkileştiğinde daha iyi H-bağ yapma kapasitesine sahip olur.

1.3.10 Monomer Kombinasyonları ile Non-Kovalent Damgalama

Monomer kombinasyonlarına metakrilik asit:2-Vinil piridin ve Akrilamid:2-Vinilpiridin oluşturduğu spesifik etkileşimler örnek gösterilebilir. Farklı monomerlerin etkileşimlerinden faydalanarak oluşturulan non-kovalent damgalama istenilen bir durum olmasına karşın monomerlerin pre-polimerizasyon karışımındaki denge halleri oldukça karışıktır. Ortamda fonksiyonel monomerlerin aşırısının konulması onların kendi aralarında da reaksiyona girme ihtimalini artırır. Bunun içinde sadece kalıp molekül ile kuvvetli etkileşimler kuracak fonksiyonel monomerler seçilmelidir(28-29).

1.3.11 Tasarlanmış Monomerler ile Non-Kovalent Damgalama

Kalıp molekülün yapısal özelliklerine göre monomerler sentezlendiğinde hidrojen bağ sayısı artırılarak daha iyi seçicilikte tanıma bölgeleri oluşturulur. Moleküler damgalı polimerler farklı kalıp molekül ve fonksiyonel monomerin bir araya gelmesiyle oluşturulan komplekslerden faydalanarak hazırlanabilir.

1.3.12 Semi-Kovalent Damgalama

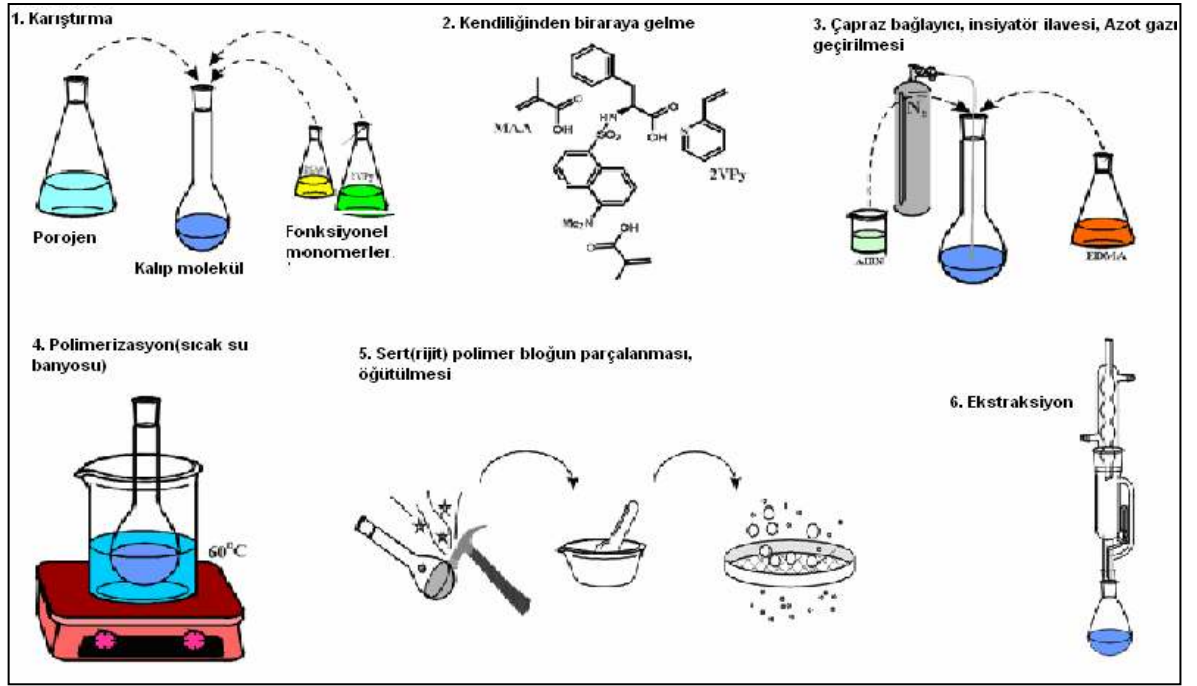
Bu yöntemde polimerizasyon adımı kovalent veya kısmi kovalent kalıp yapısı kullanılırken, bağlanma adımı tamamen non-kovalent olarak gerçekleşir. Kalıp molekülün (met)akrilat ester formu matriks oluşturucu monomer karışımı ile kopolimerize edilir. Ardından kalıp molekül hidroliz ile uzaklaştırılır. Kalıp molekülün polimere tekrar bağlanması esterleşmemiş formu ile (hidroksil grupları ile) bağlanma bölgesinde yeralan metakrilik asidin artıkları üzerinden gerçekleşir(30-31).

1.4 Moleküler Damgalı Polimer Hazırlama Yöntemleri

MIP'in farklı kullanım alanları ve potansiyel uygulamaları polimerlerin farklı özelliklerine dayanır. Spesifiklik, kapasite gibi faktörler özel karakteristik yapı gerektirir. Bu isteğe bağlı olarak damgalı polimerleri hazırlamak üzere çeşitli yöntemler geliştirilmektedir. MIP 'ler yığın, süspansiyon, çok adımlı şişme, çöktürme, emülsiyon, in-situ ve yüzey damgalama polimerizasyon gibi çeşitli yöntemlerle hazırlanırlar.

1.4.1 Yığın(Bulk) Polimerizasyonu

MIP sentezinde ilk kullanılan yöntem yığın polimerizasyon yöntemidir(2). MIP alanında yapılan çalışmalarda genellikle bu yöntem kullanılır. Bu yöntem basit, evrensel ve kimya laboratuvarlarında kullanılabilirliğe uygun olduğu için çok yaygındır. Yığın polimerizasyonda kullanılan bir çok kalıp molekül vardır. Bunlar ; ilaç molekülleri, gıda katkı maddeleri, hormonlar ve steroidlerdir(32-37). Yığın polimer sentezi yapılırken kullanılan polimerizasyon bileşenleri; monomer(ler), kalıp molekül, çapraz bağlayıcı, inisiyator ve porojendir. Bu bileşenler karıştırılır ardından ortamdaki O₂ uzaklaştırılır. Kullanılan polimerizasyon başlatıcı bileşene göre polimer karışımı termal ya da UV polimerizasyona bırakılır(16-24 saat). Bu işlem sonunda polimer oluşumu gözlenir. Bu sert görünümlü polimerler öğütülür. Oluşan polimer düzensiz yapıda ve farklı büyüklüktedir(20-50 µm). Ortamdaki bulunan kalıp molekül yıkamayla uzaklaştırılır (Soxhlet ekstraksiyonu)(Şekil 1.10).

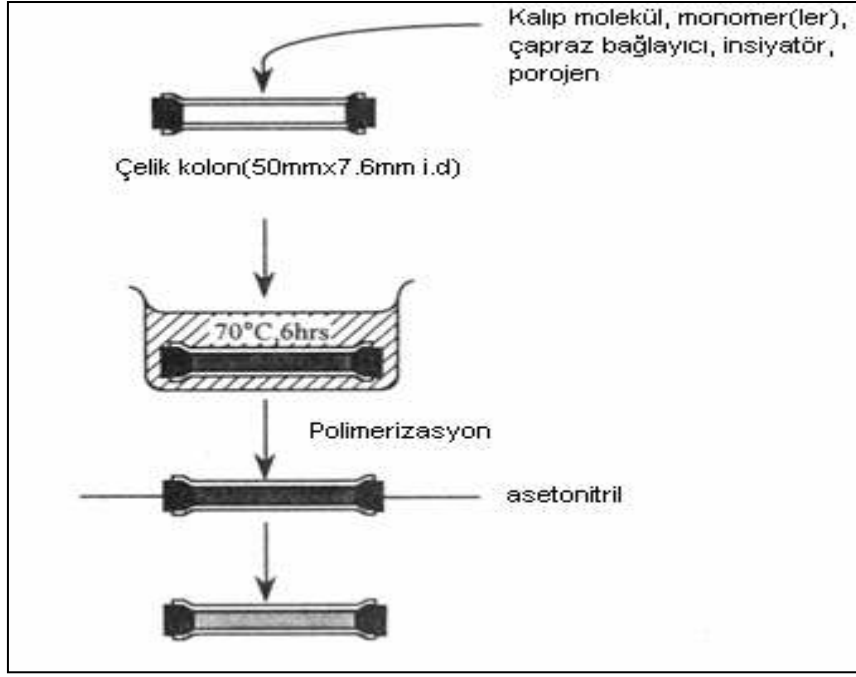


Şekil 1.10 Yığın polimerizasyon oluşum şeması

En yaygın kullanılan yöntem olmasına rağmen oluşan polimerin %50lik kısmının parçalanma ve öğütülme esnasındaki kaybindan, işlem süresinin diğer polimerizasyon yöntemlerinden daha uzun olmasından ve polimerizasyon aşamasının kontrol altında tutulamamasından dolayı heterojen tanıma bölgesi oluşumu diğer yöntemlere oranla daha fazladır. Öğütülme esnasında tanıma bölgelerinde hasar meydana gelme olasılığı da yüksektir.

1.4.2 In-Situ Polimerizasyon

Yığın polimerizasyon yöntemi kullanılarak yapılan damgalama işlemi uzun sürede gerçekleşir. Bu işlem süresini kısaltmak ve kullanımını artırmak amacıyla polimerizasyonun HPLC kolonunda gerçekleştirildiği yığın polimerizasyon yöntemine in-situ polimerizasyon denir. Bu yöntemde hazırlanan polimerizasyon karışımı direkt olarak kolona konulur, uygun koşullarda polimerizasyon gerçekleşirildikten sonra kolondan kalıp molekülün uzaklaştırılması aşamasına geçilir(38).



Şekil 1.11 İn-Situ polimerizasyonu

İşlem, yığın polimerizasyon işleminden daha basit görünsede kolon içinde oluşan polimerde kalıp molekülün spesifik bağlanma bölgelerinin dağılımı homojen değildir ve bağlanma etkinliği olmayan bölgelerin oluşumu yığın polimere oranla daha fazladır(39). Bu alanda optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilir ancak polimerizasyon aşaması kontrol altında tutulamadığı için oluşan polimer blokları HPLC analizinde yüksek geri basınçta yol açmaktadır.

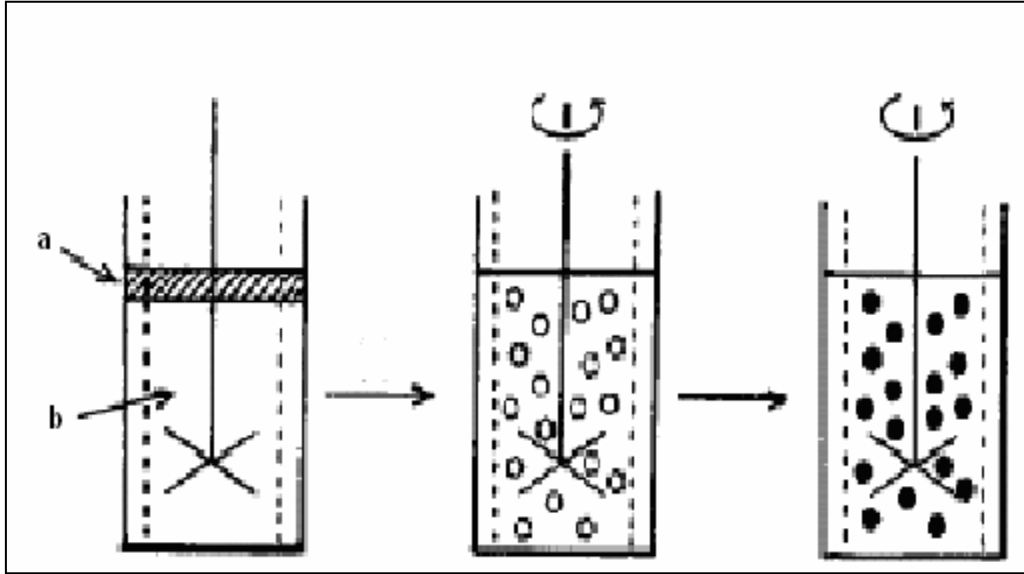
Çizelge 1.4 Yığın polimerizasyon oluşumlarının karşılaştırılması

Metod	Oluşan Ürün	Avantajları	Dezavantajları
Yığın	Öğütüldükten sonra rastgele büyüklükte partiküller	Basit Yapılan çalışma fazla	Zaman alıcı HPLC için uygun olmayan partikül şekli
Yığın(in-situ)	Kolon içerisinde katı blok formunda	Basit Kolon doldurma adımına ihtiyaç yoktur	Yüksek geri basınç, kötü pik şekli Yapılan çalışma azdır

1.4.3 Süspansiyon Polimerizasyon

Mekanik olarak öğütmeye gerek olmadan küresel partiküller elde etmek için kullanılan yöntemlerden biri de süspansiyon polimerizasyon yöntemidir. Ucuz ve fazla miktarda polimer hazırlanmasına imkan veren süspansiyon ve emülsiyon gibi teknikler bu alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Süspansiyon polimerizasyonu su ve organik faz olmak üzere iki fazdan oluşur. Süspansiyon polimerizasyonunun genel olarak gerçekleştirildiği su ortamında non-kovalent etkileşimlerden özellikle hidrojen ve elektrostatik etkileşimler stabil değildir. Apolar karakteri yüksek olan perflorokarbon çözügenleri kullanılarak gerçekleştirilen ters faz süspansiyon polimerizasyonu ile sudan uzak durulabilir. Bu metotta; ortamda su olması non-kovalent etkileşimleri (hidrojen bağı ve iyonik etkileşimler) zayıflatır. Sulu süspansiyon çalışmalarının dezavantajları sadece suda çözünen monomerler ve kalıp moleküllerle kullanılmalarıdır. Ayrıca, polimerizasyon esnasında su monomer ve kalıp molekül ile etkileşime girmek üzere yarış halindedir. Bu durum oluşan moleküler damgalı polimerin seçiciliğini olumsuz etkiler.

Asidik monomerlerin sudaki çözünürlüğünün fazla olması monomerlerin ve çapraz bağlayıcının birbiriyle rastgele kopolimerizasyonu ile sonuçlanır(40). Sulu süspansiyon çalışmalarında bağlanma etkinliği aracı gruplar kullanılarak aşılabılır(41).

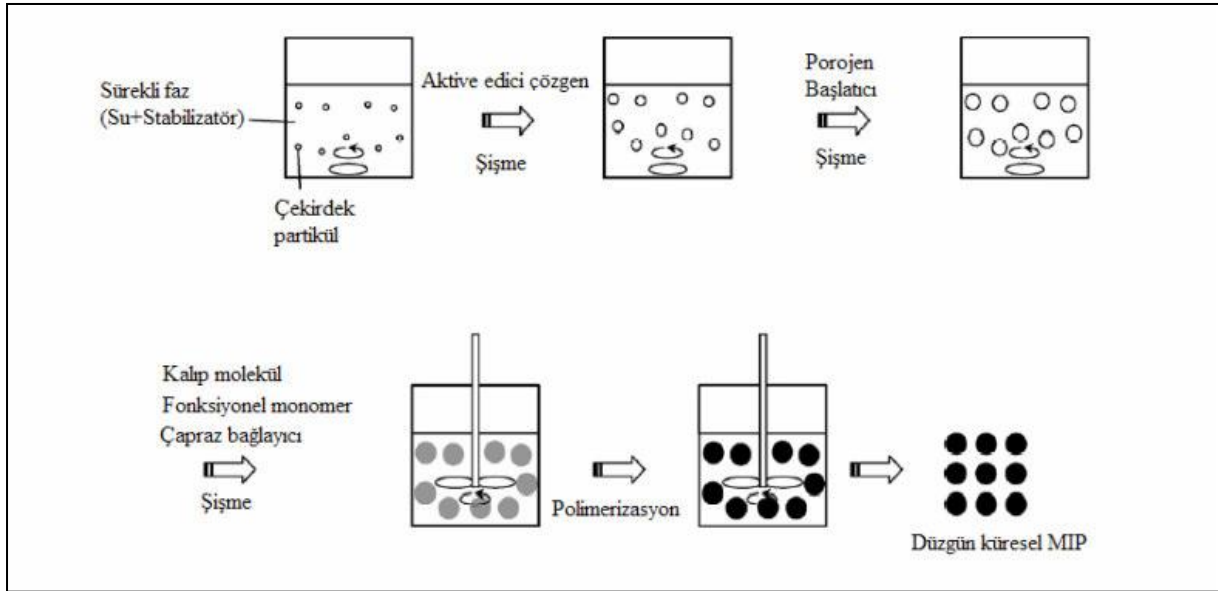


Şekil 1.12 Süspansiyon polimerizasyon a) Organik faz b) Su Fazı

Su fazı yerine non-kovalent etkileşimlere imkân sağlayan perflorokarbonlar ve mineral yağ kullanılarak süspansiyon polimerizasyonu gerçekleştirilebilir.

1.4.4 Çok Adımlı Şişme Polimerizasyonu

Son yıllarda etkinlik ve kütle transfer özellikleri açısından daha iyi özellikte damgalı stasyonier fazların hazırlanmasına yönelik alternatif yöntemler geliştirilmeye çalışılmıştır. Çok çeşitli yöntemler ile mikrometre büyüklüğünde damgalı polimerler sentezlenmiştir. Çok adımlı şişme polimerizasyon ile uniform küresel partiküller elde edilmektedir. Partiküller direkt olarak kontrol edilebilir çapta ve küresel formda hazırlanır. Demir oksidin katılımı ile bu partiküller magnetik olarak sentezlenebilirler. Her ne kadar bu yolla elde edilen partiküller kromatografik uygulamalarda kullanılmaya uygun olsa dahi karmaşık işlem adımları ve reaksiyon koşulları vardır (Şekil 1.13). Sulu süspansiyonların kullanımı damgalama işlemiyle girişim yapar bu da seçicilikte düşmeye neden olur(42).



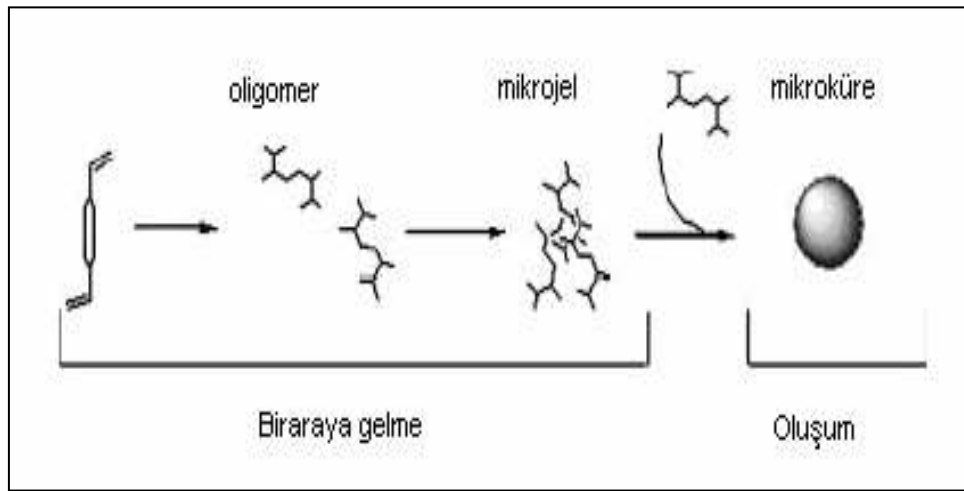
Şekil 1.13 Düzenli küresel MIP 'lerin çok adımlı şişme polimerizasyonu yöntemi ile hazırlanması

1.4.5 Çöktürme Polimerizasyonu

Bu yöntem uygun bir çözgen içinde seyreltik koşullar altında (% 5 w/v) monomer ile çapraz bağlayıcının polimerizasyonunu sağlar. Bu şekilde hazırlanan polimer boncuklar surfaktan kullanılmadan çapraz bağlı yüzeyleri sayesinde birbirlerine yapışmadan oluşurlar. Çöktürme polimerizasyon yönteminde surfaktan ve stabilize edici ajan kullanılmaz. Bu yöntem ile oluşan boncukların kullanımı kolaydır ve boncuklar damgalama sonrası bir modifikasyonla immobilizasyon veya konjugasyon amacıyla da kullanılabilir(43-46).

Geleneksel yöntemle hazırlanan polimerlerde ezme, öğütme, eleme ve küçük partiküllerin uzaklaştırılması ile gözlenen % 50'den fazla olan madde kaybı alternatif düzgün küresel boncuk hazırlama yöntemleri ile en aza indirilmektedir. Çöktürme polimerizasyonu ile elde edilen polimer verimi % 85 oranındadır.

Çöktürme polimerizasyonunun süspansiyon polimerizasyonundan farkı surfaktant veya stabilizatöre ihtiyaç olmamasıdır. Sistem yığın polimerizasyona benzer, tek farkı ortama aşırı miktarda porojen (%5 oranında) eklenmesidir. Monomerler ve inisiyatör, organik çözügede birleşerek oligomerleri oluştururlar polimerizasyon işlemi başladıktan sonra zamanla mikrojeller meydana gelir. Her bir mikrojel ortamdaki oligomerleri kullanarak düzgün yuvarlak mikrokürecikleri oluşturur ve polimerizasyon esnasında reaktördeki karıştırma hızının, çözügenin ve konsantrasyonunun değiştirilmesi ile oluşan küreciklerin boyutu mikro ve nano boyutta olur. Porojen olarak diklorometan ve asetonitril kullanıldığında düzgün mikrokürecikler elde edilir(44,47-51).



Şekil 1.14 Çöktürme polimerizasyonu

Oluşan kürecikler çok küçük ve düzgün olmasına rağmen yığın polimerizasyonun oluşum kinetiğinden kaynaklanan farklı monomer- kalıp molekül etkileşimi heterojen tanıma bölgeleri oluşturur. Bu da seçiciliği düşürür. Çöktürme polimerizasyonu ile oluşturulan polimerlerin HPLC, kapiler elektrokromatografi ve sensör uygulamaları da yapılmaktadır(52-53).

1.4.6 Yüzey Damgalama Polimerizasyonu

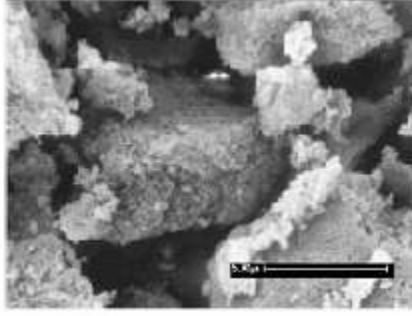
Klasik yöntemlerle hazırlanan polimerlerde karşılaşılan sınırlı kütle transferi ve kalıp molekül uzaklaştırılması problemlerini çözmek amacıyla üzerinde çalışılan yöntemlerden biri de yüzey damgalamadır. Bu yöntem özellikle difüzyon sınırlaması olan makro moleküllerin damgalanmasında oldukça değerlidir. Yüzey damgalamada birkaç yaklaşım söz konusudur ;

1) Altın veya karbon gibi uygun bir substrat üzerine MIP filmi oluşturmaktır. Bu şekilde oluşturulan MIP filmleri kuartz kristal mikrodenge (QCM) veya yüzey plazmon rezonans sensor elektrotları olarak kullanılabilir(54).

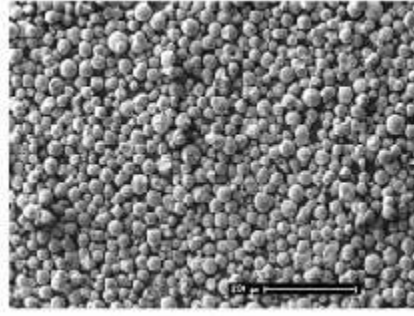
2) Geleneksel yığın polimerizasyona çok benzeyen su-yağ (W/O) emülsiyon yöntemidir. Tek fark olarak ortama N-D-glukono dioleil glutamat gibi bir emülsiyon stabilizatörü konulması gerekmektedir. Ayrıca iki yüzey arasında aktif olan dioleil fosforik asit (DOLPA) gibi fonksiyonel monomerler sentezlenmelidir. Bu şekilde fonksiyonel monomer(ler) polimerizasyon sırasında su-yağ fazında kalıp molekül ile etkileşime girerek bağlanma bölgelerini oluştururlar. Bu yöntem ile amino asitler, nükleotidler ve metal iyonları başarılı bir şekilde damgalanmıştır(55).

Çizelge 1.5 Moleküler damgalı polimer hazırlama yöntemleri

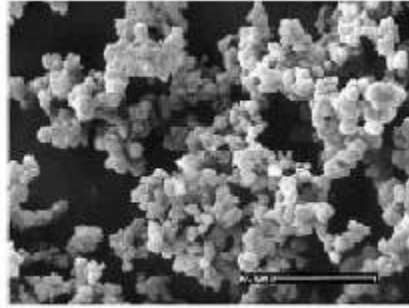
MIP Formatı	Avantajları	Sınırlamaları
Yığın Polimerizasyon	Basit polimerizasyon ve yaygın uygulanabilirlik, Özel bir alet ve yetenek gerekmemesi	Öğütme, eleme ve kolon doldurma işlemlerinin zaman alıcı olması Partikül boyu ve şeklinin düzensiz olması ve düşük performans
Suspansiyon Polimerizasyon	Küresel partiküller, Tekrarlanabilir sonuçlar, Büyük skalada çalışma olanağı	Fazların karışıp sistemi bozma olasılığı Suyun çoğu damgalama işlemiyle uyumsuz olması özel surfaktan polimere gereksinim duyulması
Çok adımlı şişme polimerizasyonu	Çapı kontrol edilebilir küresel boncuklar, HPLC için uygun partiküller	İşlem adımlarının ve reaksiyon koşullarının karışık olması, Sulu emülsiyonlara ihtiyaç duyulması
Çöktürme polimerizasyon	Damgalı mikrokürecikler, Yüksek verim ve benzer büyüklükte kürecikler	Fazla miktarda kalıp molekül kullanılması, Yüksek seyrelme faktörü
Yüzey Polimerizasyonu	Düzenli küresel ürün, İnce damgalı tabakalar	Sistemin karışık ve işlemin zaman alıcı olması
In-situ polimerizasyon	Tek adımlı in-situ hazırlama, iyi porözlük, düşük maliyet	Her yeni kalıp molekül için optimizasyon çalışmalarının yapılması gerekliliği



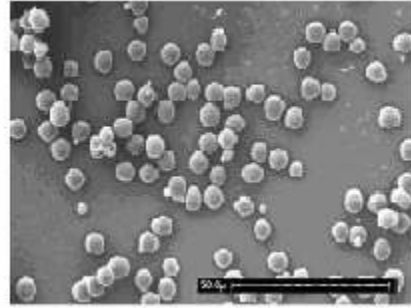
A) Yığın Polimerizasyon



B) Süspansiyon Polimerizasyon



C) Çöktürme Polimerizasyonu



D) Çok Adımlı Şişme Polimerizasyonu

Şekil 1.15 Farklı polimerizasyon metodlarıyla elde edilen polimer örnekleri(45)

1.5 Moleküler Damgalı Polimerlerin Kullanım Alanları

MIP'ler polimerler farmokolojik, analitik, biyolojik seçici moleküller tanıma alanlarında ve kontrollü salınım sistemlerinde yoğun bir şekilde kullanım alanı bulmaktadır (56). Sıvı kromatografisi, kapiler elektroforez, kapiler elektrokromatografi ve katı-faz ekstraksiyon gibi analitik tekniklerde kullanımı sürekli artmaktadır(31). Bir diğer uygulama alanı ise sensörlerde tanıma elamanı olarak kullanılmaktadır(57).

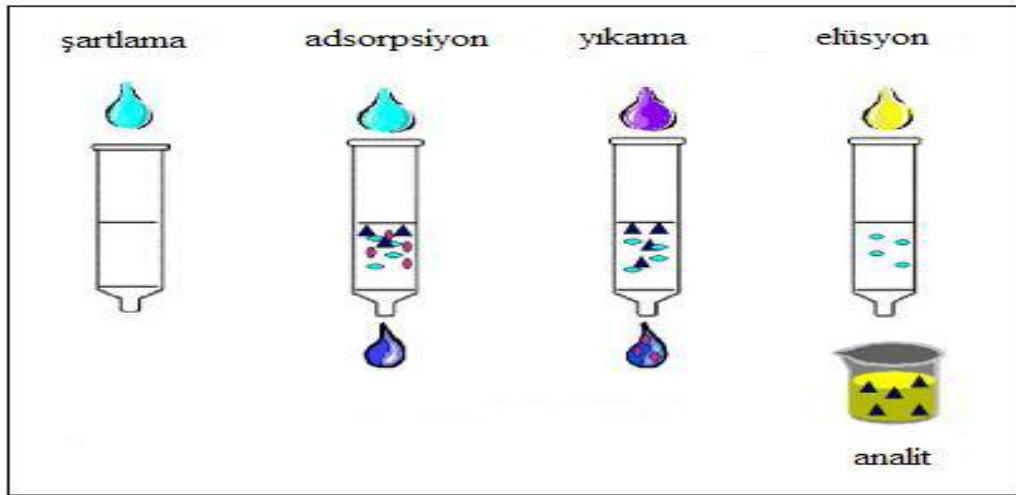
1.5.1 Kromatografi

1.5.1.1 Katı Faz Ekstraksiyonu (SPE)

Katı- faz ekstraksiyonu (SPE) kompleks matriks ortamında ya da düşük derişimdeki analitin analizinde yaygın olarak kullanılan ön deriştirme ve ayırma tekniğidir. Bu tekniğin temeli sulu fazdan komşu katı fazdaki aktif bölgelere analitlerin transferi esasına dayanır. Katı faz daha sonra örnek ortamından uzaklaştırılarak elüsyon ile analitler geri kazanılır. Katı faz girişime neden olan maddelerin elüminasyonu ve matriksin kompleksliğini azaltmak için seçici elüentlerle yıkanır. Çözücü, katı fazdan analitin hızlı uzaklaşmasını sağlayabilmelidir(58).

Moleküler damgalı polimer katı faz ekstraksiyonunda örneğin seçimli ayırımını sağlaması, ortamdan istenmeyen diğer bileşiklerin uzaklaştırılması, ortamdan ayırımı sağlanan molekülün aynı zamanda konsantre olmasını sağlaması gibi avantajlarının yanında aynı zamanda hızlı, basit, kararlı olması, katı fazın tekrar kullanılabilmesi, yüksek ön deriştirme faktörü elde edilmesi, az miktarda çözücü kullanılması ve ucuz olması gibi üstünlükleri vardır.

Katı faz ekstraksiyonu (SPE) metodu daima dört başarılı adımdan oluşmaktadır(Şekil1.16)



Şekil 1.16 Katı faz ekstraksiyon basamakları

1) Şartlandırma : MIP'teki bağlanma bölgeleri örnek karışımı uygulanmadan örnekteki hedef molekülün maksimum düzeyde bağlanabilmesi için uygun koşullarda aktiflenir.

2) Adsorpsiyon : Karışımın yüklenmesi esnasında dikkat edilmesi gereken en önemli nokta örnek karışımının kimyasal yapısı ya da çözündüğü ortamdır. Perkloratlı bir örnek düşük polariteli çözügenle MISPE'ye uygulandığında, hedef molekül MIP'te tutunurken, istenmeyen diğer bileşikler tutulmayacaktır. MISPE'nin en sorunlu örnekleri sulu ortamda hazırlanan örneklerdir. Su, hedef molekül ve diğer girişim yapacak moleküllerin aynı anda non-spesifik bağlanmasına neden olur ve bu moleküller ortamdan uzaklaşmazlar.

3) Yıkama : Seçimli bir ayırımın gerçekleştirilmesi için örneğin ortamdan elüsyonundan önce ortamın organik bir çözügen ile yıkanması MISPE'de oldukça önemlidir. Bu çözügenin pH'ı, hacmi, kimyasal yapısı MIP'e göre optimize edilmesi gerekir. Bu yıkama çözeltisi MIP ile hedef molekülün etkileşimini bozmamalıdır. Bundan dolayı genelde düşük polariteli organik çözügenler, diklorometan, toluen ya da kloroform yıkama çözeltisi olarak seçilir(59-60). Bazı çalışmalarda polimerin hazırlandığı porojen de kullanılmıştır. Çalışılacak örnek perkloratlı bileşikler içeriyorsa yıkama adımından önce polimer tamamen kurutulursa bu problemde ortadan kalkar.

4) Elüsyon : Yıkama adımı MISPE'nin en önemli adımı gibi görülsede seçimli bir ayırım için örneğin ortamdan elüsyonu da önemlidir. Bu amaç için genelde organik çözgen karışımları ya da organik çözgen-modifiyer(asetikasit, piridin) kullanılabilir. Örnek MISPE kartuşundan elüe olduktan sonra spesifik bir dedeksiyon sistemiyle birleştirilebilir. MISPE sistemleri genelde HPLC ile birleştirilerek kullanılır(kesikli ya da kesiksiz).

1.5.1.2 Kesikli (off-line) MISPE Çalışmaları

Kesikli MISPE analizleri için polietilen kartuşlar kullanılır. Bu kartuşlar 15-500mg aralığında MIP ile doldurulur. Katı faz ekstraksiyon adımları kartuşlara uygulanır. Elüsyon adımından sonra toplanan ekstrakt analitik bir sistemde LC, GC ya da CE de analizlenir(61-63). Kesikli MISPE nehir, yeraltı suları, atık sular, deniz suyu, toprak ekstraktları gibi çevresel örneklerden; idrar, kan, serum, plazma gibi vücut sıvılarından; doku örneklerinden ve gıdalardan birçok bileşiğin ekstraksiyonunda kullanılır.

1.5.1.3 Kesiksiz (on-line) MISPE Çalışmaları

MISPE çalışmalarında kullanılan kartuşların HPLC kolonları ile birleştirilmesi sonucu anında ölçüm yapılabilen sistemler oluşur. Bu sistemlere kesiksiz MISPE sistemleri denir. Bu sistemlerde kolonlar polimer ile doldurulur. Polimer ile doldurulan pre-kolon HPLC sistemine yerleştirilir. Bu sistemde sıvı kromatografisinin hareketli fazı, MISPE'nin elüsyon çözeltisidir. Böylece sıvı kromatografisinde tanımlanabilen MIP'te tutulmuş elüe kalıp molekül elde edilir. Spesifik etkileşimleri ortadan kaldırmak için güçlü asit ya da bazlar modifiye edici olarak kullanılır. Kesiksiz MISPE'nin dezavantajları ; kullanılan güçlü asit veya baz çözeltilerinin kromatografik ayırmada sorun yaratması ve elüsyon adımından sonra polimerin kurutulmamasıdır. MISPE'nin avantajı ise kalıp molekülün seçimli ve yüksek miktarda temizlenebilmesini sağlaması ve çalışmaların maliyetlerinin düşük olmasıdır. Kesiksiz MISPE'nin kullanılabilirliği biyolojik moleküller ile yapılan uygulamaların optimizasyon aşamasında olması ve farklı biyomolekül uygulamalarının yapılması ile artar(64).

Çizelge 1.6 MIP'lerin katı faz ekstraksiyonunda kullanımlarının avantaj ve dezavantajları

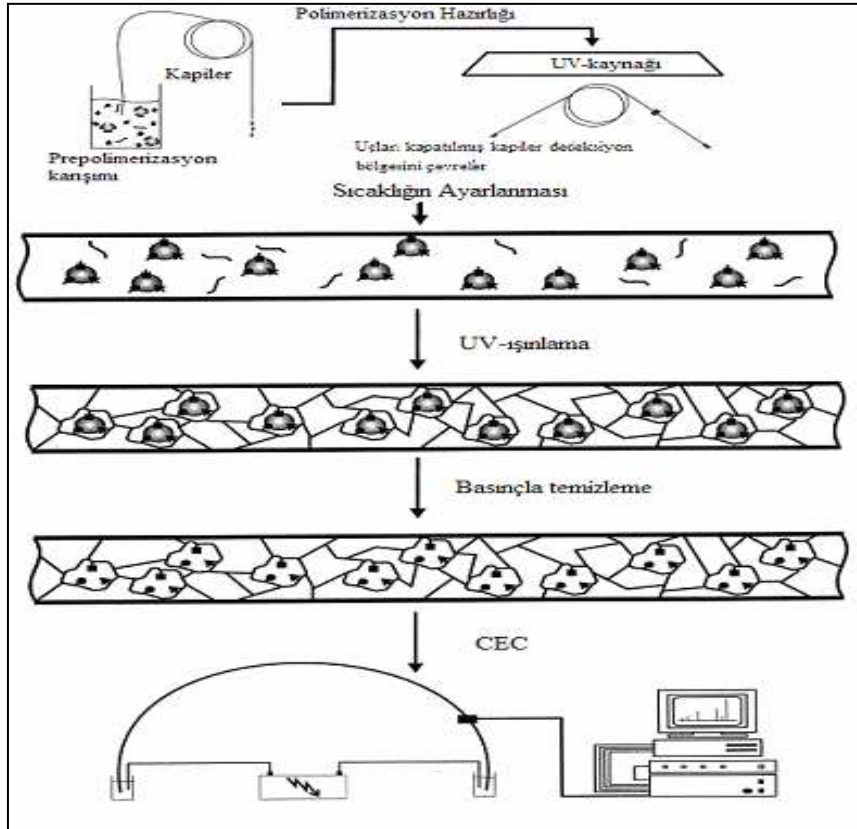
Avantajları	Dezavantajları
Belirli bir bileşik veya bileşik sınıfı için yüksek seçicilik	Yeni analitler için yeni damgalı polimerlerin sentezinin gerekliliği
Organik çözgenlerde çalışabilirliğinin iyi olması	Moleküler damgalı polimerler ile istenilen seçicilik profilinin elde edilebilmesi için analitik uygulamalara açık olması gerekliliği

Çizelge 1.6 (Devam) MIP'lerin katı faz ekstraksiyonunda kullanımlarının avantaj ve dezavantajları

Metodların hızlı gelişmesi	Polimerlerin şişmesi veya büzüşmesi durumunda sorbent bütünlüğünün bozulması ve tekrar kullanımının kısıtlanması
Uç pH değerlerinde ve organik çözügenlerde stabil olması ve 120 °C ' ye kadar ısıtılabilmesi	Polimerden kalıp molekülün tamamen uzaklaştırılmasının zor olması
Kısıtlı kullanım sayısına sahip olan immunoafinite kolonlarına göre daha ucuz olması	Kullanımı sırasında kalıp molekül sızmasının olasılığı

1.5.2 Kapiler Elektrokromatografi

Moleküler damgalı polimerler kapiler elektrokromatografide stasyonere faz olarak kullanılmaktadır. Kapiler elektrokromatografisinin yüksek seçiciliği ve geri basıncı yoktur. Aynı zamanda sıvı kromatografisinde kullanılan MIP kolonlarında pik genişlemesi ve kuyruklanması görülmektedir. Bu yüzden moleküler damgalı polimerler kapiler elektrokromatografisinde kullanım alanı bulurlar(51). MIP stasyonere fazlarında rastlanan bazı sorunlar nedeniyle MIP'lerin kapilerin içine doldurulması ya da hazırlanması farklı şekillerde gerçekleşir.



Şekil 1.17 MIP ile dolu kapiler kolonun hazırlanması

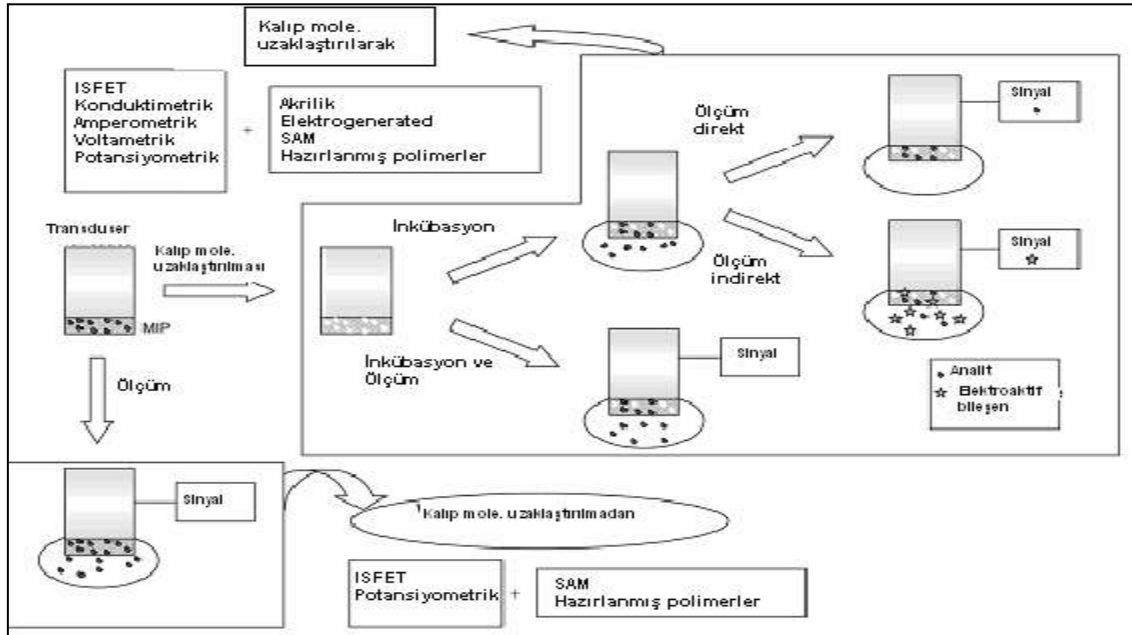
1.5.3 Sıvı Kromatografisi

Sıvı kromatografisinde ayırma kolon içindeki katı faz ile kolondan geçen sıvı faz olmak üzere iki faz arasında gerçekleşir. MIP'lerin ilk uygulamaları kesikli tip denemelerde olmuştur. Ancak günümüzde sentezlenen polimerler sıvı kromatografisi kolonundan ilgili kalıp molekülün uzaklaştırılmasına yönelik çalışmalar da yapılmaktadır. Ayırım gücünü belirleyen faktörler ; teorik plaka sayısı, rezolüsyon faktörü ve pik asimetri faktörüdür. Bu faktörlerin sayısal değerini de hazırlanan polimerin kolona doldurulan miktarı ve kütle transferi belirler.

MIP-HPLC çalışmalarında genellikle yığın polimerler kullanılır. Daha düzgün yapılı ve homojen tanıma bölgelerine sahip MIP'ler ile etkin tanıma yapılabilir. Fakat bu sistemlerin optimizasyonu ve polimerlerin hazırlanma maliyeti yığın polimer sistemlerine göre daha yüksektir.

1.5.4 Sensör Uygulamaları

Sensörler; özellikle çevre ve gıda proseslerinde enzim, antikor, mikrop gibi biyolojik moleküllerin varlığında hedef molekülün tanınması amacıyla kullanılan analitik sistemlerdir. Ancak kullanılan bu biyomoleküllerin pH, sıcaklık ve organik çözügenlere karşı dayanıksız olmaları sistemin dezavantajını oluşturur. Moleküler damgalı polimerler ile biyosensörlerin birleştirilmesi sonucu oluşturulan sistemler zor koşullara karşı dayanıklıdır.



Şekil 1.18 MIP-Sensör sistemi

1.6 Pestisitler

Pestisit terimi kısaca pest (haşarat) adı verilen zararlıları öldürmek için kullanılan madde anlamına gelir ve şu şekilde tanımlanabilir: İnsan, hayvan ve bitki üzerinde, çevresinde bulunan veya yaşayan, ayrıca besin maddelerinin üretimi, hazırlanması, depolanması ve tüketimi sırasında onların besin değerini azaltan, hasara uğratan zararlıları öldürmek için kullanılan maddelerdir. Bu zararlılar çeşitli hastalıkları taşıyan parazitler, tarım ve bitki zararlısı böcekler, yabani ot ve mantarlar, insan, hayvan, çevre ve barınaklardaki sinek, bit, pire, kene, uyuz, hamam böceği gibi uçan ve yürüyen canlılardır (65).

1950' lerde tarımdaki gelişmelerle birlikte, ürün miktarını ve kaliteyi artırmak için büyük ölçüde herbisit kullanımına başlanmış, ancak herbisitlerin ve pestisitlerin yararlarının yanı sıra, uzun süreli kullanımları sonucunda, ekosistem sağlığına zarar verdiği de ortaya konulmuştur. Bundan dolayı kimyasalların tarım amaçlı kullanımları belirli maddelerle sınırlandırılmıştır(65).

Günümüzde kullanılan çoğu pestisit kalıcıdır, toprak, bitki, hayvansal dokular ve gıdalarda uzun zaman bozulmadan kalır. Bunların ve türevlerinin tarım ürünlerinde tespit edilen miktarlarına pestisit kalıntısı denir. Bitki hastalık ve zararlılarına karşı kullanılan pestisitler yağmur, rüzgar gibi çeşitli etkenlerle toprağa dolaylı yolla ulaşabilmektedir. Topraktaki zararlı böceklerle, nematodlara ve tohum ilaçlamaları sırasında tohumla uygulanan pestisitler ise direkt olarak toprağa karışmaktadır. Bu şekilde toprakta devamlı biriken pestisitler, tüketilen ürünler aracılığı ile insan, evcil hayvan ve yaban hayatına ulaşarak çevre sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir(66-68). Pestisitlerin neden olduğu problemleri şöyle sıralamak mümkündür :

1. Kirlenmiş toprakta yetişen ürünler pestisit kalıntılarını kökleriyle topraktan alacaklarından, insan ve hayvanlar için yem ve gıda maddeleri olarak kullanılacak olanlar az da olsa kalıntı içerirler.
2. Toprak mikroorganizmalarının kısmen ya da tamamen yok olmasına neden olurlar,
3. Pestisitler topraktan süzülerek yeraltısularına veya buharlaşma ile atmosfere karışabilirler.
4. Geniş spektrumlu pestisitler yalnız zararlıyı ve hastalık etmeni olan bazı mikroorganizmalara değil, aynı zamanda amaç dışındaki canlılara örneğin hayvanlara da zararlı etkilerde bulunmaktadır.
5. Pestisitlerin tarımda sürekli olarak kullanılması zararlıda genetik direnç unsurunun oluşmasına neden olmaktadır.
6. Bazı pestisitlerin eser miktarlardaki dozları bile vücutta kalıcı zararlı etkiler meydana getirebilmekte karaciğer ve böbrekleri dejenere edebilmekte veya kanser yapıcı özelliğe sahip olabilmektedirler.
7. Tesiri kalıcı bazı pestisitlerin çok yüksek hareket kabiliyeti nedeniyle kirlenme bütün dünyaya yayılabilmektedir.
8. Pestisitler ekosistemin yapısını ve tür dağılımını değiştirerek ve besin zincirleri arasındaki normal dengeyi bozarak ekosistemi tehdit ederler.

İdeal bir pestisit;

- 1- İstenmeyen zararlıyı kontrol edebilmeli,
- 2- Hedef alınmayan canlıya zarar vermemeli, seçici olmalı,
- 3- Uygun bir zaman sürecinde ekolojik olarak kabul edilebilir ürünlere dönüşmeli,
- 4- Uygulama alanında kalabilmeli,
- 5- Çevrede birikme potansiyeli olmamalı,
- 6- Biyolojik olarak aktif olmalı,
- 7- Etkili olmalı ve
- 8- Kullanıcılar açısından güvenilir olmalıdır.

Ancak, günümüzde kullanılan hiçbir pestisit yukarıda belirlenen ideal niteliklerin tümüne sahip değildir. Çevresel özelliklerinin güncellik kazanması sonucu çevreye olan olumsuz etkileri nedeniyle bazı pestisitler yasaklanmış ve kullanımı sınırlandırılmıştır.

1.6.1 Pestisitlerin Sınıflandırılması

Pestisitler çeşitli özellikleri göz önüne alınarak sınıflandırılır. Bu sınıflandırmalar genellikle formülasyon şekillerine, kullanıldıkları zararlılara, metabolizmalarına, zehirliliklerine, etki şekillerine, vücuttan atılmalarına ve vücuda giriş yollarına, zararlının biyolojik dönemine göre yapılmasına karşın en bilimsel sınıflandırma kullanıldıkları zararlılara ve etkili kimyasal madde grubuna göre yapılandır(67,69-70).

a) Pestisitlerin Formülasyon Şekillerine Göre Sınıflandırılması

- ✓ Toz ilaçlar
- ✓ Islanabilir toz ilaçlar
- ✓ Kuru tohum ilaçları
- ✓ Suda çözünen tozlar
- ✓ Solüsyonlar veya sulu çözeltiler
- ✓ Emülsiyon konsantre ilaçlar
- ✓ Yazlık ve kışlık yağlar (Beyaz ve sarı yağlar)
- ✓ Granüller
- ✓ Pelletler
- ✓ Aerosoller
- ✓ Zehirli yemler
- ✓ Kapsül şekli verilmiş formülasyonlar
- ✓ Gübre karışımları
- ✓ Akıcı konsantreler
- ✓ Yağ konsantreleri ve yağ solüsyonları
- ✓ Çok düşük hacimli ilaçlamaya uygun olanlar

b) Pestisitlerin Kullanıldıkları Zararlılara Göre Sınıflandırılması

- ✓ İnsektisitler (Böcekleri öldürenler)
- ✓ Algisitler (Algleri öldürenler)
- ✓ Fungisitler (Mantarları öldürenler)
- ✓ Fungostatikler (Fungusların faaliyetini durduranlar)
- ✓ Herbisitler (Yabancı otları öldürenler)
- ✓ Bakterisitler (Bakterileri öldürenler)
- ✓ Akarisitler (Akarları öldürenler)
- ✓ Afisitler (Yaprak bitlerini öldürenler)
- ✓ Molluskisitler (Yumuşakçaları öldürenler)
- ✓ Avenisitler (Kuşları kaçıranlar)
- ✓ Rodentisitler (Kemirgenleri öldürenler)
- ✓ Nematositler (Nematodları öldürenler)
- ✓ Termitisitler (Karıncaları öldürenler)
- ✓ Pedikulisitler (Bitleri öldürenler)

c) Kimyasal Tiplerine Göre Pestisitlerin Sınıflandırılması

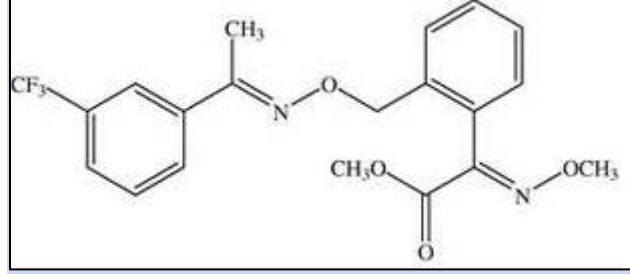
- ✓ Organofosfatlar
- ✓ N-metil karbamatlar
- ✓ Klorlu hidrokarbonlar
- ✓ Bisditiyokarbamatlar
- ✓ Organotinler
- ✓ Botanik kökenli maddeler
- ✓ Arsenikler
- ✓ Fenoksialifatik asitler
- ✓ Piretrodiler
- ✓ Fenol türevleri
- ✓ Mikrobiyaller

d) İşlevlerine Göre Pestisitlerin Sınıflandırılması

- ✓ Yaprak dökücüler (defoliant): Bitkilerin yaprağını dökerek etkileyenler.
- ✓ Kurutucular (dessicants): Bitkileri kurutucu etki yapanlar.
- ✓ Dezenfektanlar: Mikroorganizmaları etkisiz hale getirenler.
- ✓ Kaçırıcılar: Böcek ve kuşları kaçıranlar (repellent).
- ✓ Çekiciler (pheromonlar, yemler vb): Böcekleri onları yok edecek sisteme doğru çekenler ve yönlendirenler.
- ✓ Kısırlık yapan kimyasallar (kemosterilantlar): Böceklerde kısırlaştırıcı etki yapanlar.
- ✓ Büyüme düzenleyicileri: Böcek veya bitkilerin büyümelerini geciktirenle veya hızlandıranlar.

1.7 Trifloksystrobinin Yapısı

Trifloksistrobin moleküler formülü: C₂₀H₁₉F₃N₂O₄



Şekil 1.19 Trifloksistrobinin yapısı

Çizelge 1.7 Trifloksistrobinin teknik  zellikleri

Parametreler	�zellikler
Molekül ağırlığı	408,37 g/mol
Saflık %≥	95
Erime Noktası �C	72-73
Kaynama Noktası �C	312

Trifloksistrobinin  zellikleri;

- ✓ Doğal ortamda gelişen bir mantar türünden elde edilen bir metabolit olan trifloksystrobin, mitokondri solunumunu engeller.
- ✓ Potansiyel hastalığı oluşturan fungal spor ve misellerinin gelişimini engeller.

2. MATERYAL VE METOD

2.1 Materyal

Çalışmada kullanılan kimyasallar trifloksistrobin, akrilamid (AA), hidroksietil metakrilat (HEMA) , 4-vinilpiridin (4-VP) , 1-vinil imidazol (1-VI) , etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) , asetonitril (ACN) , 1-1 Azobis siklo heksankarbonitril, metanol (MeOH) , etanol (EtOH), asetik asit (CH₃COOH) Sigma (USA); sodyum asetat (CH₃COONa), dihidrojenfosfat (KH₂PO₄), dipotasyum hidrojenfosfat (K₂HPO₄), sodyum hidroksit (NaOH) (Merck, Almanya). Bu çalışmada kullanılan diğer tüm kimyasallar analitik saflıktadır.

Çalışmada kullanılan araç ve gereçler ; FTIR (Perkin Elmer spectrum BX), UV-vis spektrofotometre (Perkin Elmer), pH metre (inolab WTW series), inkübatör (GFL), analitik terazi, otomatik pipet, çalkalayıcı, vortex.

SEM analizleri hizmet alımı karşılığında yaptırılmıştır.

2.2 Yöntem

2.2.1 Trifloksistrobin Standart Grafiğinin Oluşturulması

Trifloksistrobin damgalı polimerlerin hazırlanması için ilk yapılan çalışma standart grafiğinin oluşturulması aşamasıdır. Bunun için 500 mg/L'lik stok çözelti hazırlandı ve değişen seyreltme oranları kullanılarak 1 mg/L-50 mg/L aralığında değişen konsantrasyonlarda bir seri standart çözelti hazırlandı. Absorbans ölçümleri UV-Vis spektrofotometresinde trifloksistrobinin maksimum dalga boyu olan 247 nm' de alındı.

2.2.2 Yığın Polimerizasyon Yöntemi ile Trifloksistrobin Damgalı Polimerlerin Hazırlanması

Yığın polimerizasyon yöntemi uygulanarak trifloksistrobin damgalı polimerlerin hazırlanmasında farklı monomerlerin kullanılması ile dört farklı polimer hazırlandı. Kalıp molekül olarak 0,1 mmol trifloksistrobin 2 mL ACN içinde çözüldü. Üzerine her bir polimer örneği için fonksiyonel monomerden 0,4 mmol eklendi. Prepolimerizasyon ortamına ayrıca sırasıyla 2 mmol çapraz bağlayıcı ve 10 mg polimerizasyon başlatıcı olan 1-1 Azobis-sikloheksankarbonitril ilave edildi. Ortamdan çözünmüş oksijeni uzaklaştırmak üzere çözelti önce 5 dakika ultrasonik banyoda tutuldu ve ardından 5 dakika N₂ gazından geçirildi. 60 °C'de 24 saat su banyosunda inkübasyondan sonra polimer (MIP) oluşumu gözlemlendi. Kontrol polimerde (NIP) aynı koşullar altında kalıp molekül olmadan hazırlandı.

Elde edilen polimerlerin ezilip öğütülmesinden sonra, kalıp molekülün polimerden uzaklaştırılması için sırasıyla metanol: asetik asit (9:1), metanol ve aseton ile yıkama yapıldı. Yıkama adımlarından sonra polimerler vakum altında kurutularak yapılacak çalışmalarda kullanılmak üzere oda koşullarında saklandı.

Çizelge 2.1 Hazırlanan trifloksistrobin damgalı polimerlerin kompozisyonu

Kalıp Molekül	Polimer	Fonksiyonel Monomer	Çapraz Bağlayıcı	Çözgen	Polimerizasyon Başlatıcı
0,1 mmol Trifloksistrobin	AA-EGDMA	0,4 mmol Akrilamid	2 mmol EGDMA	2 mL ACN	10 mg 1-1 Azobis-sikloheksankarbonitril
0,1 mmol Trifloksistrobin	HEMA-EGDMA	0,4 mmol HEMA	2 mmol EGDMA	2 mL ACN	10 mg 1-1 Azobis-sikloheksankarbonitril
0,1 mmol Trifloksistrobin	4-VP-EGDMA	0,4 mmol 4-Vinil Piridin	2 mmol EGDMA	2 mL ACN	10 mg 1-1 Azobis-sikloheksankarbonitril
0,1 mmol Trifloksistrobin	1-VI-EGDMA	0,4 mmol 1-Vinil İmidazol	2 mmol EGDMA	2 mL ACN	10 mg 1-1 Azobis-sikloheksankarbonitril

2.2.3 Hazırlanan Polimerlerin Damgalama Etkinliklerinin Hesaplanması

Çizelge 2.1’de görülen 4 farklı polimerin MIP ve NIP arasında trifloksystrobin bağlama yöntemi ile dört farklı polimerin adsorpsiyon kapasiteleri (q_e) ve damgalama etkinlikleri (α) aşağıdaki bağıntılardan hesaplanarak karşılaştırıldı.

$$\text{Adsorpsiyon Kapasitesi: } q_e = (C_0 - C_e) \cdot V / m \quad (1)$$

$m(g)$: Polimer miktarı

C_0 (mg/L): Başlangıç Trifloksistrobin Konsantrasyonu

C_e (mg/L): Bağlanmayan Trifloksistrobin Konsantrasyonu

V : Trifloksistrobin Çözeltisinin Hacmi

$$\text{Damgalama Etkinliği } \alpha = q_e (MIP) / q_e (NIP) \quad (2)$$

2.2.4 Geri Bağlama Çalışmalarının Optimizasyonu

2.2.4.1 Geri Bağlama Üzerine pH'ın Etkisi

Kullanılan farklı fonksiyonel monomer ile hazırlanan polimerler üzerinde birçok farklı koşulda geri bağlama çalışması yapıldı. Bu çalışmada amaç 9:1 oranında hazırlanan metanol: asetik asit ve metanol yıkama çözeltileri ile ortamdan çekilen kalıp molekülün ortama tekrardan ilave edilmesi ile polimer üzerinde gerçekleşen tutunma miktarını hesaplamaktır.

Bu çalışmada asetonitril içerisinde hazırlanmış 500 mg/L'lik trifloksistrobin stok çözeltisi önce pH 4.0-10.0 arasında hazırlanan tampon çözeltileri (0,01 M pH 4.0 ve pH 5.0 asetat tamponu, 0,01 M pH 6.0, pH 7.0 ve pH 8.0 fosfat tamponu, 0,01 M pH 9.0 ve pH 10.0 glisin-NaOH tamponu) ile 100 mg/L olacak şekilde seyreltildi. Daha sonra test tüplerine tartılan 10 mg MIP ve NIP üzerine farklı tampon aralıklarında hazırlanmış 2 mL 100 mg/L trifloksistrobin çözeltisi eklendi. Dört saat inkübasyon süresinden sonra polimerler 10000 rpm'de 15 dk santrifüjlendi. Üst fazların absorbans ölçümleri 247 nm' de UV-Vis spektrofotometresinde yapılarak bağlanmayan trifloksistrobinin absorbansı ölçüldü.

2.2.4.2 Optimum Polimer Miktarının Belirlenmesi

Kalıp molekülün polimerden uzaklaştırıldıktan sonra kesikli tip bağlama çalışmalarında kullanılacak optimum polimer miktarı bir önceki adımda belirlenen uygun geri bağlama ortamında hazırlanan trifloksistrobin çözeltisi (100 mg/L) kullanılarak belirlendi. Damgalama etkinliğine (α) göre seçilen polimerler (MIP ve NIP), 5-50 mg olacak şekilde test tüplerine tartıldı. Üzerlerine 2 mL 100 mg/L trifloksistrobin çözeltisi eklendi ve tüpler oda sıcaklığında orbital çalkalayıcıda 400 rpm'de 4 saat inkübasyona bırakıldı. Gram polimer başına bağlanan trifloksistrobin miktarı hesaplanarak çalışmalarda kullanılacak olan optimum polimer miktarı belirlenmiş oldu.

2.2.4.3 Optimum Geri Bağlama Sürenin Belirlenmesi

Polimerler üzerinde geri bağlama koşulu ve optimum polimer miktarı belirlendikten sonra geri bağlamanın dengeye geldiği sürenin belirlenmesi için hem MIP ve NIP'ten belirlenen miktarda test tüplerine tartıldı ve üzerlerine uygun tamponda hazırlanmış 2 mL 100 mg/L trifloksistrobin çözeltisi eklendi. Tüpler oda sıcaklığında orbital çalkalayıcıda 400 rpm'de değişen sürelerde (0-300 dk) inkübasyona bırakıldı. Polimere bağlanan trifloksistrobin miktarı, trifloksistrobinin başlangıç miktarından bağlanmayan trifloksistrobin miktarının farkı alınarak hesaplandı.

2.2.4.4 Kesikli Sistemle Damgalı Polimerin Trifloksistrobin Bağlama Kapasitesinin Belirlenmesi

MIP ve NIP polimer üzerinde geri bağlama koşullarının optimizasyonundan sonra polimerin trifloksistrobin bağlama kapasitesini belirlemek amacıyla ACN'de hazırlanmış stok 500 mg/L'lik trifloksistrobinden yola çıkarak farklı konsantrasyonlarda (5-40 mg/L) bir seri çözelti hazırlandı. Çalışma belirlenen MIP ve NIP polimer miktarından test tüplerine tartıldı üzerlerine 2 mL farklı konsantrasyonlarda hazırlanan trifloksistrobin çözeltisinden ilave edildi ve tüpler oda sıcaklığında orbital çalkalayıcıda 400 rpm'de belirlenen optimum sürede inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda gram polimer başına bağlanan pestisit miktarı hesaplandı. Bununla birlikte elde edilen değerler kullanılarak Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izoterm hesaplamaları yapıldı.

2.2.5 Trifloksistrobin Damgalı Polimerlerin Katı Faz Ekstraksiyonunda (SPE) Dolgu Materyali Olarak Kullanılması

2.2.5.1 Gerçek Örneklerin Uygulanması

Bir litrelik behere yabancı maddelerden ayrılmış olan üzümlerden 200 g tartıldı ve blenderden geçirilerek üzümlerin parçalanması sağlandı. Parçalanmış üzüm üzerine 50 mL hidroklorik asit çözeltisi eklendi ve yaklaşık bir saat boyunca ara ara karıştırılarak bekletildi. Daha sonra beherdeki üzüm örneği üzerine 200 mL kloroform konuldu, karıştırıldı ve faz ayrımı olduktan sonra kloroform fazı başka bir behere süzüldü. Her seferinde 200 mL kloroform kullanılarak bu işlem iki kez tekrarlandı. Beherde toplanmış ekstraktın tamamı bir ayırma hunisine aktarıldı. Ayırma hunisinde kloroform ve su tabakalarının ayrılması için bekletildi ve sonra kloroform tabakası başka bir behere alındı. Kloroform ekstraktına yaklaşık 10 g sodyum sülfat katılarak ortamdaki suyun uzaklaştırılması sağlandı. Bu ekstrakt süzgeç kağıdından geçirilerek başka bir behere süzüldü. Beherde kalan sodyum sülfat 50 mL kloroform kullanılarak yıkandı ve önce süzölmüş olan kloroform ekstraktına ilave edildi. Kloroform ekstraktı, bir su banyosu üzerinde ve hafif bir hava akımı altında kurumaya yakın bir duruma kadar buharlaştırıldı. Kalıntı az miktarda asetonitrilde çözüldü ve son hacim 5 mL'ye 0,01 M pH 5.0 asetat tamponuyla tamamlandı.

2.2.5.2 Üzüm Örneklerine Standart Katma Yönteminin Uygulanması

Ekstrakte edilen üzüm örneklerinde trifloksistrobin oranı düşük olduğundan dolayı standart katma yöntemi uygulandı. 500 mg/L'lik trifloksistrobin stok çözeltisinden yola çıkılarak analit varlığında (analit miktarı 0,1 mL) son hacim 5 mL olacak şekilde bir seri standart çözelti hazırlandı (10-50 mg/L) ve yeni bir standart katma grafiği oluşturuldu.

2.2.5.3 Üzüm Örneklerinin Katı Faz Ekstraksiyonuna Uygulanması

Trifloksistrobin bağlama etkinliği yüksek olan damgalı polimer kolon dolgu maddesi olarak kullanıldı. Kolon kapasitesi, kolondan geri kazanılan miktar ve % geri kazanım hesapları yapıldı. Bu amaçla 3 mm çaplı ve 65 mm uzunluğundaki kolonun en altına cam pamuğu yerleştirildi. Üzerine 25 mg örnek polimer konuldu ve polimerin üzerine tekrar cam pamuğu konularak kolon hazırlandı. Kolondan öncelikle 3x1 mL su-etanol karışımı (9:1) geçirilerek şartlandırma işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra kolondan 3x1 mL 30 mg/L'lik trifloksistrobin çözeltisi geçirilerek kolona yükleme yapıldı. Kolon tekrardan 3x1 mL su-etanol karışımı (9:1) ile yıkandı ve son olarak bağlanmış olan trifloksistrobin kolondan elüe edebilmek için kolon 3x1 mL metanol-asetik asit karışımı (7:3) ile yıkandı. Bu aşamalarda kolondan elüe edilen fraksiyonların 247 nm'de ölçümleri alınarak ilgili parametreler hesaplandı.

2.2.6 Trifloksistrobin Damgalı Polimerin Karakterizasyonu

Trifloksistrobin damgalı polimerin karakterizasyonu FT-IR analizi ve SEM analizi ile yapıldı.

2.2.6.1 Trifloksistrobin Damgalı Yığın Polimerlerin FT-IR Analizi

MIP ve NIP polimerlerin FT-IR analizi için Perkin Elmer 100 Series cihazı kullanıldı. Bunun için 100 mg KBr içerisinde 1 mg olacak şekilde polimerler havanda karıştırılarak ezildi. Homojen hale gelmiş örnek disk haline getirilerek FT-IR analizi yapıldı.

2.2.6.2 Trifloksistrobin Damgalı Yığın Polimerlerin SEM Analizi

MIP ve NIP polimerlerin SEM analizleri hizmet alımı karşılığında yaptırılmıştır.

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Moleküler damgalı polimerler (MIP'ler) seçici sorbentler olup doğal reseptörlere göre başta fiziksel ve kimyasal stabilite olmak üzere birçok avantaja sahiptir. Aynı zamanda hazırlanmaları kolay, kararlı ve ucuzdur. MIP için en uygun yöntemin bulunması ise zaman ve madde kaybı olan bir işlemdir(5). MIP'ler afinite kromatografisi, sensor teknolojisi, ve kataliz olmak üzere pek çok alanda uygulama alanı bulan sentetik reseptörlerdir. Moleküler tanıma yeteneğine sahip MIP'ler, afinite ayırma materyali olarak kullanılabilmektedirler. Bugüne kadar birçok moleküler damgalama çalışmasında yığın polimerizasyon yöntemi ile önemli avantajları nedeniyle monolitik adsorbentler hazırlanmıştır. Damgalama işleminde başta hedef molekül, fonksiyonel monomer, çapraz bağlayıcı, porojen ve başlatıcı olmak üzere beş farklı bileşenin olduğu düşünülürse en uygun kompozisyonun elde edilmesi kolay değildir(71). Hedef molekülün özelliklerine göre tasarlanarak hazırlanan polimerlerden hedef molekülün uzaklaştırılması ile elde edilen kaviteğin morfolojileri veya stereokimyası üzerinden moleküller spesifik olarak tanınırlar.

Pestisitler tarımsal ürünlerin yetiştiriciliği, depolanması, taşınması, dağıtımı sırasında veya gıdaların, zirai ürünlerin işlenmesi sırasında istenmeyen zararlıları ve türlerini önlemek, yok etmek ve kontrol etmek için kullanılan kimyasal maddelerdir. Pestisitleri kimyasal yapılarına göre sınıflandırmak oldukça zordur. Bu nedenle genellikle etkili madde gruplarına göre sınıflandırılırlar. Etki gruplarına göre sınıflandırıldıklarında insektisitler, akarisitler, nemasitler, fumigantlar, rodentisitler ve molluskisitler, fungusitler, herbisitler olarak gruplandırılabilirler. Bu çalışmada kullanılan trifloksistrobin pestisit etki gruplarına göre sınıflandırıldığında fungusitler grubunda yer alır. Trifloksistrobin pestisiti strobilurin grubundan aktif bir maddedir ve mitokondri solunumunu engeller.

Trifloksistrobinin kalıp molekül olarak kullanıldığı damgalı polimerlerin hazırlanması ve hazırlanan damgalı polimerin katı faz ekstraksiyon dolgu materyali olarak kullanılıp üzüm örneklerinden trifloksistrobinin seçimli ayırımının gerçekleştirilmesi bu çalışmanın amacıdır. Trifloksistrobinin damgalı polimerlerin hazırlanmasında dört farklı fonksiyonel monomer kullanıldı, Hazırlanan polimerler üzerinde farklı çözgen sistemleri denenerek trifloksistrobin bağlama karakteristikleri incelendi ve en iyi sonucun alındığı polimer sistemi üzerinde optimizasyon ve karakterizasyon çalışmaları yapıldı.

3.1 Trifloksistrobin Damgalı Polimerlerin Hazırlanması

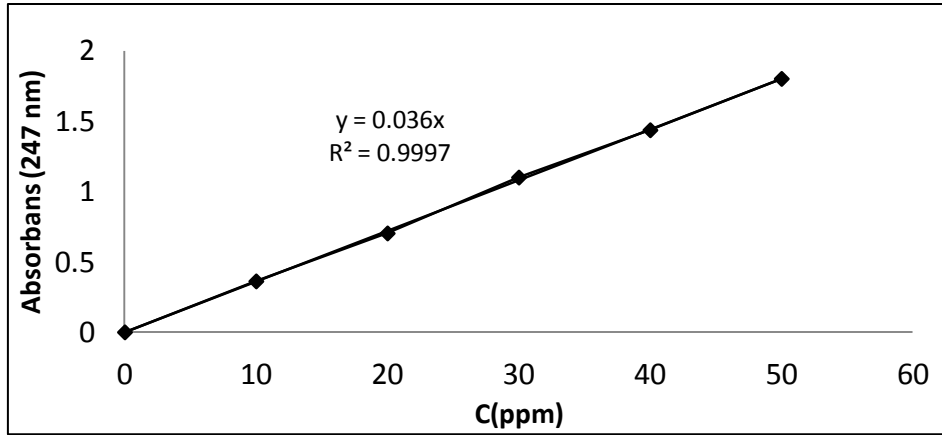
Bu çalışma kapsamında yığın polimerizasyon yöntemiyle trifloksistrobin damgalı polimerler hazırlandı. Trifloksistrobin pre-polimerizasyon çözeltisi içerisinde fonksiyonel monomerler ile hidrojen bağ yapma ve hidrofobik etkileşimler yapabilecek kapasiteye sahip fonksiyonel gruplar içeren bir pestisitir. Başarılı bir damgalı polimerin sentezlenmesinde en önemli parametre kalıp molekül ile spesifik olarak etkileşime girebilecek fonksiyonel monomerin seçimidir. Farklı özellikte monomerin birlikte kullanımı (asidik veya bazik karakterde) başarılı bir damgalı polimer oluşumuna neden olabileceği gibi bu monomerler kalıp molekül yerine kendi aralarında etkileşme yoluna gidebilirler. Kullanılan monomerlerden biri asidik diğeri bazik karakterde ise her ikisi de kalıp molekül ile ya da kendi aralarında güçlü bağlar yapmaya çalışacağından oluşan polimerde non-spesifik tanıma bölgeleri oluşur ve spesifik tanıma oranı düşebilir.

Moleküler damgalamada fonksiyonel monomer seçimi büyük önem taşır çünkü fonksiyonel gruplar arasındaki etkileşimler MIP'lerin afinitesini belirler. Etkileşim sayısı ne kadar fazla ise o kadar iyi sonuç alınır. Farklı tipteki etkileşimler MIP'in spesifikliğini etkiler. Aynı zamanda fonksiyonel monomerler damgalama bölgelerindeki etkileşimlerden sorumludurlar. Non-kovalent etkileşimlerde polimerizasyon ortamına fonksiyonel monomerlerin kalıp moleküle göre aşırısı konarak dengenin kalıp molekül-monomer kompleksi oluşumu yönüne kayması sağlanır. Kalıp molekül:monomer oranı bu tip etkileşimlerde 1:4 veya daha fazla alınmaktadır. Bu çalışmada da kalıp molekül: fonksiyonel monomer oranı 1:4 oranında olacak şekilde hazırlandı ve çalışmalarda molekül:monomer kompleksi oluşumu gözlemlendi. Oluşan bu polimerlerde dikkat edilmesi gereken bir diğer noktada hedef molekülün veya analoglarının geri bağlanması hızlı bir şekilde gerçekleşmesidir.

Trifloksistrobinin kalıp molekül olarak kullanıldığı damgalı polimerlerin hazırlanmasında fonksiyonel monomer olarak akrilamid (AA), hidroksietil metakrilat (HEMA), 4-vinil piridin (4-VP) ve 1-vinil imidazol (1-VI) ile çapraz bağlayıcı etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) kullanılarak farklı kompozisyonda polimerler yığın polimerizasyon yöntemi ile hazırlandı. Bu monomerler kalıp molekül ile hidrojen bağ yapabilme veya hidrofobik etkileşime girebilme kapasitelerine göre seçildi.

3.2 Trifloksistrobin Standart Grafiğinin Oluşturulması

ACN'de hazırlanmış 500 mg/L stok trifloksistrobinden yola çıkılarak 10-50 mg/L aralığında standart çözeltiler hazırlandı. 247 nm'de alınan aborbans değerleri konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek standart grafiği oluşturulmuş oldu.



Şekil 3.1 Trifloksistrobin standart grafiği

3.3 Hazırlanan Polimerlerin Geri Bağlama Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Genel olarak iyonik etkileşimler hidrojen bağ etkileşimlerinden daha güçlüdür. Bununla birlikte karboksil monomerler ile hedef molekül arasında hidrojen bağ etkileşimleri söz konusu olduğu durumlarda polar çözügenlerin kullanımı bu etkileşimlerin zayıflamasına neden olur. Bu nedenle polar çözügen kullanılarak hazırlanan MIP'ler zayıf tanıma veya bazı durumlarda hiç tanıma özelliği gösterirler(29). Güçlü hidrofobik etkileşimlerin ön planda olduğu durumlarda ise polar çözügenlerin kullanımı daha etkin olmaktadır.

3.3.1 Trifloksistrobin Damgalı Yığın Polimerlerin Geri Bağlama Koşullarının Optimize Edilmesi

Yığın polimerizasyon yöntemiyle akrilamid, hidroksietil metakrilat (HEMA), 4-vinil piridin (4-VP) ve 1-vinil imidazol (1-VI) fonksiyonel monomerleri ile etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) çapraz bağlayıcısı ile hazırlanan MIP ve NIP polimerler, kullanılarak geri bağlama çalışmaları gerçekleştirildi. Hazırlanan polimerlerden seçiciliği yüksek polimerin belirlenmesi amacıyla yapılan ön çalışmada ACN'de hazırlanan 500 mg/L trifloksistrobin stok çözeltisi, bidistile su ile 100 mg/L'e seyreltili ve deneysel kısımda belirtilen yöntem uygulandı. Polimerler üzerine bağlanan trifloksistrobin miktarından giderek adsorpsiyon kapasiteleri (q_e), ve damgalama etkinlikleri (seçicilik) (α) hesaplandı (Çizelge 3.1). Damgalama etkinliği α , iki molekül arasındaki denge assosiyasyonu veya dissosiyasyonunun oranlanmasıyla belirlenir. Nonkovalent damgalı polimerler için seçiciliğin 1,1'in üzerinde olması beklenir. Yüksek assosiyasyon sabitine sahip damgalı polimerler yüksek seçicilik gösterirler.

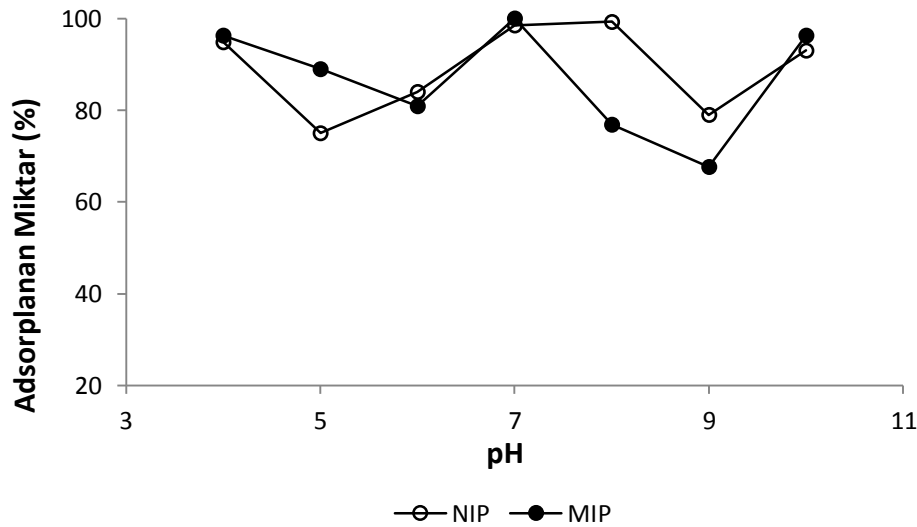
Çizelge 3.1 Farklı monomerler kullanılarak hazırlanan polimerlerin trifloksistrobin bağlama etkinliği açısından karşılaştırılması

Polimer	Tutulan Miktar		Damgalama Etkinliği (α)
	MIP (mg/g)	NIP(mg/g)	
1-VI-EGDMA	0,6	0,34	1,76
4-VP-EGDMA	1,14	0,75	1,52
AA-EGDMA	1,23	0,91	1,35
HEMA-EGDMA	0,56	0,54	1,03

3.3.2 Geri Bağlama Üzerine pH'nın Etkisi

Biyolojik tanıma genel olarak sulu tampon sistemlerinde pH'nın bir fonksiyonu olarak gerçekleştiği için moleküler damgalı polimerlerin biyomolekülleri taklit etmesi açısından sulu sistemlerde tanınmanın gerçekleşmesi önemlidir. Ayrıca hedef molekül ile MIP arasındaki mümkün etkileşimlerin sayısı kadar, bağlanma bölgesinin mikroçevresinde MIP'in hedef molekülü ne kadar etkili bir şekilde tanıyabileceğini belirlemektedir. Bu nedenle MIP'in sentezlendiği koşullar ile geri bağlama koşullarının kantitatif olarak bir karşılaştırılmasının yapılması çok zordur. Hedef molekülün tanınmasında iyonik etkileşimlerin belirleyici olduğu bir çalışmada iyonik şiddetin ve tampon kompozisyonunun tanımada olan etkisi çalışılmıştır. Bu çalışmaya göre MIP'in hedef molekülü tanınmasında tampon türünden çok bağlamanın gerçekleştirildiği çözeltinin iyonik şiddetinin büyük rol oynadığı görülmüştür (29,72).

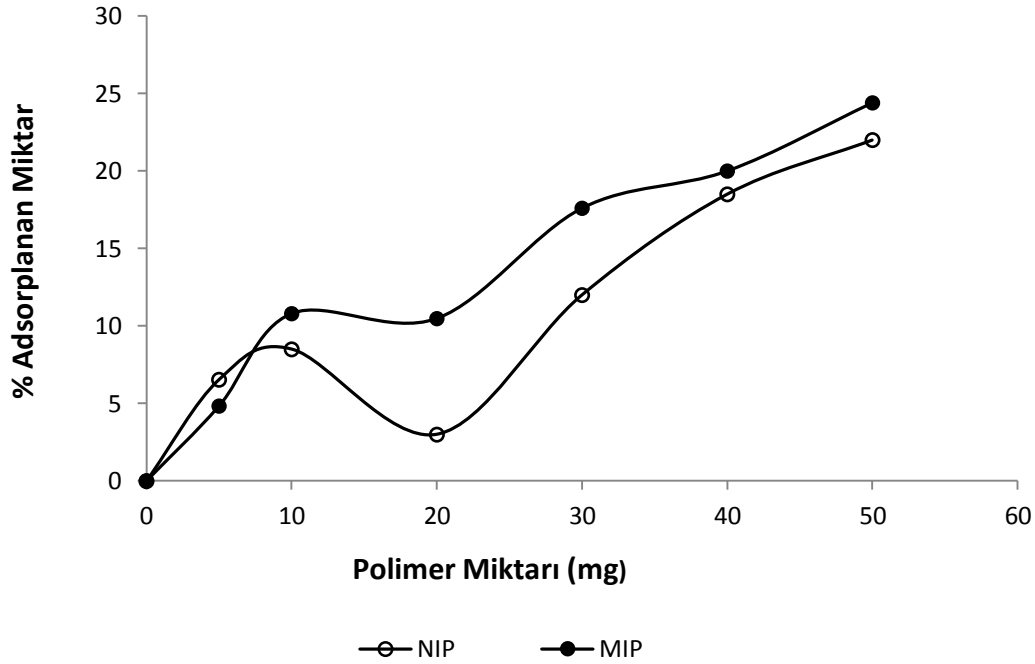
Tampon-organik çözgen ortamında geri bağlanmanın incelenmesinde bu nedenle tamponun iyonik şiddeti 0,01 M olarak seçildi. Farklanan polimer miktarı ve sabit trifloksistrobin konsantrasyonunda geri bağlanma çalışmaları yapıldı. Bu ortam koşullarında hazırlanan polimerler üzerinde pH 4.0 ile pH 10.0 aralığında yapılan çalışmalar sonucunda bağlanmanın en uygun 0,01 M asetat tamponunda (pH 5.0) olduğu ve kullanılan monomerlerden en iyi bağlanmanın 1-vinil imidazolde gerçekleştiği belirlendi(Şekil 3.2).



Şekil 3.2 pH 4.0-10.0 aralığında yapılan geri bağlama çalışması (100 mg/L trifloksistrobin, 10 mg 1-VI-EGDMA NIP (-○-) ve MIP(-●-), 4 saat inkübasyon)

3.3.3 Optimum Polimer Miktarının Belirlenmesi

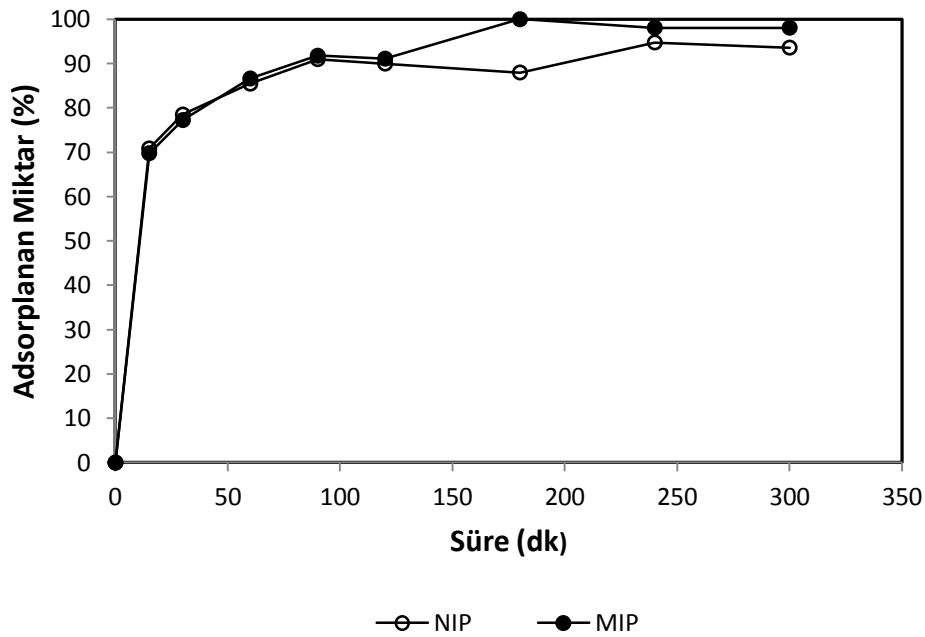
Bu çalışmada en iyi geri bağlamanın 1-vinil imidazol-EGDMA polimeriyle ve 0,01 M asetat tamponunda (pH 5.0) gerçekleştiği görüldü. Sonraki çalışmalarda kullanılacak optimum polimer miktarının belirlenmesi amacıyla 500 mg/L'lik trifloksistrobin stok çözeltisi 100 mg/L'e 0,01 M asetat tamponu (pH 5.0) ile seyreltildi ve bu çözeltiden 2 mL olacak şekilde 5-50 mg arasında değişen miktarlarda MIP ve NIP polimerler üzerine eklendi. 4 saat inkübasyondan sonra, örnekler 10000 rpm'de 15 dk santrifüjlendi. Üst fazların ölçümleri UV-Vis spektrofotometrede 247 nm de gerçekleştirdi. Gram polimer başına tutulan trifloksistrobin miktarı hesaplandı ve bu değerler değişen polimer miktarına karşı grafiğe geçirildi. Şekil 3.3 'de görüldüğü üzere polimer miktarı değiştikçe MIP'le NIP arasında trifloksistrobini bağlama açısından farklanma olmaktadır. 20 mg polimer miktarında trifloksistrobini bağlama açısından MIP ile NIP arasındaki fark en fazladır. Bu nedenle diğer çalışmalarda 20 mg polimer kullanılarak devam edildi.



Şekil 3.3 Değişen polimer miktarlarına karşı geri bağlanmanın incelenmesi, (100 mg/L trifloksistrobin, 0,01 M asetat tamponu pH 5.0, 4 saat inkübasyon)

3.3.4 Geri Bağlanma Çalışmalarında Geri Bağlama Süresinin Belirlenmesi

Bu çalışmada en iyi geri bağlamanın 20 mg 1-vinil imidazol ile sentezlenmiş polimer üzerinde ve 0,01 M asetat tamponu (pH 5.0) varlığında gerçekleştiği belirlendikten sonra geri bağlama çalışmasında optimum inkübasyon süresi belirlendi. Bu amaçla 20 mg polimer üzerine 2 mL 100 mg/L'lik trifloksistrobin (0,01 M asetat tamponu (pH 5.0) çözeltisinden ilave edildi ve 15-300 dakika aralığında inkübasyona bırakıldı. Bu işlem sonrası polimerler 10000 rpm 'de 15 dk santrifüjlendi ve üst fazların UV-vis spektrofotometrede 247 nm de ölçümleri alındı. % Adsorplanan miktar değerleri hesaplanarak süreye karşı grafiğe geçirildi (Şekil 3.4).

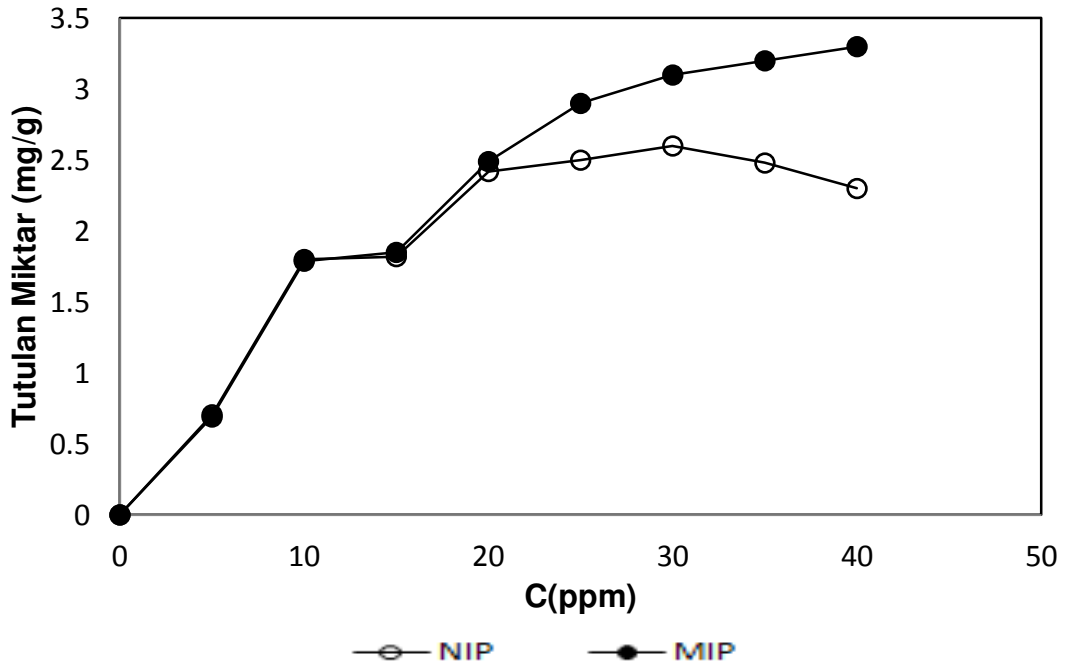


Şekil 3.4 İnkübasyon süresinin geri bağlanma çalışmaları üzerine etkisi. (100 mg/L trifloksistrobin, 0,01 M asetat tamponu pH 5.0, 20 mg polimer)

Şekil 3.4'de görüldüğü gibi 15-300 dk aralığında inkübasyona bırakılan MIP ile NIP polimerlerde trifloksistrobini bağlama açısından fazla farklanma 180 dakikada görüldü. Bu nedenle diğer çalışmalarda bu süre 180 dk sabit tutularak devam edildi.

3.3.5 Trifloksistrobinin Değişen Konsantrasyonlarında Geri Bağlanma Çalışmalarının İncelenmesi

Bu çalışmada hazırlana polimerin trifloksistrobin bağlama kapasitesinin belirlenmesi amacıyla asetat tamponu (pH 5.0) ile seyreltilen 5-40 mg/L'lik çözelti 2 mL olacak şekilde 20 mg MIP ve NIP üzerine eklenerek 3 saat inkübe edildi. Bu işlem sonrası polimerler 10000 rpm 'de 15 dk santrifüjlendi ve üst fazların UV-vis spektrofotometrede 247 nm de ölçümleri alındı. Polimerler üzerinde tutulan trifloksistrobin mg/g değerleri hesaplanarak konsantrasyona karşı grafiğe geçirildi (Şekil 3.5).



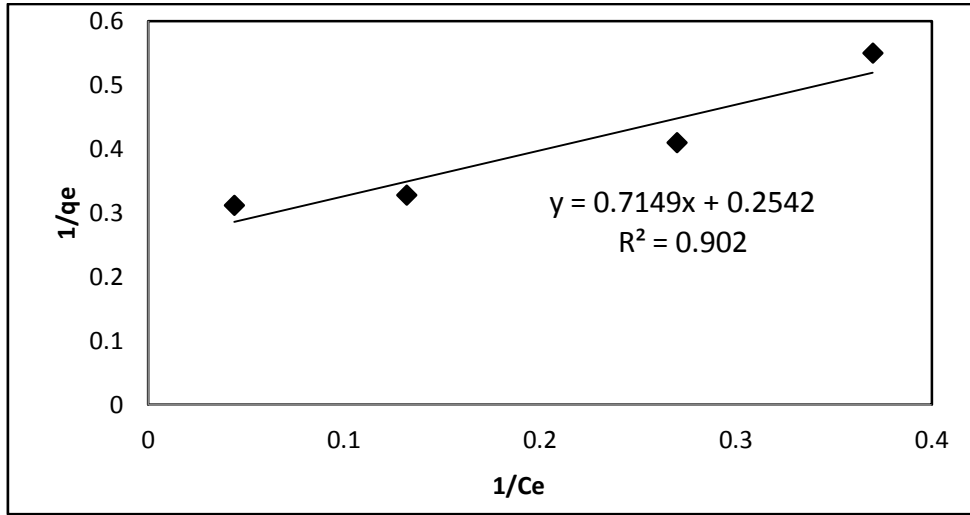
Şekil 3.5 Değişen trifloksistrobin konsantrasyonlarında geri bağlama çalışması.

(0,01 M asetat tamponu pH 5.0, Polimer Miktarı: 20 mg , İnkübasyon Süresi : 3 saat)

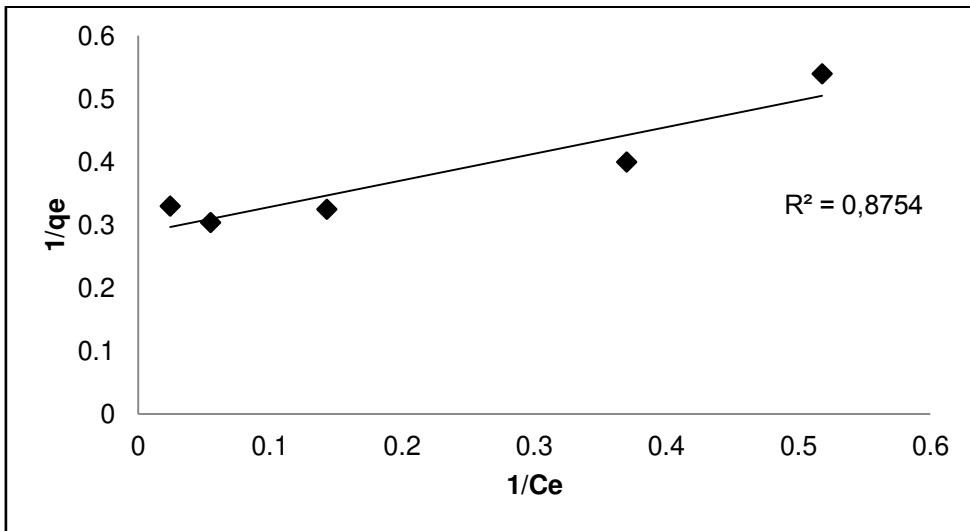
Şekil 3.5'de görüldüğü üzere 5-50 mg/L aralığında değişen konsantrasyonlarda geri bağlama çalışmaları yapıldı. MIP ile NIP arasındaki farkın en çok 30 mg/L'de olduğu görüldü. Bununla birlikte damgalı polimerin trifloksistrobinini bağlama kapasitesi çizilen grafikten 3,3 mg/g olarak belirlendi.

3.3.5.1 Langmuir ve Freundlich Adsorpsiyon İzotermilerinin Çizilmesi

Adsorpsiyon sistemlerinin belirlenmesinde adsorpsiyon izotermi temel gereksinimlerden biridir. Bu çalışmada trifloksistrobinin MIP ve NIP üzerine adsorpsiyonu Langmuir ve Freundlich modelleri ile incelendi. $1/q_e$ karşı çizilen $1/C_e$ grafiğinden Langmuir değerleri olan Q° ve b değerleri belirlendi. Korelasyon değerleri NIP için ($R^2=0,902$) MIP'e göre ($R^2=0,875$) daha yüksek bulundu (Çizelge 3.2).



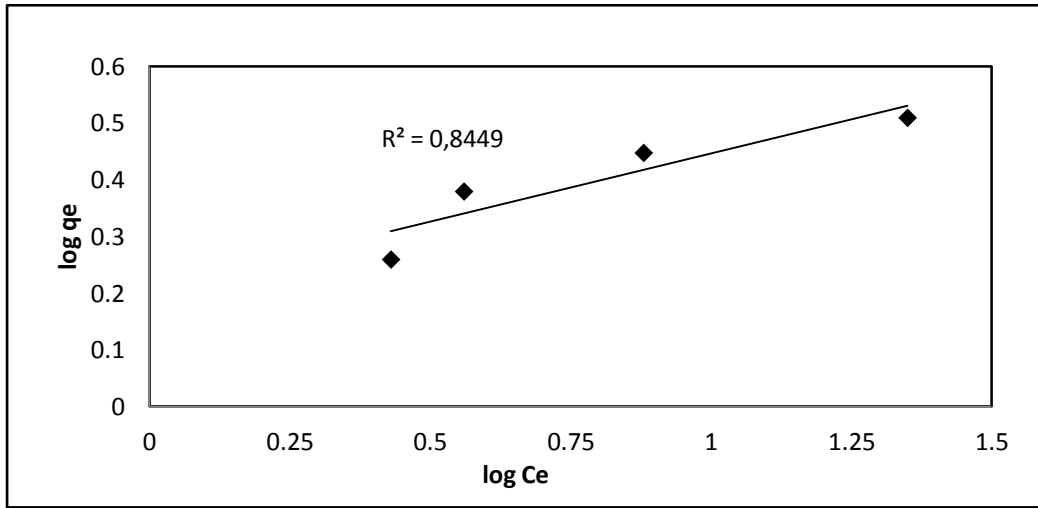
Şekil 3.6 NIP, 1-VI-EGDMA polimerinin Langmuir İzotermi



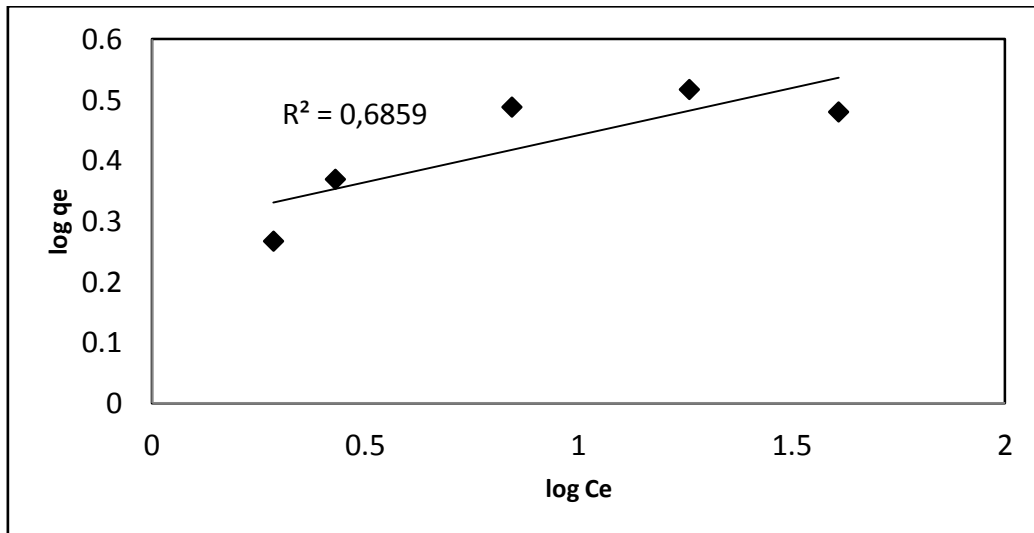
Şekil 3.7 MIP, 1-VI-EGDMA Polimerinin Langmuir İzotermi

Çizelge 3.2’de görüldüğü gibi Langmuir izoterimindeki R_L değerleri $0 < R_L < 1$ aralığında yer almaktadır. 1-vinil imidazol fonksiyonel monomeri ile sentezlenmiş kontrol ve örnek damgalı polimerler üzerine trifloksistrobinin bağlanması istemlidir.

Adsorpsiyon izotermi çalışması aynı zamanda $\log q_e$ karşı çizilen $\log C_e$ Freundlich izotermi ile de incelendi. NIP ($R^2=0,844$) ve MIP ($R^2=0,685$) için çizilen grafiklerin korelasyon değerleri kıyaslandığında Langmuir izotermi değerlerine göre bu değerlerin daha düşük olduğu ve bu nedenle hazırlanan 1-VI-EGDMA polimerleri üzerine trifloksistrobinin adsorpsiyon izotermi Langmuir’e uyduğunu görülmektedir.



Şekil 3.8 NIP, 1-VI-EGDMA polimerinin Freundlich İzotermi



Şekil 3.9 MIP, 1-VI-EGDMA polimerinin Freundlich İzotermi

Çizelge 3.2 Langmuir ve Freundlich izoterm verileri

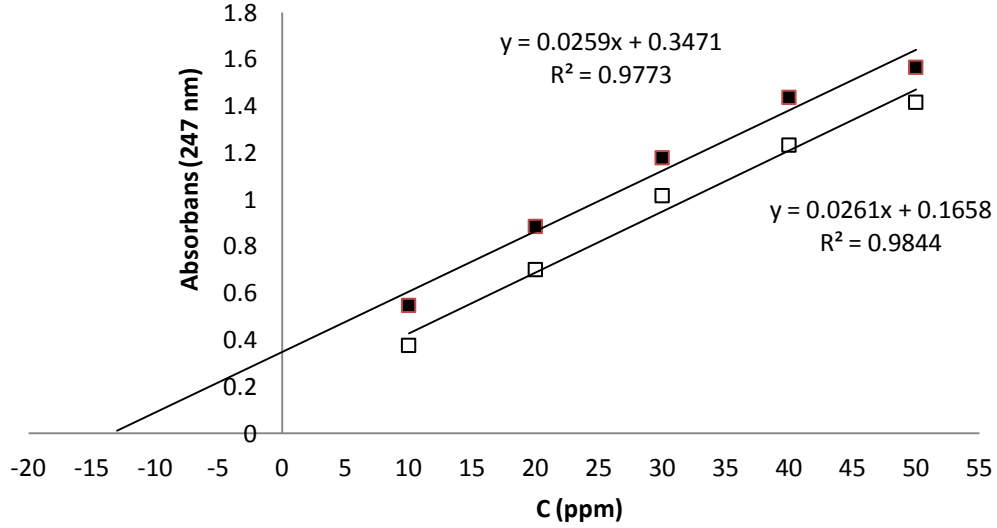
Polimer	Langmuir İzoterm Verileri				Freundlich İzoterm Verileri		
	$Q^o(\text{mol g}^{-1})$	$b (\text{L mol}^{-1})$	R_L	R^2	K_f	n	R^2
NIP	3,94	0,357	0,1	0,902	1,61	4,17	0,844
MIP	3,51	0,676	0,047	0,875	1,93	6,45	0,685

3.4 Trifloksistrobin Damgalı Polimerlerin Katı Faz Ekstraksiyon Çalışmaları

Katı Faz Ekstraksiyonu (SPE) adsorbanın (tutucunun) sabit faz olarak hareket ettiği basit bir kromatografik bir yöntemdir. Özellikle sulu örneklerin analizi için uygundur. Tipik bir SPE uygun bir çözücü (veya su) ile muamele edilerek kolonun şartlandırılması ile başlar. Sonra, analit uygulandığı zaman analitle birlikte istenmeyen diğer matris bileşenleri de adsorban yüzeyinde tutunabilir. Yıkama adımıyla da tutunmuş olabilecek bozucu bileşikler uzaklaştırılır. Sonuçta analit uygun bir çözücü ile elüe edilir ve analiz için hazır hale getirilmiş olur.

3.4.1 Üzüm Örneklerinin MIP-SPE Kolonuna Uygulanması

Moleküler damgalı polimeri dolgu maddesi olarak kullandığımız SPE kolonuna üzüm örneklerini uygulamadan önce bir ekstraksiyon işlemi uygulandı. Ekstrakte edilen örneğin trifloksistrobin miktarını hesaplamak için standart katma yöntemi uygulandı. Bu yöntemde önce 500 mg/L'lik trifloksistrobin stok çözeltisi, her bir tüpte ekstrakte edilen 0,1 mL üzüm örneği sabit olacak şekilde, 10- 50 mg/L aralığında seyreltildi (son hacim 5 mL, 0,01 M asetat tamponu pH 5.0) ve bir standart grafiği oluşturuldu. Elde edilen veriler ile standart katma grafiği çizildi.(Şekil 3.10). Grafikten eğrinin x eksenini kestiği noktadaki değer alınarak üzüm örneğinde trifloksistrobin miktarı 17,5 mg/kg olarak hesaplandı.



Şekil 3.10 Standart katma yöntemi ile standart eğrisinin oluşturulması

Bu çalışmada hazırlanan damgalı polimerin adsorban olarak kullanıldığı bir katı faz ekstraksiyon çalışmasında ilk olarak kolonun ucuna cam pamuğu yerleştirildi. Üzerine dolgu maddesi olarak kullanılacak damgalı polimer konuldu ve tekrar kolona cam pamuğu yerleştirildi. Bu adımdan sonra kolondan 3x1 mL su-etanol (9:1) geçirilerek kolon şartlandırıldı. Ardından 0,1 mL analit içeren 3x1 mL 38,5 mg/L'lik örnek geçirilerek adsorpsiyon aşaması tamamlandı. Bu şekilde çözeltinin 3 kez kolondan geçirilmesi ile toplamda 115,6 mg/L trifloksistrobin çözeltisi kolona uygulanmış oldu. Zayıf tutunmuş trifloksistrobinin uzaklaştırılması için kolon 3x1 mL su-etanol (9:1) ile yıkandı. Kolonda tutunan trifloksistrobin miktarı 104 µg olarak hesaplandı. Daha sonra kolondan 3x1 mL metanol-asetik asit (7:3) ve 3x1 mL asetonitril geçirilerek elüsyon aşaması tamamlandı. Bu aşamada kolonda tutulan trifloksistrobinin 96,25 µg'ı geri alınmış oldu. Son adımda kolondan metanol geçirilerek bir sonraki kullanım için bırakıldı. Toplanan analitlerin UV-Vis spektrofotometrede 247 nm de ölçümleri alınarak kolon kapasitesi, geri kazanılan miktar ve % geri kazanım hesaplamaları yapıldı.

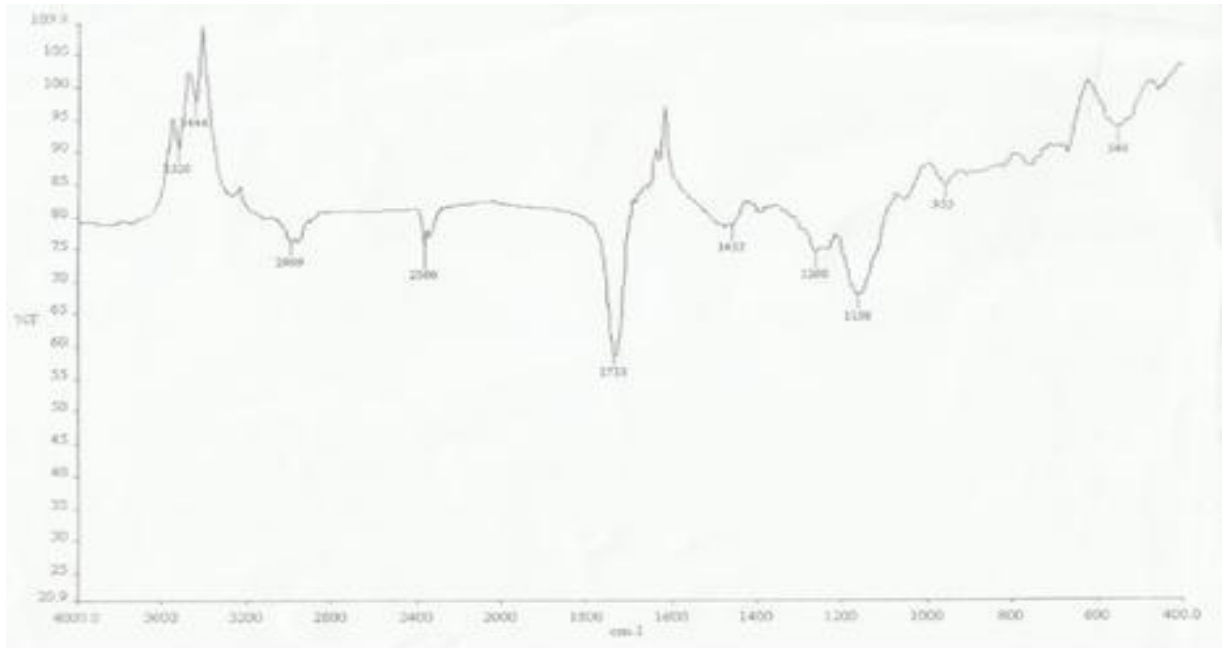
Çizelge 3.3 MIP-SPE kolonuna üzüm örneklerinin uygulaması

Kolon Kapasitesi	Geri Kazanılan Miktar	% Geri Kazanım
4,16 mg/g	96,25 mg/L	%92,5

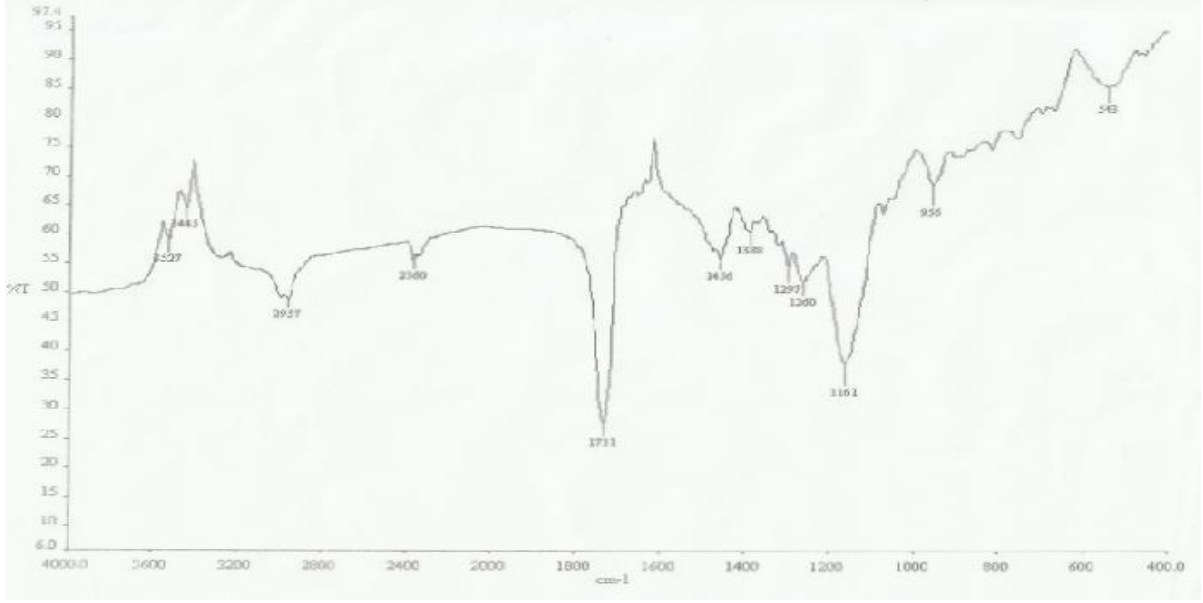
3.5 Trifloksistrobin Damgalı Polimerin Karakterizasyonu

3.5.1 Trifloksistrobin Damgalı Polimerin FT-IR Analizi

Trifloksistrobin damgalı polimerin ortamda trifloksistrobin olmadan ve trifloksistrobin uzaklaştırılmadan hazırlanan polimerin FT-IR analizi yapıldı. Buna göre her iki FT-IR analizinde 2950-2983 cm^{-1} band aralığında görülen alifatik CH_3 'lere ait olan pikin çapraz bağlayıcı EGDMA'ya ait olduğu bilinmektedir. 1731 cm^{-1} bandında görülen pikin $\text{N}=\text{CH}$ 'a yani fonksiyonel monomer olarak kullanılan 1-vinil imidazole ait olduğu düşünülmektedir. Uzayan polimer zincirinin karbonil gruplarına ait ($\text{C}=\text{O}$) pik ise 1733 cm^{-1} 'de yer almaktadır. Trifloksistrobin damgalı polimerde, trifloksistrobinin yapısındaki (C-F)' un varlığı, yıkanmamış MIP'in FT-IR analizi yapılarak gözlenmeye çalışıldı. Trifloksistrobin damgalı polimerde bulunan (C-F) piki alil halojenlerin bulunduğu 1400-1000 cm^{-1} aralığında görülmüştür. Yıkama sonrası pik şiddetlerindeki azalma ortamdan trifloksistrobinin uzaklaştırıldığını göstermektedir (Şekil 3.11).



A) NIP



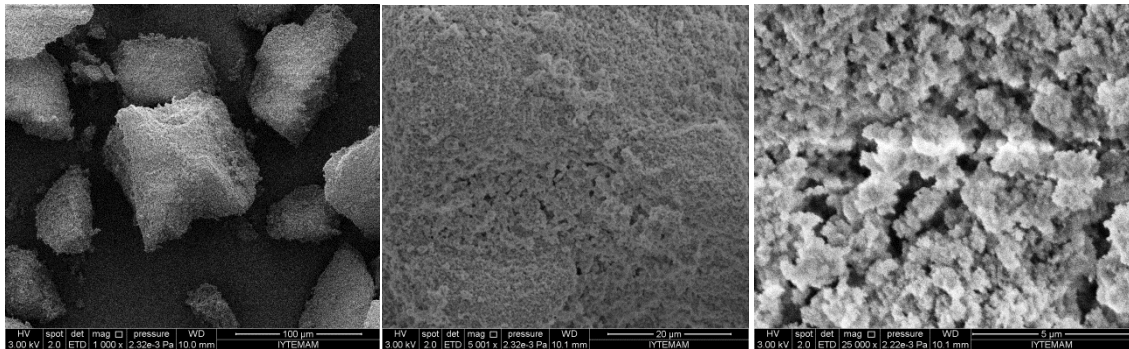
B) Yıkanmamış MIP

Şekil 3.11 Trifloksistrobin damgalı polimerlerin FT-IR analizi

3.5.2 Trifloksistrobin Damgalı Polimerin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Analizi

Taramalı Elektron Mikroskobu yüksek çözünürlüklü resim oluşturmak için vakum ortamında oluşturulan ve aynı ortamda elektromagnetik lenslerle inceltilen elektron demeti ile incelenecek malzemeyi analiz etme imkanı sunar. Mikroskopta oluşturulan resimler, elektron demetinin malzeme ile olan etkileşiminden ortaya çıkan ışımlar veya geri yansıyan elektronlar sayılarak oluşturulur.

SEM analizinde bulanık bir örneğin yüzeyi ince bir elektron demeti ile taranır; örnek önceden bir ışık iletici film ile kaplanmıştır (buharlaştırma ile). Demet örneğe çarptığı zaman çıkan ikincil elektronlar (geri saçılan elektronlar) veya X-ışını fotonlarının (elektron mikroskopta) toplanmasıyla oluşan bir sinyal, bir televizyon tüpünde elektron demetinin şiddetini düzeltmede kullanılır ve mikroskop demetiyle senkronize bir tarama yapar. Bu sinyal örneğe göre geniş mesafelerde küçük olduğundan, görüntülerin derinliği büyüktür ve üç boyutlu bir görüntü verirler. Resolusyon sınırı 100 Å° dolayındadır.

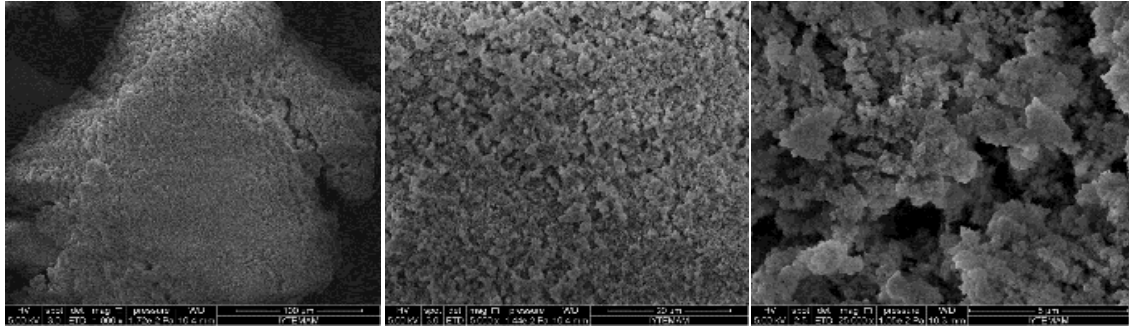


a

b

c

Şekil 3.12 NIP SEM görüntüsü a) 1000x b) 5000x c) 25000x büyütme

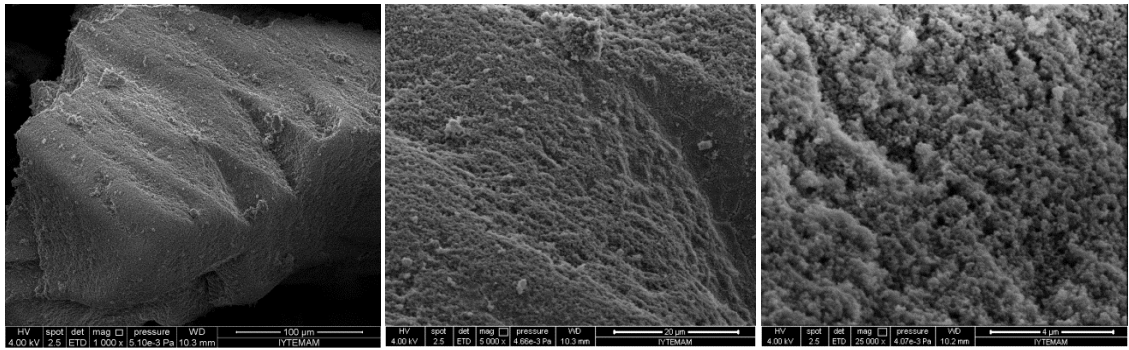


a

b

c

Şekil 3.13 Trifloksistrobin damgalanmış yıkanmamış polimer SEM görüntüsü **a)** 1000x **b)** 5000x **c)** 25000x büyütme



a

b

c

Şekil 3.14 Trifloksistrobin damgalanmış yıkanmış polimer SEM görüntüsü **a)** 1000x **b)** 5000x **c)** 25000x büyütme

SEM analizi sonucu kontrol polimerinde ve trifloksistrobin damgalı yıkanmamış polimerin yapısında az miktarda gözenğe rastlandı(Şekil 3.12)(Şekil 3.13) Trifloksistrobin damgalı polimerleri yıkadığımızda gözenek sayısında artış olduğu gözlemlendi.(Şekil 3.14).

KAYNAKLAR

1. Emir Diltemiz S, DNA'yı tanıma bölgelerine sahip moleküler baskılanmış polimer tekniğine dayalı biyosensör geliştirilmesi Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.2006
2. Ansell RJ, Ramström O, Mosbach K, Towards artificial antibodies prepared by molecular imprinting, Clin. Chem.,1996; 1506-12.
3. Lavignac N, Allender CJ, Brain K, Current status of molecularly imprinted polymers as alternatives to antibodies in sorbent assays, Anal. Chim. Acta.2004;510: 139–45.
4. Nostrum CF, Molecular imprinting: A new tool for drug innovation, Drug Discovery Today: Technol.2005; 2(1): 119-24.
5. Yan H, Row KH, Characteristic and synthetic approach of molecular imprinted polymer, Int. J. Mol. Cat.2006; 7: 155-78.
6. Mahony JO, Nolan K, Smyth MR, Mizaikoff B, Molecularly imprinted polymers—potential and challenges in Analytical Chemistry., Anal. Chim. Acta.2005;534: 31-9.
7. Wulff G, Vesper W, Grobe-Einsler R, Sahran A, Enzymeanalogue built polymers, 4. On the synthesis of polymers containing chiral cavities and their use for the resolution of racemates. Makromol. Cheme.1977; 178(10): 2799-816.
8. Mosbach K ve. Arshady R ,“Synthesis of substrate-selective polymers by host–guest polymerization,” Makromol. Chem.1981; 182: 687–92.
9. Vlatakis G, Andersson LI, Muller R, Mosbach K, Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting, Nature.1993; 361:645-7.
10. Rachkov A, Minoura N, Recognition of oxytocin and oxytocinrelated peptides in aqueous media using a molecularly imprinted polymer synthesized by the epitope approach, J. Chrom. A,2000;889 (1-2): 111-8.
11. Andersson LI, Mosbach K, Molecular imprinting of the coenzyme-substrate analogue N-pyridoxyl-L-phenylalaninamide, Die Makro-molekulare Chemie, Rapid Communications. 2003 ;10(9): 491-5.
12. Dong H, Tong A, Long-di L, Syntheses of steroid-based molecularly imprinted polymers and their molecular recognition study with spectrometric detection, Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.2003; 59(2):279-84.
13. Cormack PAG, Elorza AZ, Molecularly imprinted polymers: Synthesis and characterisation, J. Chrom. B.2004; 804:173–82.
14. Wandelt B, Mielniczak A, Cywinski P, Monitoring of cAMPimprinted polymer by fluorescence spectroscopy, Biosens. Bioelectron.2004; 20(6): 1031-9.

KAYNAKLAR (DEVAM)

15. Ansell RJ, Molecularly imprinted polymers for the enantioseparation of chiral drugs, *Advanced Drug Delivery Reviews*.2005; 57: 1809–1835.
16. Chen C, Chen Y, Zhou J, Wu C, A 9-vinyladenine-based molecularly imprinted polymeric membrane for the efficient recognition of plant hormone 1H-indole-3-acetic acid, *Anal. Chim. Acta*.2006;569(1-2):58-65.
17. Prasad K, Prathish KP, Gladis JM, Naidu GRK, Rao TP, Molecularly imprinted polymer (biomimetic) based potentiometric sensor for atrazine, *Sens. Actuators B*.2007; 123:65–70.
18. Siñeriz F, Ikeda Y, Petit E, Bultel L, Haupt K, Kovensky J, Papy-Garcia D, Toward an alternative for specific recognition of sulfated sugars. Preparation of highly specific molecular imprinted polymers, *Tetrahedron*.2007;63(8): 1857-62.
19. Ramström O, Ansell RJ, Molecular Imprinting Technology: Challenges and Prospects for the Future, *Chirality*,1998; 10:195–209.
20. Idziak L, Benrebouh A ve Deschamps F, Simple NMR experiments as a means to predict the performance of an anti-17 alpha-et hynylestradiol molecularly imprinted polymer, *Analytica Chimica Acta*.2001; 435:137-40.
21. Yu C, Mosbach K, "molecular imprinting utilizing an amide functional group for hydrogen bonding leading to highly efficient polymer," *J.Org. chem*.1997; 62: 4057-64.
22. Spivak DA, Optimization, evaluation, and characterization of molecularly imprinted polymers, *Adv. Drug Deliv. Rev*.2005; 57: 1779-1794.
23. Komiyama M, Takeuchi T, Mukawa T, Asanuma H, Molecular Imprinting: From Fundamentals to Applications, Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA, Weinheim.2003.
24. Wulff G, Best W, Akelah A, Enzyme-analogue built polymers: Investigations on the racemic resolution of aminoacids, *React. Polym*.1984; 2: 167–74.
25. Wulff G, Vietmeier J, Enzyme-analogue built polymers: Enantioselective synthesis of amino-acids using polymers possessing chiral cavities obtained by an imprinting procedure with template molecules, *Macromol. Chem*.1989; 190:1727–35.
26. Mukawa T, Goto T, Takeuchi T, Post oxidative conversion of thiol residue to sulfonic acid in the binding sites of molecularly imprinted polymers: Disulfide based covalent molecular imprinting for basic compounds, *Analyst*.2002; 127:1407–09.
27. Takeuchi T, Murase N, Maki H, Mukawa T, Shinmori H, Dopamine selective molecularly imprinted polymers via post-imprinting modification, *Org.Biomol.Chem*.2006;3:565-8.
28. Ramström L, Andersson I, Mosbach K, Recognition sites incorporating both pyridinyl and carboxy functionalities prepared by molecular imprinting, *J. Org. Chem*.1993; 58: 7562–64.
29. Meng ZH, Wang JF, Zhou LM, Wang QH, Zhu DQ, High performance cocktail functional monomer for making molecule imprinting polymer, *Anal. Sci*.1999; 15: 141–4.
30. Ikegami T, Mukawa T, Nariai H, Takeuchi T, Bisphenol A recognition polymers prepared by covalent molecular imprinting, *Anal. Chim. Acta*.2004; 504:131–5.
31. Haupt K, Molecularly imprinted polymers in Analytical Chemistry, *Analyst*.2001; 126: 747–56.

KAYNAKLAR (DEVAM)

32. Idziak I and Benrebouh A, A molecularly imprinted polymer for 17 α ethynylestradiol evaluated by immunoassay, *Analyst*.2000; 125: 1415–17.
33. Huang X, Kong L, Li X, Zheng C and Zou H, Molecular imprinting of nitrophenol and hydroxybenzoic acid isomers: effect of molecular structure and acidity on imprinting, *J. Mol. Recognit.*2003; 16: 406–411.
34. Sun R, Yu H, Luo H, Shen Z, Construction and application of a stoichiometric displacement model for retention in chiral recognition of molecular imprinting, *J Chromatogr. A*.2004; 1055: 1–9.
35. Piletska EV, Romero-Guerra M, Guerreiro A, Karim K, Turner APF, Piletsky SA, Adaptation of the molecular imprinted polymers towards polar environment, *Anal. Chim. Acta*.2005; 542: 47–51.
36. Shim YH, Yilmaz E, Lavielle S and Haupt K, Chiral recognition and separation of b2-amino acids using noncovalently molecularly imprinted polymers, *Analyst*,2004; 129: 1211–15.
37. Haupt K, Dzgoev A, Mosbach K, Assay system for the herbicide 2,4- dichlorophenoxyacetic acid using a molecularly imprinted polymer as an artificial recognition element, *Anal. Chem.*1998; 70: 628–31.
38. Peters EC, Svec F, Fréchet JM, Rigid Macroporous Polymer Monoliths, *Adv. Mater.*1999; 11: 1169–81.
39. Kim H, Guiochon G, Comparison of the thermodynamic properties of particulate and monolithic columns of molecularly imprinted copolymers, *Anal. Chem.*2005; 77: 93–102.
40. Mayes AG, Mosbach K, Molecularly imprinted polymer beads: suspension polymerization using a liquid perfluorocarbon as the dispersing phase, *Anal. Chem.*1996; 68: 3769–74.
41. Whitcombe M J, Rodriguez ME, Villar P, Vulfson E N, A New method for the introduction of recognition site functionality into polymers prepared by molecular imprinting: synthesis and characterization of polymeric receptors for cholesterol, *J. Am. Chem. Soc.*1995; 117: 7105-11.
42. Haginaka J, Monodispersed, molecularly imprinted polymers as affinity-based chromatography media, *J. Chromatogr. B* doi: 10. 1016/ j. jchromb.2007.
43. Ye L, Mosbach K, The technique of Molecular Imprinting- Principle, State of the Art, and Future Aspects, *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.*2001; 41: 107-13.
44. Cacho C, Turiel E, Martin-Esteban A, Pérez-Conde C, C mara C, Characterisation and quality assessment of binding sites on a propazine-imprinted polymer prepared by precipitation polymerisation, *J. Chrom. B*.2004; 802(2): 347-53.
45. Pérez-Moral N, Mayes AG, Comparative study of imprinted polymer particles prepared by different polymerisation methods, *Anal. Chim. Acta*.2004; 504:15–21.
46. Brüggemann O, Haupt K, Ye L, Yilmaz E, Mosbach K, New configurations and applications of molecularly imprinted polymers, *J. Chrom. A*.2000; 889:15-24.
47. Puoci F, Iemma F, Muzzalupo R, Spizzirri UG, Trombino S, Cassano R, Picci N, Spherical molecularly imprinted polymers (smips) via a novel precipitation polymerization in the controlled delivery of sulfasalazine, *Macromol. Biosci.*2004; 4: 22–6.

KAYNAKLAR (DEVAM)

48. Ye L, Cormack PAG, Mosbach K, Molecularly imprinted monodisperse microspheres for competitive radioassay, *Anal. Commun.*1999; 36: 35– 8.
49. Carabias-Martinez R, Rodriguez-Gonzalo E, Herrero-Hernandez E, Determination of triazines and dealkylated and hydroxylated metabolites in river water using a propazine-imprinted polymer, *J. Chromatogr. A.*2005; 1085: 199– 206.
50. Carabias-Martinez R, Rodriguez-Gonzalo E, Herrero-Hernandez E, Behaviour of triazine herbicides and their hydroxylated and dealkylated metabolites on a propazine-imprinted polymer Comparative study in organic and aqueous media, *Anal. Chim. Acta.*,2006;559: 186–94.
51. Liu ZS, Xu YL, Wang H, Yan C, Gao RY, Chiral separation of binaphtol enantiomers on molecularly imprinted polymer monolith by capillary electrochromatography, *Anal. Sci.*2004; 20: 673-8.
52. Boer T, Mol R, Jong RA, Sherrington DC, Cormack PAG, Ensing K, Spherical molecularly imprinted polymer particles: A promising tool for molecular recognition in capillary electrokinetic separations, *Electrophoresis.*2002; 23: 1296–1300.
53. Ciardelli G, Cioni B, Cristallini C, Barbani N, Silvestri D, Giusti P, Acrylic polymeric nanospheres for the release and recognition of molecules of clinical interest, *Biosens. Bioelectron.*2004; 20: 1083–90.
54. Liu F, Liu X, Ng SC, Chan HSO, Enantioselective molecular imprinting polymer coated QCM for the recognition of L-tryptophan, *Sens. Actuators B.*2006; 113: 234–40.
55. Tsunemori H, Araki K, Uezu K, Goto M, Furusaki S, Surface imprinting polymers for the recognition of nucleotides, *Bioseparation.*2002; 10: 315–21.
56. Zhong N, Byun HS ve Bittman R, “Hydrophilic cholesterol-binding molecular imprinting polymers,” *Tetrahedron Letter.*2001; 42: 1839-41.
57. Spegel P, Schweitz L, Nilson S, “Molecularly imprinted polymers” *Anal. Bioanal. Chem.*2002; 372:37-8.
58. Pool CF, “New trends in solid- phase extraction,” *Trends in Analytical Chemistry.*2003; 22(6): 362-73.
59. Caro E, Marce RM, Cormack Pag., Sherrington DC, Borrull F. On-line solid-phase extraction with molecularly imprinted polymers to selectively extract substituted 4-chlorophenols and 4-nitrophenol from water. *J Chromatogr A.* 2003;995:233–8.
60. Zhang M, Xie J, Zhou Q, Chen G, Liu Z, Off-line solid-phase extraction of ceramides from yeast with ceramide III imprinted monolith, *J. Chromatogr. A.*2003; 984: 173-83.
61. Zhu L, Xu X, Selective separation of active inhibitors of epidermal growth factor receptor from *Caragana Jubata* by molecularly imprinted solidphase extraction, *J. Chromatogr A.*2003; 991: 151-8.
62. Andersson LI, Paprica A, Avirdsson T, A highly selective solid phase extraction sorbent for pre-concentration of sameridine made by molecular imprinting, *Chromatographia.*1997; 46: 57-62.
63. Baggiani C, Giovannoli C, Anfossi L, Tozzi C, Molecularly imprinted solid-phase extraction sorbent for the clean-up of chlorinated phenoxyacids from aqueous samples, *J. Chromatogr. A.*2001;938: 35-44.

KAYNAKLAR (DEVAM)

64. Andersson LI, Molecular imprinting for drug bioanalysis A review on the application of imprinted polymers to solid-phase extraction and binding assay, J. Chromatogr. B.2000, 739: 163–3.
65. Kaya S, Pirinçci İ, Bilgili A, Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji, 2. baskı, Medisan Yayın. 2002;385-402.
66. Fish NA, Health hazards associated with production and preparation of foods. Can. J. Public Health.1968; 59(12): 463-6.
67. Kuter U, Sütlerde Bazı Organikfosforlu Pestisitlerin ve Bunların Süt Mamüllerine Geçiş Oranlarının Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma, E.Ü. Fen Bilimleri Ens. Doktora Tezi.1994; 1-96.
68. ANON.(2007c). Tarım. T. C. Çevre ve Orman Bakanlığı Türkiye Çevre Atlası. Erisim: [<http://www.cedgm.gov.tr/cevreatlasi/tarim.pdf>].2007.
69. Anwar WA, Biomarkers of human exposure to pesticides. Environ. Health Perspect., 1997;105(4): 801-6.
70. Pico Y, Blasco C, Font G, Environmental and food applications of LC-tandem mass spectrometry in pesticide-residue analysis: an overview. Mass Spec. Rev.2004;23: 45-85.
71. El-Toufaily F, Visnjeviski A, Brüggemann O, Screening combinatorial libraries of molecularly imprinted polymer films casted on membranes in single-use membrane modules, J. of Chrom. B.2004;804 (1): 135-9.
72. Janiak DS, Kofinas P, Molecular imprinting of peptides and proteins in aqueous media, Anal Bioanal Chem DOI 10.1007/s00216-007-1327-7.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Gizem KAZIMLAR

Dogum tarihi: 08/03/1986

Dogum yeri: Karşıyaka, İzmir

Medeni Hali: Bekar

Uyruğu: TC.

Görevi: Yüksek Lisans Öğrencisi

E-mail: gizemkazimlar@hotmail.com

Yabancı Dili: İngilizce