

**ZEYTİN YAPRAKLARINDAN SAF
OLEUROPEİN ELDESİ İÇİN MOLEKÜLER
BASKILI KATI-FAZ EKSTRAKSİYON
SİSTEMİ GELİŞTİRİLMESİ**

**Şenay Demirli
Yüksek Lisans Tezi**

**Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Ocak-2012**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Şenay Demirli'nin "Zeytin Yapraklarından Saf Oleuropein Eldesi İçin Moleküler Baskılı Katı-Faz Ekstraksiyon Sistemi Geliştirilmesi" başlıklı Kimya Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans tezi 05.01.2012 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	: Yard. Doç. Dr Ayça ÖZCAN	
Üye	: Prof. Dr. Rıdvan SAY	
Üye	: Doç. Dr. Ebru BİRLİK ÖZKÜTÜK	

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ZEYTİN YAPRAKLARINDAN SAF OLEUROPEİN ELDESİ İÇİN MOLEKÜLER BASKILI KATI-FAZ EKSTRAKSİYON SİSTEMİ GELİŞTİRİLMESİ

Şenay DEMİRLİ

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Yard. Doç. Dr. Ayça ÖZCAN
2012, 64 sayfa

Bu çalışmada, zeytin yaprağında bol miktarda bulunan ve birçok antimikrobiyel, antiviral, antifungal özelliğe sahip oleuropeinin, zeytin yaprağı ekstraktından ayrımı için moleküler baskılanmış polimerlerin (MIP) sentezlenmesi ve katı sorbent olarak kullanılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, ilk aşamada Metakroilamidoantipirin-Fe(III) [(MAAP)₂-Fe(III)] monomeri kullanılarak oleuropeine yüksek seçicilik gösteren moleküler baskılanmış polimerler hazırlanmış, ikinci aşamada bu polimerlerin adsorpsiyon kapasiteleri ile ilgili çalışmalar yapılmış ve son aşamada hazırlanan bu polimerlerin katı-faz ekstraksiyonu için katı sorbent olarak kullanımlarıyla zeytin yaprağı ekstraktlarından oleuropein ayrılmıştır. Oleuropein için maksimum adsorpsiyon kapasitesi 140 mg g⁻¹ olarak bulunmuştur. Elde edilen MISPE sistemi zeytin yaprağından oleuropein saflaştırılması için 10 defa kullanılabilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Molekül Baskılanmış Polimerler (MIP), Zeytin yaprağı, Oleuropein, Katı Faz Ekstraksiyonu (SPE)

ABSTRACT**Master of Science Thesis****DEVELOPMENT OF MOLECULAR IMPRINTED
SOLID-PHASE EXTRACTION SYSTEM FOR PURIFICATION OF THE
OLEUROPEIN OF THE OLIVE LEAVES****Şenay DEMİRLİ****Anadolu University
Graduate School of Science
Chemistry Program****Supervisor: Assoc.Prof. Ayça ÖZCAN
2012, 64 pages**

The aim of this study is synthesis of molecular imprinted polymers for the separation of oleuropein from extract of olive leaves and investigation of usage of these polymer as solid sorbent. Oleuropein is an abundant molecule where in olive leaf and has many antimicrobial, antiviral, antifungal features. First of all, oleuropein imprinted polymers have been prepared by the suspension polymerization using methacrylamidoantiprime-iron (III) (MAAP-Fe) monomers. After that, the oleuropein adsorption capacity of the prepared MIPs has been determined by batch experiments. Finally, the usage of the MIPs as sorbent in the solid-phase extraction cartridge for the separation of oleuropein from crude extract of olive leaves has been realized. The maximum adsorption capacity of oleuropein was found to be 140 mg g⁻¹. Obtained MISPE method could be used for at least 10 times for purification of oleuropein from olive leaf.

Keywords: Molecularly imprinted polymers, Olive leaf, Oleuropein, Solid-Phase Extraction

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmam süresince her türlü desteği, yardımı ve anlayışı gösteren danışman hocam Sayın Yard. Doç. Dr. Ayça ÖZCAN'a,

Bölümümüz imkanlarından yararlanmamı sağlayan ve bilgi birikimini ve yardımlarını esirgemeyen Kimya Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Rıdvan SAY'a,

Deneyisel çalışmalarımda, zeytin yaprağı ekstreğini sağlayan Bitki İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi çalışanları ve yöneticilerine,

Deneyisel çalışmalarımda bilgi birikimi ve yardımları ile yanımda olan Sayın Prof. Dr. Arzu ERSÖZ'e,

Seçicilik deneylerinde katkılarından dolayı Sayın Yard. Doç. Dr. Filiz YILMAZ'a,

Çalışmalarım esnasında bana destek olan Deniz Burçak BORUCU, Okan USLU, Adem YEŞİLKAYA, Gülnur DÖNMEZ, Ayşe ÇETİN ve tüm sevgili arkadaşlarıma,

Manevi desteğinden dolayı Ali Sefa ONSEKİZOĞLU'na,

Öğrenim hayatımın boyunca maddi ve manevi yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman sonsuz hoşgörü, sabır ve özveriyle beni destekleyen değerli ANNEM ve BABAM'a,

Sonsuz teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	x

1. GİRİŞ	1
1.1. Oleuropein.....	2
1.1.1. Zeytin yaprağı özütü.....	3
1.1.2. Zeytin yaprağı özütünde bulunan fenolik bileşikler.....	4
1.1.3. Oleuropein ve özellikleri.....	7
1.1.3.1. Antioksidan etkisi.....	9
1.1.3.2. Antimikrobiyal etkisi.....	9
1.1.3.3. Antiviral etkisi.....	10
1.1.3.4. Antitümöral etkisi.....	10
1.1.3.5. Oleuropeinin diğer önemli etkileri.....	11
1.2. Katı Faz Ekstraksiyonu (SPE).....	11
1.3. Moleküler Baskılanmış Polimerler (MIP).....	15
1.3.1. Moleküler baskılama yöntemi.....	15
1.3.2. Moleküler baskılamada bağlanma.....	16
1.3.3. MIP hazırlama teknikleri.....	19
1.3.4. Moleküler baskılama sentezinde kullanılan kimyasallar.....	20
1.4. Moleküler Baskılanmış Katı Faz Ekstraksiyonu (MISPE).....	25
1.5. Konuyla İlgili Yapılmış Çalışmalar.....	25

2. MATERİYAL VE YÖNTEM	28
2.1. Materyal.....	28
2.1.1. Kullanılan kimyasallar.....	28
2.1.2. Kullanılan cihazlar.....	28
2.2. Yöntem.....	29
2.2.1. Metakrilamidoantipirin (MAAP) monomerinin sentezi.....	29
2.2.2. Metakrilamidoantipirin-Fe ³⁺ ((MAAP) ₂ -Fe ³⁺) metal-şelat monomerinin sentezi.....	30
2.2.3. Oleuropein baskılanmış polimerlerin hazırlanışı.....	30
2.2.4. Adsorpsiyon çalışmaları.....	32
3.BULGULAR	33
3.1.Polimerik Mikrokürelerin Karakterizasyonu.....	33
3.1.1.MAAP ve (MAAP) ₂ -Fe ³⁺ metal-şelat monomerlerinin karakterizasyonu.....	33
3.1.2.Oleuropein baskılanmış polimerlerin karakterizasyonu.....	35
3.1.2.1.BET analizi.....	35
3.1.2.2.Şişme testi.....	35
3.1.2.3.FTIR analizi.....	36
3.1.2.4.Yüzey morfolojisi.....	38
3.2.Oleuropein Baskılanmış Polimerlerin Adsorpsiyon Kapasitesi.....	39
3.2.1.Oleuropein adsorpsiyonuna pH'ın etkisi.....	39
3.2.2. Oleuropein adsorpsiyonuna başlangıç derişiminin etkisi.....	40
3.2.3. Oleuropein adsorpsiyonuna zamanın etkisi.....	41
3.2.4.Adsorpsiyon izotermi.....	42
3.2.5.Oleuropein baskılı polimerin oleuropein bağlama etkinliğinin ölçülmesi.....	45
3.3. Oleuropein Baskılanmış Polimerlerin Desorpsiyon Çalışması.....	46
3.4.Oleuropein Baskılanmış Polimerlerin Yeniden Kullanılabilirliği.....	47
3.5.Oleuropein Baskılanmış Polimerlerin Seçiciliği.....	48
3.6.HPLC Cihazı ile Zeytin Yaprığı Ekstresindeki Oleuropeinin Tayini.....	48

3.7.Katı Faz Ekstraksiyonu ile Zeytin Yaprığı Ekstresinden Oleuropeinin Saflaştırılması.....	51
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	52
KAYNAKLAR	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

1.1. Rutin yapısı.....	6
1.2. Oleuropein yapısı.....	8
1.3. Oleuropeinin metabolizması.....	8
1.4. SPE yöntemi ile maddenin saflaştırılması.....	12
1.5. Moleküler baskılama yönteminin şematik gösterimi.....	16
1.6. Moleküler baskılamada kalıp ile hedef molekül arasındaki bağlanmaların şematik gösterimi.....	19
2.1. Metakroilamido antipirin (MAAP) monomerinin sentez reaksiyonu.....	29
2.2. (MAAP) ₂ -Fe(III) kompleksinin sentez reaksiyonu.....	30
2.3. Oleuropein baskılı polimer oluşumunun şematik gösterimi.....	31
3.1. MAAP monomerinin FTIR spektrumu.....	33
3.2. Metakroilamido antipirin (MAAP) ₂ -Fe(III) kompleksinin FTIR spektrumu.....	34
3.3. Saf oleuropein molekülünün FTIR spektrumu.....	37
3.4. (MAAP) ₂ Fe(III)-Oleuropein polimerine ait FTIR spektrumu.....	38
3.5. (MAAP) ₂ Fe(III)-Oleuropein polimerinin kalıptan uzaklaştırıldıktan sonraki SEM görüntüleri.....	39
3.6. Oleuropein adsorpsiyonuna pH'ın etkisi.....	40
3.7. Oleuropein adsorpsiyonuna başlangıç derişiminin etkisi.....	41
3.8. Oleuropein adsorpsiyonuna zamanın etkisi.....	42
3.9. Oleuropein adsorpsiyonu için Langmuir adsorpsiyon izotermi.....	43
3.10. Oleuropein adsorpsiyonu için Freundlich adsorpsiyon izotermi.....	44
3.11. Oleuropein bağlanmasına ilişkin Scatchard grafiğı.....	45
3.12. Oleuropein baskılı polimerlerin yeniden kullanılabilirliğı.....	47
3.13. Oleuropein için oluşturulan kalibrasyon eğrisi.....	49
3.14. Zeytin yaprağı ekstresinin HPLC kromatogramı.....	50
3.15. Zeytin yaprağı ekstresinin MİP tarafından adsorplanmayan süzütünün HPLC kromatogramı.....	50

3.16. Zeytin yaprağı ekstresinden ayrılan oleuropein için HPLC kromatogramı.....	51
---	----

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

1.1. Zeytin yaprağı ekstraktında en sık bulunan önemli basit fenolik bileşikler ve ilgili diğer bileşikler bildirilmiştir.....	5
1.2. Zeytin yaprağı ekstraktında en sık bulunan önemli sekoiridoidler.....	5
1.3. Zeytin yaprağı ekstraktında en sık bulunan önemli flavonoidler.....	6
1.4. Zeytin yaprağı özlerinde en sık bulunan biyoaktif bileşikler.....	7
1.5. Moleküler baskılamada kullanılan bazı fonksiyonel monomerler.....	20
1.6. Moleküler baskılamada kullanılan bazı çapraz bağlayıcılar.....	22
1.7. Moleküler baskılamada kullanılan bazı kimyasal başlatıcılar.....	24
3.1. Oleuropein baskılanmış ve baskılanmamış mikrokürelerin kuru ve şişmiş haldeki yükseklikleri.....	36
3.2. (MAAP) ₂ Fe(III) baskılı mikroküreler için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon modellerinin karşılaştırılması.....	44
3.3. Çeşitli elüentlerin desorpsiyon miktarları ve yüzde desorpsiyon oranlar.....	46

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AIBN	: 2,2'-azobisisobütironitril
BET	: Brunauer-Emmett-Teller
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDMA	: Etilenglikoldimetakrilat
FTIR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi
HIV	: İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
LDL	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
MAAP	: Metakroilamido antipirin
(MAAP) ₂ Fe ³⁺	: Metakrilolilamidoantipirin-Fe(III)
MIP	: Moleküler Baskılanmış Polimerler
MISPE	: Moleküler Baskılı Katı Faz Ekstraksiyonu
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
SPE	: Katı Faz Ekstraksiyonu
UV-Vis	: Mor ötesi-Görünür Bölge

1. GİRİŞ

Zeytin yaprağı, başta oleuropein olmak üzere birçok polifenol ve daha birçok flavonoid (Rutin, Apigenin, Luteolin) içerir. Oleuropein'in içeriğindeki elonoik asidin antibakteriyel, antifungal, antioksidan ve antiviral özellikleri laboratuvar koşullarında kanıtlanmıştır. Bu özellikleriyle doğal antibiyotik olduğu bilinmektedir. Bu nedenle zeytin yaprağı ekstreleri ticari olarak marketlerde satılmaya başlanmıştır. Son zamanlarda zeytin yaprağının içeriği ve bileşenlerinin ekstraksiyonu üzerine çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Zeytin yaprağı ekstresi elde etmek için süperısıtılmış sıvı ekstraksiyonu, dinamik ultrasound yardımcı ekstraksiyon ve süperkritik akışkan ekstraksiyonu yöntemleri kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar daha çok ham ekstrakt ile sınırlıdır. Yaprak ekstresindeki spesifik bileşenlerin ayrı ayrı saflaştırılarak elde edilmesine yönelik fazla bir çalışma yoktur. Bugüne kadar polifenollerin saflaştırılması, preperatif ince tabaka kromatografisi ya da adsorpsiyon kromatografisi teknikleri ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla kollojen, selüloz ve ipek fibroini gibi birçok biyopolimer adsorbent olarak kullanılmıştır.

Hem organik hem de sulu çözeltilerde gösterdikleri yüksek seçicilik, kararlılık ve tamamlayıcılık özellikleri nedeniyle moleküler baskılı polimerlerin (MIP) katı-faz ekstraksiyonu ile örnek deriştirme ve saflaştırmada adsorbent olarak kullanımları oldukça etkin olmaktadır. Rutin analizler, genellikle iyon-değişim veya hidrofobik reçineler gibi bilinen adsorbentlerle, katı-faz veya çözücü-faz ekstraksiyon basamakları içerirler. İşte bu işlemlerde kullanılan adsorbentlerin yerini MIPlar almaya başlamıştır. Kan serumu, idrar gibi kompleks örneklerden bir çok bileşiğin ekstraksiyonu bu yöntemle gerçekleştirilmiştir.

Moleküler baskılamada, 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. Baskılanacak molekül veya iyon bir veya daha fazla fonksiyonel monomer ile kovalent, kovalent olmayan etkileşimler ve metal-şelat etkileşimlerine dayanan ön-kompleks oluşturur ve polimerizasyon işlemi sonunda katı polimer içinde veya yüzeyinde sabitleşir. Baskılanmış iyon veya molekülün yapıdan uzaklaştırılması ile bir çözelti içindeki hedef molekül veya iyonun seçici olarak tekrar polimere

bağlanmasını sağlayacak şekilde antijen-antikor etkileşimiyle yarışabilecek seçicilikte yuvalar oluşur.

Zeytin ağacında ve özellikle yapraklarında bulunan tıbbi değeri yüksek oleuropein bileşeninin son derece yüksek seçiciliğe sahip adsorbentler olan MIPlerin kullanımıyla fazla bir ön işlem ve ayırma basamağı gerekmeden basit ve ucuz olarak preperatif olarak saflaştırılmasına çalışılmıştır.

Bu çalışmanın amacı; tıbbi alanda kullanılmak üzere zeytin yaprağında bulunan oleuropein, bileşenine yönelik seçici bölgeler içeren, düşük maliyetli, yeni nesil molekül bellekli polimerlerin (MIP) hazırlanması ve hazırlanan malzemelerle zeytin yaprağı ekstresinde bulunan bu değerli bileşiklerin kolayca ayrılması ve saf olarak elde edilmesi işlemlerinin gerçekleştirilebilmesidir.

Bu çalışma kapsamında metakrilolilamidoantipirin-Fe(III) (MAAP-Fe) monomeri ve oleuropein kullanarak ön-organize bir metal-şelat monomeri sentezlenip ve bu monomerden yola çıkılarak oleuropein baskılı polimer elde edilmiştir.

1.1. Oleuropein

Yüzyıllardır yaprak dökmeyen zeytin ağaçlarında, zeytin meyvesi ve yağı değerli olmuştur. Zeytin ağacının diğer bir bölümü olan zeytin yaprağı ise doğal antioksidan kaynağıdır ve birçok biyoaktif içeriğe sahiptir.

Zeytinin doğrudan yenilebilir nitelikte olmamasının en önemli nedeni içerisinde bulunan acılık unsuru bileşiklerdir. Zeytin işleme teknikleri bu acılık unsuru bileşiklerin bünyeden uzaklaştırılması amacına yönelik olarak geliştirilmiştir. Bu bileşikler arasında büyük pay sahibi olan oleuropein, meyvenin olgunlaşması sırasında dönüşüme uğrayan fenolik yapıda bir bileşiktir. (Öngen ve ark. 2000). Olgunlaşma ile oleuropein miktarı azalırken tirosol ve hidrokstirosol oranı artmaktadır (Ryan ve ark. 1999a; Piga ve ark. 2001 ve Ferreira ve ark. 2002). Zeytin yaprağındaki oleuropein miktarında ise azalma olmamaktadır.

Luque de Castro ve ark. (2006) zeytin yağı ve zeytin yaprağı ekstresi ile gerçekleştirdikleri bir çalışma ile oleuropein miktarlarını karşılaştırmışlar ve zeytin yaprağı ekstresindeki oleuropein miktarının daha yüksek olduğunu

göstermişlerdir. Aynı grubun zeytin yağı, yaprağı, zeytinin küçük dalları ve çekirdekleri ile yaptıkları başka araştırmada da en fazla zeytin fenolünün ve oleuropeinin zeytin yaprağı ekstresinden elde edildiği gösterilmiştir (Luque de Castro ve ark. 2010).

1.1.1. Zeytin yaprağı ekstraktı (özütü)

Zeytin yaprağı, anavatanı Asya ve Suriye olan ancak Şili, Peru ve Güney Avustralya gibi Akdeniz ülkelerinde de yetiştirilen *Olea europaea* L. olarak bilinen yeşil ağaçların yapraklarından elde edilir. Dünyada tahmini olarak 500 milyon zeytin ağacı yetiştirilmektedir ve bunların % 90'nı Akdeniz sınırlarında bulunmaktadır (Hansen 2002).

Zeytin üretiminin yan ürünlerinden biri zeytin yapraklarıdır. Zeytin yağı endüstrisinde, zeytinlerin ağırlıkça % 10'unu zeytin yaprakları oluşturur. Zeytin yaprakları özellikle ağaçların budanması sırasında toplanmaktadır (Bouaziz ve Sayadi, 2005).

Zeytin yaprağı ekstresi, fiziksel ve kimyasal metodlarla zeytin ağacı yapraklarından elde edilir. Bu ekstrakt, tüm bileşikleri, saf olarak içermektedir ayrıca; 250 mikrogram A vitamini, 40 mikrogram selenyum, 250 miligram C vitamini, 20 mg askorbil-palmitat içerir. Zeytin yaprağı ekstresinde, zeytin yaprağının bileşenlerini, konsantre olarak bulunmaktadır. Yani, 1 gr yaprakta, yaklaşık % 5 oleuropein bulunurken; 1 gr zeytin yaprağı ekstresinde bu oran, % 20'lere kadar çıkmaktadır. % 6-15 oranında oleuropein içeren kuru zeytin yaprağı ekstresi, ticari olarak satılmaktadır (Anonim, 2011).

Doğal antibiyotik ve antioksidan özellikler taşıyan zeytin yaprağı, eski çağlardan bu yana tedavide kullanılmıştır. Zeytin yaprağının etkisi son zamanlarda yapılan klinik araştırmalarla viral, bakteriyel ve mantar enfeksiyonlar, HIV-AIDS, kronik yorgunluk, hepatit B, zatüre, tüberküloz, grip, soğuk algınlığı, menenjit, zona, Epstein-barr virüsü, ensefalit, bel soğukluğu, şiddetli ishal, kan zehirlenmesi; kulak, diş, idrar yolları ve cerrahi enfeksiyonlara karşı geniş bir yelpazede başarılı olduğunu göstermiştir (Page, 2002).

1.1.2. Zeytin yaprağında bulunan fenolik asitler

Sebze ve meyvelerde az miktarlarda bulunmalarına rağmen önemli olan bir madde grubu olan fenolik maddeler bitkisel kaynaklı besinlerin lezzetine (özellikle ağızda buruk bir tat bırakmaları) ve rengine etki eder. Fenolik maddeler aromatik halkasında bir veya daha fazla hidroksil grubu içeren bileşiklerdir (Shahidi ve Nacz, 1995). Bu nedenle en basit fenolik maddenin bir tane hidroksil grubu içeren benzen yani fenol olduğu ve diğer fenolik maddelerin bundan türediği bilinmektedir (Cemeroğlu ve Acar, 1986). Fenolik maddeler basit fenolik maddeler ve polifenoller olmak üzere kabaca iki gruba ayrılmaktadır.

Fenolik maddeler açısından meyvelerin sebzelerden daha zengin olduğu bilinmektedir. Ancak fenolik maddeler bitkiler aleminde çok yaygın olduğundan dolayı hemen her sebze ve meyvede az ya da çok miktarda bulunmaktadır. Fenolik maddeler gıdaların besin değeri ve duyusal kalitesi ile de yakından ilişkilidir. Düşük konsantrasyonlarda bulunmalarına rağmen gıdaları oksidatif bozulmalardan korurken yüksek konsantrasyonlarda çökerek ürünün rengini bozmaktadırlar (Shahidi ve Nacz, 1995).

Son zamanlarda, doğal olmayan maddelerin kullanımından uzaklaşmaya başlanmış ve doğal fenolik maddelere olan eğilim artmıştır. Gıda, deri ve farmakoloji alanlarındaki kullanım olanakları yanında, insan sağlığı üzerinde önemli etkileri olan fenolik maddelerin etki mekanizmalarının anlaşılması ve teknolojik olarak kullanılabilme yollarının araştırılmasının önemli olduğu görülmektedir.

Zeytin yaprağı ekstresinde bulunan fenolik bileşikler ise dört ana grupta toplanabilir. Bunlar; basit fenolik bileşikler, sekoiridoidler, flavonoidler ve biyoaktif bileşiklerdir (Tsimidou ve Papoti, 2010).

Çizelge 1.1’de zeytin yaprağı ekstresinde en sık bulunan basit fenoller listelenmiştir. Basit fenollerden elenolik asit ve hidroksitirozol, oleuropeinin alt birimlerindendir. Ayrıca oleuropeinin antioksidan, antiviral, antimikrobiyal özellikler göstermesinde etkilidirler.

Çizelge 1.1. Zeytin yaprağı ekstresinde en sık bulunan önemli basit fenolik bileşikler ve ilgili diğer bileşikler bildirilmiştir

Hidroksitirosol ve glukositler	
Tirosol ve glukositler	
Benzoik asitler:	Gallik, vanillik, syrinjik, salisilik, hidroksibenzoik, protokatehuik asitler, vanillin
Sinnamik asitler:	Sinnamik, kaffeik, kaumarik, ferulik, klorogenik asitler
Homovanillik asit	
Diğer ilgili bileşikler:	Elenolik asit ve türevleri, verbaskosit

Çizelge 1.2’de listelenmiş olan zeytin yaprağı ekstresindeki sekoiridoidlerden oleuropeinin, yapılan HPLC analizleri sonucunda zeytin yaprağında en bol bulunan fenolik bileşik olduğu anlaşılmıştır (Garcia ve ark. 2000; Savournin ve ark. 2001 ve Lee-Huang ve ark. 2003).

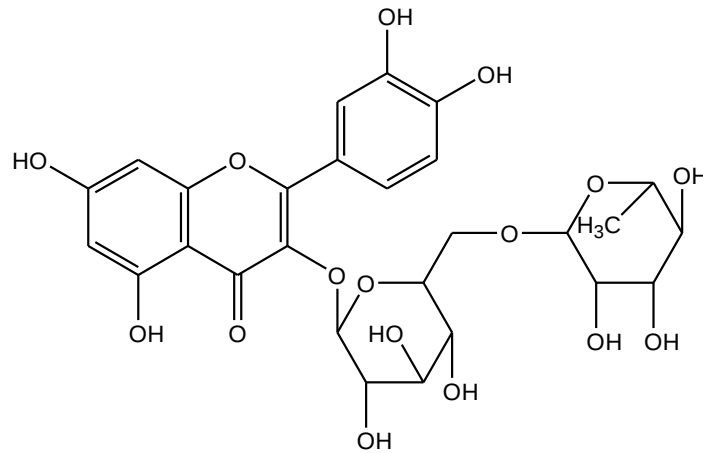
Çizelge 1.2. Zeytin yaprağı ekstraktında en sık bulunan önemli sekoiridoidler

Demethiloleuropein
3,4-DHPEA-EDA (3,4-dihidroksifeniletil 4-formil-3-formilmethyl-4-heksenat)
Oleoside
Oleuropein
Oleuropein aglikon
Oleuroside
Ligstroside
Ligstrosit aglikon

Çizelge 1.3'te ise zeytin yaprağı ekstresinde en sık bulunan flavonoidler sıralanmıştır. Bunlardan rutin zeytin yaprağında bulunan en bol ikinci bileşendir. Diğer bileşenlerin yüzdeleri bu iki bileşenle karşılaştırıldığında daha düşüktür. Şekil 1.1'de rutin yapısı verilmiştir.

Çizelge 1.3. Zeytin yaprağı ekstresinde en sık bulunan önemli flavonoidler

Apigenin	Luteolin 4'-O-glukosit
Apigenin 7-O-glukosit	Luteolin 7-O-glikosit,
Apigenin 4-O-rutinosit	Luteolin 7-O-rutinosit
Apigenin 7-O-rutinosit	Kuersetin
Hesperidin	Kuersitrin
Luteolin	Rutin



Şekil 1.1. Rutin yapısı

Son olarak Çizelge 1.4'de zeytin yaprağı ekstresinde bulunan biyoaktif bileşikler listelenmiştir.

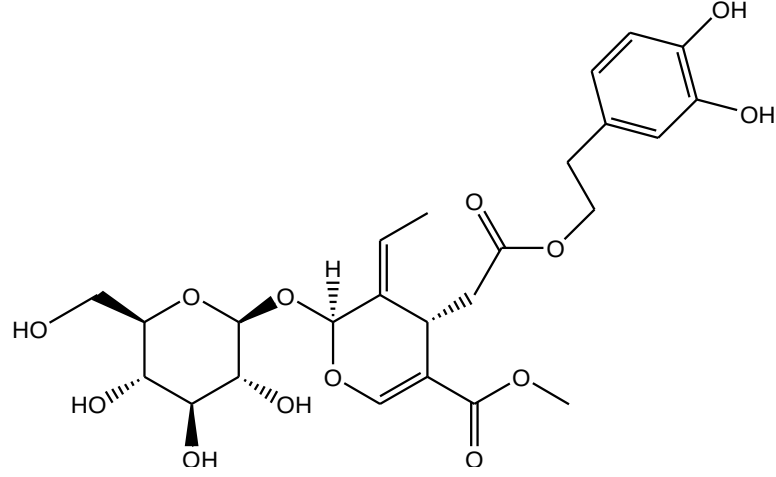
Çizelge 1.4. Zeytin yaprağı ekstresinde en sık bulunan biyoaktif bileşikler

Amyrin	Squalene
β -karoten	Stigmasterol
Erythrodiol	Tokoferol (vitamin E)
Maslinik asit	Ursolik asit
Oleanolik asit	Uvaol
β -sitosterol	

1.1.3. Oleuropein ve özellikleri

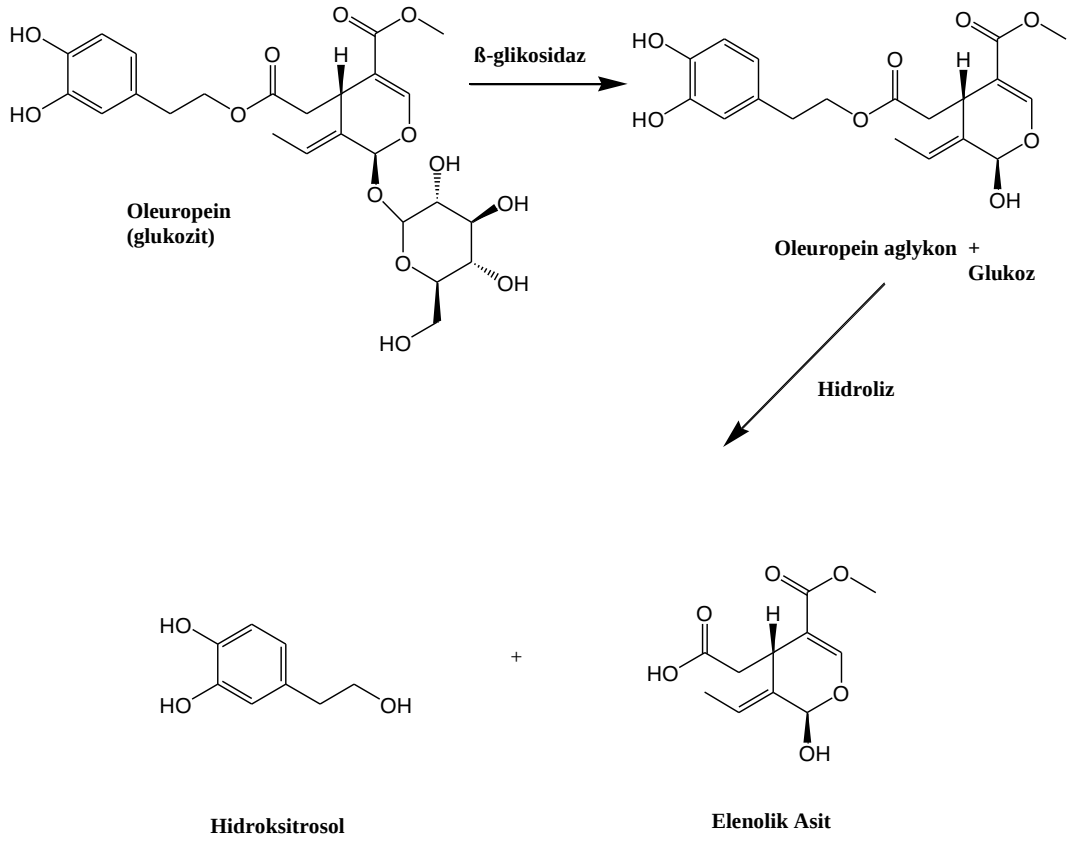
Polifenoller olarak da bilinen fenolik bileşiklerin en önemlilerinden biri olan oleuropein, bitkisel kökenli tüm gıdalarda az yada çok miktarda bulunur ve zeytin yaprağında, 60-90 mg/gr oranında, oleuropein bileşiği bulunmaktadır. Oleuropein meyve ve sebzelerde buruk tada neden olur ve onlarda antioksidan özellikler görülmesini sağlar. Polifenollerin antioksidan özellikleri anlaşılmasından sonra oleuropein, elenolik asit ve hidroksitirizol ile ilgili yapılan çalışmalar son yıllarda artmıştır ve bu maddelerin antimikrobiyal, antiviral, antioksidan, hipoglisemik gibi birçok etkilerinin olduğu laboratuvar koşullarında kanıtlanmıştır. Bu özellikleri ile doğal antibiyotik olduğu bilinir (Ersus ve Esen, 2008).

Oleuropein moleküler olarak 3 yapısal alt birimden oluşur. Bunlardan birincisi polifenol yapısında olan 4-(2-hidroksietil)benzen-1,2-diol (hidroksitirizol); ikincisi molekril elenolik asit ve diğeri glikoz molekülüdür (Ersus ve Esen, 2008).



Şekil 1.2. Oleuropein yapısı

Oleuropein Şekil 1.2’de gösterildiği gibi glukoz ve oleuropein aglykon yapılarından oluşmaktadır.



Şekil 1.3. Oleuropeinin metabolizması

Şekil 1.3’de ise oleuropein ve oleuropeinin hidroliz yoluyla dönüştüğü biyoaktif maddeleri hidroksitirizol ve elenolik asit görülmektedir (Al-Azzawie ve ark. 2006 ve Bonilla ve ark. 2006).

Zeytin yaprağı ekstresindeki tedavi edici özelliğin oleuropeinden geldiği ilk kez 1908 yılında anlaşılmıştır (Walter ve ark. 1973). Zeytin yaprağının tedavi için ilk kullanımı ise 1843 yılında İngilterede Daniel Hambury tarafından sıtma ateşi için olmuştur (Le Floch ve ark. 1998). Son yüzyılda zeytin yaprağının antioksidan, antimikrobiyal, antiviral, hipoglisemik ve antitümöral etkilerine yönelik birçok çalışma yapılmıştır.

1.1.3.1. Antioksidan etkisi

Tutour ve Guedon’un (1992) yaptığı bir çalışmada oleuropeinin etkileri, güçlü bir antioksidan olan vitamin E ile karşılaştırılmış ve oleuropeinin antioksidan etkilerinin daha yüksek olduğu anlaşılmıştır.

Yapılan başka bir çalışmada ise oleuropeinin süperoksit anyon oluşumu, hipoklorik asit oluşumu ve mitokondrial solunum patlaması üzerindeki süpürücü aktiviteleri araştırılmış bunların güçlü antioksidan olan vitamin E ve vitamin C’ye göre daha yüksek radikal temizleyici etkilerinin olduğu görülmüştür (Visioli ve Bellomo, 1998).

Ayrıca antioksidan aktivitesinden dolayı zeytin yaprağı ekstresinin, gıdaların işlenmesi ve depolanması sırasında gıda bozunumuna neden olan lipid oksidasyonunu engellediği ve gıdaların raf ömrünü arttırdığı anlaşılmıştır (Bouaziz ve Sayadi, 2005).

1.1.3.2. Antimikrobiyal etkisi

Zeytin yaprağı ekstresi, antioksidan kapasitesi yanında, birçok mikroorganizmaya antimikrobiyal aktivite de göstermiştir (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis*, *T. rubrum* and *Candida albicans*) (Markin ve ark. 2003). Yine bu konuda çalışan Aziz ve arkadaşları da (1998), oleuropein ve fenolik

bileşiklerin E.coli, K.pneumonia ve B.cereus'a karşı engelleyici özelliklerini göstermişlerdir.

Oleuropeinin antimikrobiale özelliği üzerine yapılan iki ayrı araştırmada ise birçok gram pozitif ve gram negatif mikroorganizmalar üzerindeki engelleyici etkisi olduğu gösterilmiştir (Liott ve ark. 1969 ve Markin ve ark. 2003).

Liott ve arkadaşları (1969), oleuropeinin fenolik asit bileşenlerinin h.pylori, c.jejuni ve s.aureus karşı antibakteriyel etkileri olduğunu göstermiştir.

Oleuropein birçok virüs ve bakteri üzerindeki antimikrobiyal etkisini birçok mekanizma ile sağlar. Bu mekanizmalar, mikroorganizmalar hem büyüme hızını düşürür hemde enzimleri inhibe eder, mikroorganizma hücre zarının geçirgenliğini bozarak stoplazmik bileşenlerin hücre dışına sızmasına neden olur, mikroorganizma nükleaz ve lizozim inhibisyonuna neden olur, DNA Polimeraz II ve DNA Polimeraz III haloenzimlerinin dönüşümsüz inhibisyonuna neden olur (Markin ve ark. 2002; Tuck ve Hayball, 2002 ve Körükoğlu ve ark. 2004).

1.1.3.3. Antiviral etkisi

Oleuropein virüs kılıfında asit üretimine etki ederek ve viral infektifiteyi engelleyerek parainfluenza, herpes, polio, insan immün yetmezlik virüsüne(HIV) karşı etkileri olduğu konusunda in-vitro çalışmalar vardır (Micol ve ark. 2005 ve Lee-Huang ve ark. 2003). Lee-Huang ve arkadaşları (2007), yaptıkları başka bir çalışmada da zeytin yaprağı ekstresindeki oleuropein ve hidroksitirozol'un viral füzyon ve entegrasyona karşı etkili HIV-1 engelleyiciler oldukları göstermişlerdir.

1.1.3.4. Antitümöral etkisi

Hamdi ve Castellon (2005), yaptıkları insan ve hayvan deneylerinde oleuropeinin antitümöral ve antianjiyojenik etkilerinin direkt olarak tümör hücreleri üzerinde olduğunu göstermişlerdir. Birçok araştırmada oleuropeinin, meme kanserinde kontrolsüz hücre büyümesini engellediği gösterilmiştir (Goulas ve ark. 2009; Hamdi ve Castellon, 2005; Han ve ark. 2009; Menendez ve ark. 2007 ve Sirianni ve ark. 2010).

Ayrıca oleuropeinin, bazı böbrek tümörleri (örneğin nefrokarsinom) (Hamdi ve Castellon, 2005), kötü huylu melanoma (Melanik ya da pigmentli tümör) (Hamdi ve Castellon, 2005), mesane kanseri (Han ve ark. 2009) ve aynı zamanda lösemi hücreleri (Fabiani ve ark. 2006, 2008b) gibi birçok tümör hücrelerinin yayılmasını engelleme kapasitesinin olduğu ortaya konmuştur.

1.1.3.5. Oleuropeinin diğer önemli etkileri

Oleuropein hayvanların kan basıncını düşürmek (Samuelsson, 1951), koroner arterlerin kan akışını arttırmak (Zarzuelo, 1991) ve bağırsak kas spazmlarını önlemek için kullanılmıştır (Garcia ve ark. 2000).

Zeytin yaprağı ekstresinden izole edilen birçok fenolün gut ile ilgili ksantin oksidaz enzimi engelleyici oldukları görülmüştür. Zeytin yaprağı ekstresinin ana fenolik bileşiği olan oleuropeinde bu engelleyici etkide önemli bir paya sahiptir (Flemming ve ark. 2011).

Zeytin yaprağının, kan şekerinin herhangi bir nedenle aşırı derecede düşmesi olarak tanımlanan hipoglisemik aktivite üzerinde olumlu etkileri olduğu yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Gonzalez ve ark. 1992 ve Fehri ve ark. 1994).

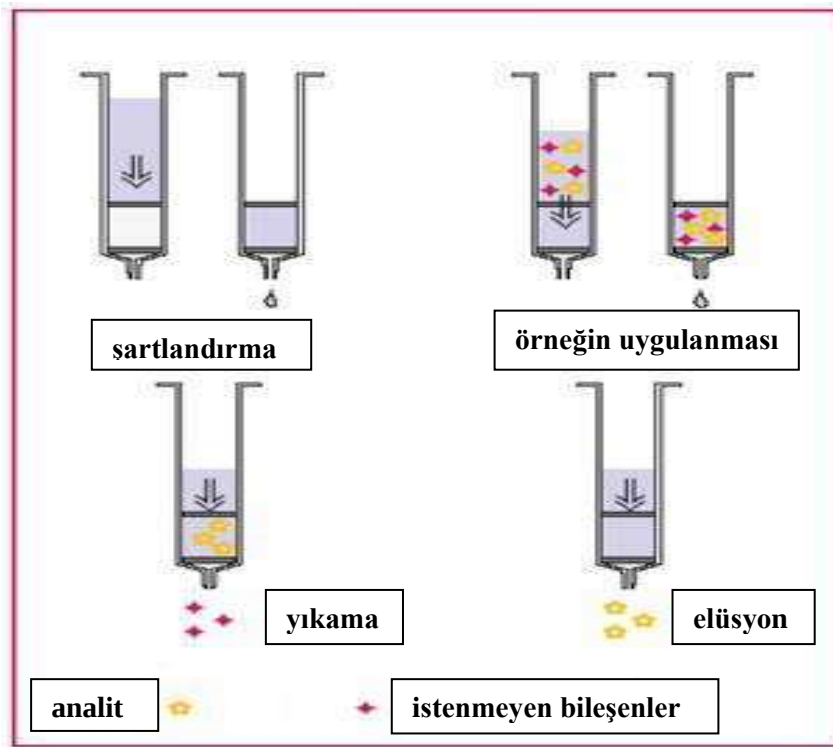
Oleuropeinin düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonunu azalttığı in-vivo ve in-vitro çalışmalarda gösterilmiştir (Visioli ve Galli, 1994 ve Coni ve ark. 2000). Al-Azzawie ve Alhamdani (2006), oleuropeinin kandaki LDL oksidasyonunu azaltmasının yanında oksidatif strese bağlı gelişen diyabetik komplikasyonları da engelleyebileceğini bildirmişlerdir.

1.2. Katı Faz Ekstraksiyonu (SPE)

Eser miktardaki elementlerin analizden önce bulunduğu karmaşık ortamlardan ayrılması ve saflaştırılması deneysel sonuçların doğruluğu açısından çok önemlidir. Bu yüzden elementlerin ayrılması ve saflaştırması için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bunlardan bazıları çözücünün buharlaştırılması, çöktürme, iyon değişimi, santrifüj etme, ısı ile yumuşatma, elektroanalitik yöntemler ve sıvı sıvı ekstraksiyonu olarak verilebilir.

Katı faz ekstraksiyon metodu örnek hazırlama işleminin basitleştirilmesi, zaman kaybının önlenmesi ve analiz maliyetinin azaltılması amacıyla, 1970'li yılların ortalarında klasik metotlara alternatif olarak kullanılmaya başlanmıştır (Pichon, 2000 ve Poole ve ark. 2000). Günümüzde en etkili örnek hazırlama yöntemlerinden olan SPE, özellikle ilaç ve diğer farmasotik maddelerin analizinde en fazla kullanılan yöntemlerin başında gelmektedir (Stevenson, 2000 ve Hennion, 1999).

Şekil 1.4'de görüldüğü gibi SPE yöntemi küçük ve tek kullanımlık ekstraksiyon kolon veya disklerine çeşitli tutucu maddelerin doldurulması ve sıvı örneklerin istenmeyen bileşenlerden ayrılması, yoğunlaştırılması ve ileriki analiz aşamaların da örneğin hazırlanması için kolon ve disklerden geçirilmesi temeline dayanmaktadır.



Şekil 1.4. SPE yöntemi ile maddenin saflaştırılması

Katı faz ekstraksiyonu, hızlı ve basit olması, katı fazın kararlı olması ve tekrar kullanılabilmesi, yüksek deriştirme faktörü elde edilmesi, az miktarda çözücü kullanılması ve ucuz olmasından dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır (Büyüktiryaki, 2005).

Özellikle sıvı-sıvı ekstraksiyon teknikleri ile karşılaştırıldığında, SPE metodunun daha hızlı sonuç vermesi (Macherey-Nagel, 2004), çok pratik olması, geri kazanım oranının yüksek olması, (Beney ve ark. 1996 ve Majors, 2001), çözücü ve örneklerin az miktarda kullanılması sonucu zehirli maddelerle temasın daha az olmasından dolayı daha güvenli oluşu (Beney ve ark. 1996 ve LeBlanc, 2001) ayrıca örnek, tutucu madde ve çözücüler arasında çapraz bağlanma riskinin düşük olmasından dolayı sonuçların doğruluğunun yüksek olması (Beney ve ark. 1996) SPE metoduna olan ilgiyi arttırmıştır. SPE metodunun tercih edilmesindeki en önemli sebep ise çok geniş adsorban seçeneğine sahip olmasıdır (Hennion, 1999).

Silika jel veya silika membran diskler (Shamsipur ve ark. 2005; Sanchez ve ark. 2000 ve Soliman ve ark. 2004), aktif karbon, iyon değıştirici reçineler (Bae ve ark. 1999; Pohl ve Prusisz, 2004; Maheswarı ve Subramanian, 2004 ve Swain ve ark. 2000), selülozik türevler, polistrendivinilbenzen esaslı adsorbanlar, poliürtan polimerler, şelatlaştırmıcı reçine (Gou ve ark. 2004), şelatlaştırmıcı fiber (Chang ve ark. 2001), naftalin ve moleküler baskılanmış polimerler (Masque ve ark. 2002 ve Sellerger, 1999) gibi bazı farklı katı destekler seçilen şelatlaştırmıcı reaktiflerin fiziksel yüklenmesi ile yada kimyasal bağlanması ile eser miktardaki metale seçici katı faz destekler hazırlanabilir.

Herhangi bir sabit fazla doldurulan SPE kolonlarında başlıca sorun tutunma mekanizmasının seçiciliğinin düşük olmasıdır. Özellikle oktadesil (C_{18}), iyon değışim ve moleküler eleme yöntemlerinde kullanılan diğerk SPE tutucu madde ve ortamları, kalıntı analizlerinde aranan çok düşük düzeyde maddeler için yeterli seçiciliğe sahip değildir. Bu yüzden analiz edilecek madde çözeltisine matriksteki istenmeyen bileşikler karışır ve istenilen saflıkta süzüntü elde edilemez. Bu sakıncanın ortadan kaldırılması amacıyla, bir çok SPE tutucusuna hedef maddeye spesifik bileşenler eklenmiş ve seçicilikleri artırılmıştır. Tutucu maddelere eklenen bu özel maddeler arasında boronat, lektin, protein A ve G,

sabit metal iyonları, peptidler ve antikorlar sayılabilir. Özellikle antikorlar, bileşik ya da grup spesifik adsorbanlar (immunosorbanlar) elde edilmesine olanak sağlamakta ve dayanıklı olmayan biyolojik örneklerde başarılı sonuçlar alınmaktadır. Aynı zamanda bu tutucu maddeler sayesinde ekstraksiyon, yoğunlaştırma ve izolasyon tek basamakta gerçekleştirilebilmektedir (Stevenson, 2000; Hennion, 1999; Haginaka, 2005 ve Carson, 2000). İstenen seviyede seçicilik elde etmek için kolonun doldurulmasında molekül baskılanmış polimerler kullanılabilir. Katı faz ekstraktın ya da önderiştiricisinin seçiciliği immobilize edilen organik bileşiğin yapısına, birleşen donör atomların doğasına (O, N, P ve S), katı fazın yüzeyindeki fonksiyonel grupların pozisyonuna ve arzu edilen metal iyonu alındıktan sonra oluşan kompleksin sterik koşuluna bağlıdır.

Belli başlı ayırma mekanizmaları olarak normal faz, ters faz, iyon değişim (katyonik ve anyonik değişim) ve moleküler eleme (size exclusion) sayılabilir (Macherey-Nagel, 2004). Normal faz; polar bileşiklerin polar olmayan matrikslerden ayrılması işlemidir. Şartlandırma aşaması polar olmayan çözücüler, toplama aşaması ise daha polar çözücüler yardımıyla gerçekleştirilir. Bu yöntemde en fazla kullanılan tutucu madde silikadır. Ters faz, tutucu madde polaritesinin örnek çözeltisinden daha düşük olduğu sistemdir. Oktadesil (C_{18}) bu teknik için en fazla kullanılan maddedir. İyon değişim, özellikle asit ve bazların matriksten elde edilmesi amacıyla kullanılan ve iki molekül arasındaki iyonların karşılıklı değişimi esasına dayanan bir tekniktir. Moleküler eleme tekniğinde ise dekstran jel gibi maddeler, içerdikleri gözenekler (porlar) sayesinde örnek çözeltisi içerisindeki maddelerin molekül büyüklüklerine göre ayrılmasını sağlar.

Katı faz ekstraksiyonunun ilk çalışmaları su örneklerinden eser elementlerin zenginleştirilmesi amacıyla uygulanmıştır. Ticari şelat reçinelerine daha seçici bir alternatif olarak daha geniş şekilde gelişen ters-faz reaktifleri 1970'li yılların ortalarında sık bir şekilde çalışılmaya başlamıştır (Goodwin, 1997).

1.3. Moleküler Baskılı Polimerler (MIP)

1.3.1. Moleküler baskılama yöntemi

Moleküler etkileşim ilk kez 1894’de Fischer’in enzim-substrat etkileşimini ortaya koyduğu ünlü “anahtar-kilit” modeli ile ortaya çıkmıştır.

Moleküler baskılama yöntemi, hedef moleküle yönelik yüksek seçici bölgelerin varlığı nedeniyle birçok avantaja sahip gelişmekte olan bir alandır (Ramström, 2001). Moleküler baskılamada, hedef molekül çevresi ile etkileşen bir kalıp olarak davranır. Kalıp molekül, çapraz bağlayıcı ile bağlanmadan önce fonksiyonel monomerlerle etkileşime girmektedir. Daha sonra çapraz bağlı monomerler hedef molekül çevresinde düzenlenir ve kalıp benzeri bir tabaka oluşturmak üzere birlikte polimerleşirler. Kalıp molekül katı polimerden uzaklaştırıldığında ise hedef moleküle uygun olan spesifik bağlanma bölgeleri oluşur (Lok ve Son, 2009). Afinite ve seçicilik bakımından doğal reseptörlere benzeyen moleküler baskılanmış polimerler kolay hazırlanabilme ve adaptasyon, birçok solvent ve koşullarda stabil olma gibi özelliklere sahiptirler. Son zamanlarda moleküler baskılanmış nanomateriyallerin geliştirilmesinde alternatif yaklaşımlar geliştirilmiştir. Nano düzeyde moleküler baskılamada birim hacimdeki alan daha yüksek olduğu için kalıp molekül tamamen ayrılabilir, baskılanmış bölgeler daha kolay ulaşılabilir ve kütle transferinde daha düşük bir dirençle karşılaşılır (Xie ve ark. 2008). Dolayısıyla moleküler baskılamadaki nanoteknikler geleneksel baskılama yöntemlerinde karşılaşılan sorunlara çözüm olabilirler (Xie ve ark. 2006).

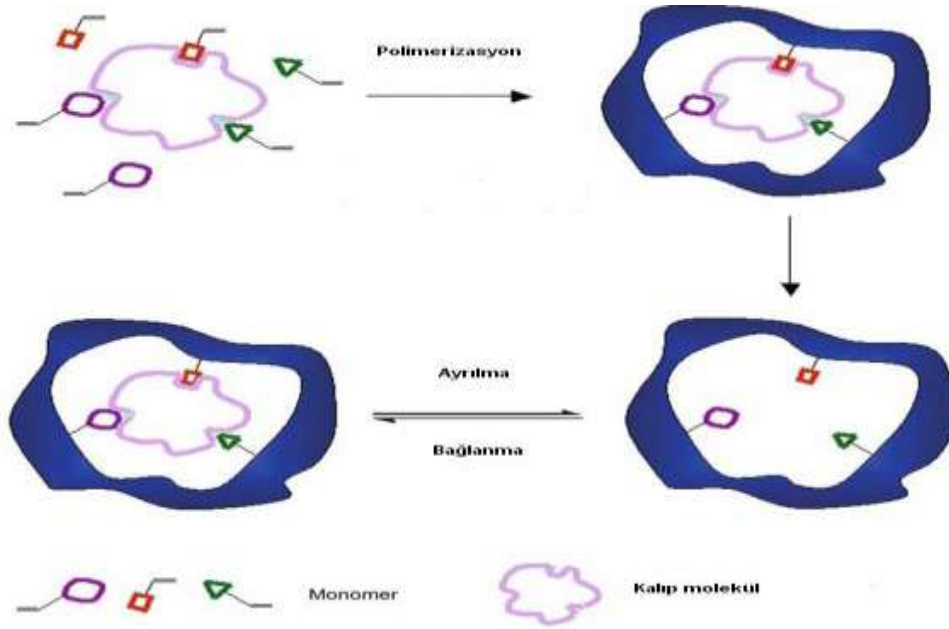
Moleküler baskılı polimerler hazırlanmaları, depolanmaları, yeniden kullanmaları ve zorlu ortam koşulları açısından doğal antikorlardan çok daha fazla avantaja sahiptir. (Haupt ve Mosbach, 2000).

Moleküler baskılama işlemleri üç basamaktan oluşmaktadır (Şekil 1.5).

Ön kompleks oluşumu : Fonksiyonel monomerler ve kalıp molekül arasında bir bağlanma gerçekleştirilir.

Polimerizasyon : Çapraz bağlayıcı ajanlarla oluşturulan fonksiyonel monomer-kalıp kompleksi polimerleştirilir.

Kalıp molekülün polimerden uzaklaştırılması : Uygun bir yıkama ajanı ile kalıp molekülün polimerden uzaklaştırılması sağlanır.



Şekil 1.5. Moleküler baskılama yönteminin şematik gösterimi

1.3.2. Moleküler baskılamada bağlanma

Hedef molekül ve monomer arasındaki etkileşimin türüne göre moleküler baskılama kovalent ve kovalent olmayan baskılama olmak üzere iki ana gruba ayrılır (Şekil 1.6).

Kovalent baskılama Wulff ve ark. (1977) tarafından geliştirilen ön-organizasyon yöntemidir. Bu yöntemde kalıp molekül ve fonksiyonel monomerler birbirlerine kovalent bağlanma ile bağlanırlar ve polimerizasyon boyunca bu kompleks yapı kararlılığını korur. Polimerizasyon işlemi bittikten sonra kovalent bağlar kırılır ve kalıp oluşturmak üzere polimerden uzaklaştırılır.

Kovalent yaklaşımda baskılama işleminden önce kararlı kalıp-monomer kompleksi oluşturulduğu için bağlanma bölgelerinin homojen dağılımı sağlanır polimerizasyon koşulları da (yüksek sıcaklık, yüksek veya düşük pH ve polar

solventler gibi) istenildiği gibi uygulanabilir (Ikegami ve ark. 2004). Ancak dezavantajlarının çokluğu nedeniyle kovalent yaklaşımın kullanımı daha sınırlıdır. Kovalent yaklaşımda polimer ağ örgüsü içindeki monomer-kalıp molekül arasındaki kovalent bağları kırıp kalıbın polimerden uzaklaştırılması işlemi oldukça zordur (Kriz ve ark. 1997 ve Sellergren, 1988). Ayrıca hedef molekülün polimere tersinir olarak bağlanma sayısı sınırlıdır. Kovalent bağ oluşumu nedeniyle bağlanma kinetiği yavaş gerçekleşir ve kromatografik ayırmalarda polimer sabit fazı ve analit arasında hızlı bir etkileşim gerçekleştiğinden zayıf kromatografik sonuçlar elde edilir (Steinke ve ark. 1995 ve Caro ve ark. 2002).

Kovalent olmayan baskılama ise Mosbach ve ark. (1981) tarafından geliştirilmiştir. Kovalent bağlanma yerine kalıp molekül ile fonksiyonel monomerler arasında hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler, van der Waals etkileşimleri ve iyonik gruplar arasında gerçekleşen coulomb etkileşimleri gibi etkileşimler gerçekleşir (Vlatakis ve ark. 1993).

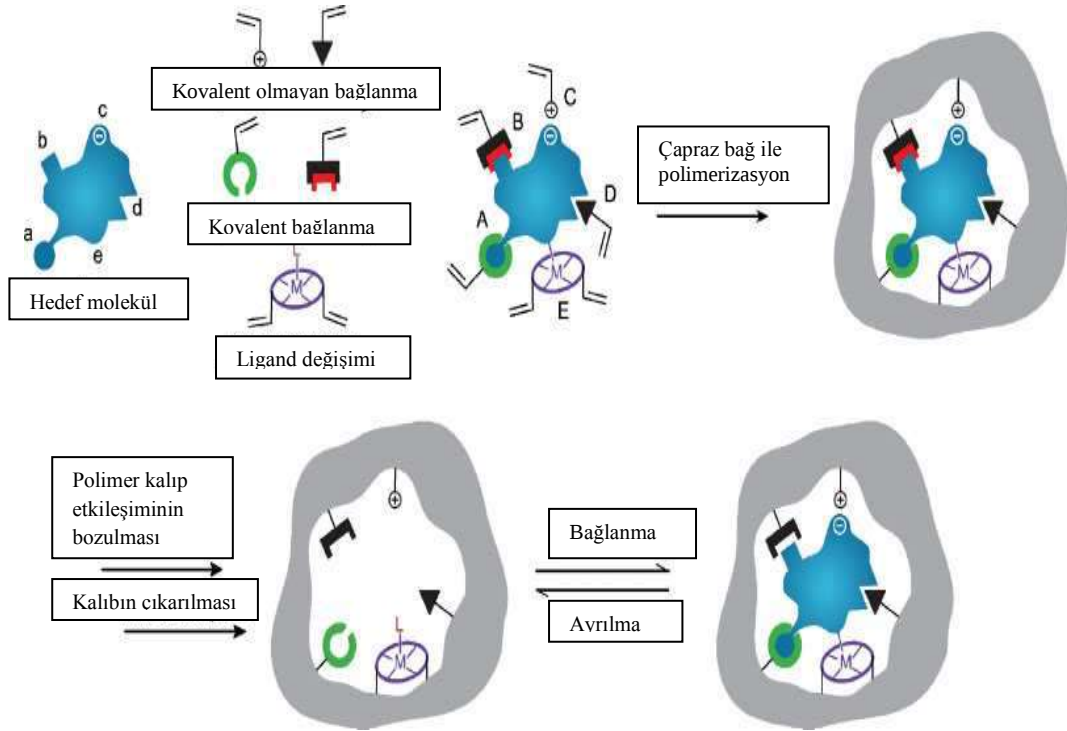
Kovalent olmayan bağlanmada, kovalent monomer-kalıp kompleksinin sentezine gerek yoktur, farklı bağlanma etkileşimleri kullanılabilir. Kovalent olmayan etkileşimler daha zayıf olduğundan polimerizasyondan sonra kalıp molekül polimerden kolayca uzaklaştırılır. Bunun yanında hedef molekülün bağlanma kinetiği hızlıdır (Sellergen ve ark. 1988). Kovalent olmayan baskılamada, kalıp molekül ve fonksiyonel monomerler arasındaki etkileşimler spesifik değildir ve baskılanmış polimerler kalıp molekülün yapısı ve reaktivitesi hakkında spesifik bilgi gerektirmeksizin hazırlanabilir. Kovalent olmayan etkileşimin bazı dezavantajlarında polimerizasyon koşullarının, kovalent olmayan etkileşimleri arttırmak amacıyla, sınırlı olması, fonksiyonel monomerlerin bağ oluşum dengesini arttırmak amacıyla fazlaca kullanılması ve spesifik olmayan bağlanma bölgelerinin oluşumuna neden olmasıdır (Katz ve ark. 1999 ve Dong ve ark. 2002).

Moleküler etkileşimlerin farklı olmaları seçiciliği ve tersinirliği etkiler (kovalent bağlarla oluşturulan etkileşimler oldukça spesifikdir ancak geri bağlanma kinetiği yavaştır, bununla beraber, hidrofobik etkileşimlerin kinetiği daha hızlıdır fakat seçiciliğinde azalma gösterir). Genel olarak kovalent olmayan etkileşimler, birçok bileşiğe uygulanabilirler, hızlı kinetiğe sahiptirler, uygun

koşullarda bağ oluşumu sağlarlar ve kırılma özellikleri göstererek daha geniş uygulama alanlarına sahiptirler. Hidrojen bağları, π - π etkileşimleri ve metal-koordinasyon etkileşimleri gibi bazı kovalent olmayan etkileşimler yeni moleküler baskılanmış fonksiyonel polimerlerin tasarımı için gelecekte önemli bir yere sahip olacak gibi görülüyor.

Metal iyonları ve biyolojik ligandlar arasındaki etkileşimler oldukça spesifiktir. Özellikle geçiş metalleri elektronca zengin gruplarla oldukça kararlı kompleksler oluşturabilirler. Ayrıca iyon-dipol etkileşimleri ile O, S ve N içeren moleküller kompleksleşebilirler. Metal koordinasyon etkileşimi çözücü ortamından etkilenmez (elektrostatik ve hidrojen bağlanma etkileşimleri sulu ortamda zayıftır) çünkü, diğer kovalent olmayan etkileşimlerin tersine, metal merkezleri ile substrat arasında kararlı bir etkileşim oluşur. Ortama fazla monomer eklenmesi gereksizdir, böylece spesifik olmayan bağlanma bölgelerinin oluşumu minimuma iner. Bağlanma kinetikleri kovalent baskılamaya göre daha hızlıdır. Metal-şelat etkileşimine dayalı moleküler baskılamanın sahip olduğu esneklik, seçicilik ve dayanıklılık kolaylıkla bozulabilen biyolojik merkezli substratların tanınması için vazgeçilmez bir bağlanma mekanizması yaratmıştır.

Bu çalışmada kovalent ve kovalent olmayan baskılamalara üstünlüğü göz önüne alınarak (MAAP)₂Fe(III) metal şelat monomeri tercih edilerek kalıp molekül ile koordinasyon etkileşimine dayalı moleküler baskılama gerçekleştirilmiştir.



Şekil 1.6. Moleküler baskılamada kalıp ile hedef molekül arasındaki bağlanmaların şematik gösterimi

1.3.3. MIP hazırlama teknikleri

Moleküler baskılanmış polimer hazırlamak için kullanılan yöntemlere aşağıdaki örnekler verilebilir.

- ❖ Yığın polimerizasyonu
- ❖ Süspansiyon polimerizasyonu
- ❖ Şişme polimerizasyonu
- ❖ Dağılma(saçılma) polimerizasyonu
- ❖ Çökelek polimerizasyonu
- ❖ Kılcal elektrokromatografi
- ❖ Kimyasal aşılama

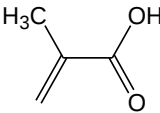
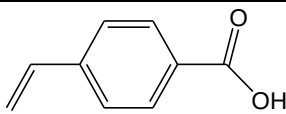
Moleküler baskılamada genel olarak yığın polimerizasyonu kullanılır. Elde edilen katı polimer parçalanır ve uygun boyutlara öğütülür. Ancak bu proses zaman alıcı ve ekstra bir işlemdir (Wulff, 2002).

1.3.4. Moleküler baskılama sentezinde kullanılan kimyasallar

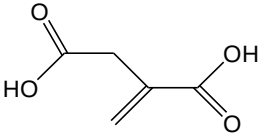
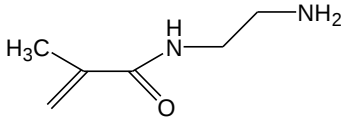
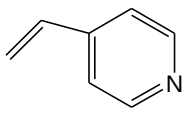
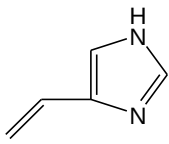
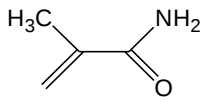
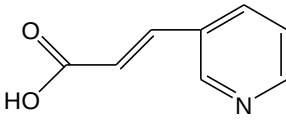
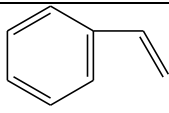
Moleküler baskılama teknolojisi ayırma, kataliz çalışmaları, biyosensör teknolojisi ve yapay antibadi üretim alanlarında çalışma imkanı sunmaktadır (Piletsky ve ark. 2001). Moleküler baskılamada kullanılan baskılanacak molekül, fonksiyonel monomer, çapraz bağlayıcı, çözücü ve başlatıcı etkili bir baskılama elde etmek için birbiri ile uyumlu olmalıdır.

Moleküler baskılı polimerlerde kalıp molekül ile fonksiyonel monomerin etkileşmesi için uygun bağlanma bölgelerinin sayısı önemlidir. Bu yüzden fonksiyonel monomer seçimi kritiktir. MIP'lerin sentezinde en çok kullanılan fonksiyonel monomerler aşağıda verilmiştir; Asidik: Metakrilik asit (MAA), p-vinilbenzoik asit, akrilik asit (AA), 2-(triflorometil)- akrilik asit (TFMAA), akriloamido-(2-metil)-propan sülfonik asit (AMPSA), Bazik: 4-vinil pridin(4-VP), 2-vinil pridin (2-VP), 4-(5)-vinilimidazol, 1-vinil imidazol, allilamin, N,N'-dietil aminoetil metakrilamit (DEAEM), Nötral: Akrilamit, metakrilamit, 2-hidroksi metakrilat (HEMA), akrilonitril (AN), metilmetakrilat (MMA), stiren, etilstiren (Cormack ve Elorza, 2004). Çizelge 1.5'de bazı fonksiyonel monomerler verilmiştir.

Çizelge 1.5. Moleküler baskılamada kullanılan bazı fonksiyonel monomerler

Fonksiyonel Monomer	Monomerin Açık Molekül Yapısı
Metakrilik Asit (MAA)	
p-vinilbenzoik Asit	

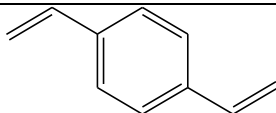
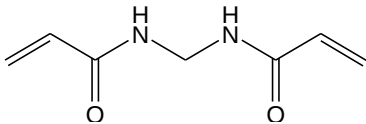
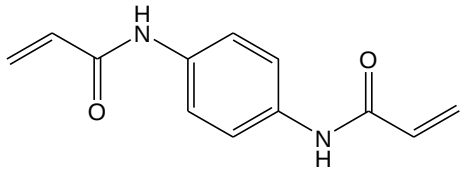
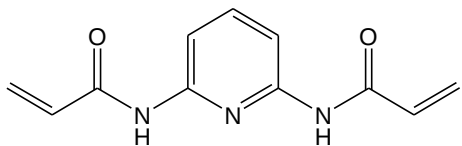
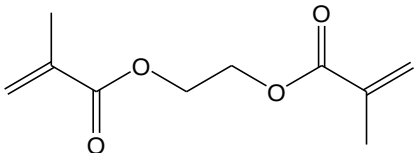
Çizelge 1.5. (Devam) Moleküler baskılamada kullanılan bazı fonksiyonel monomerler

İtakonik Asit	
N-(2-aminetil)-metakrilamid	
4-vinilpiridin (4-VP)	
4-(5)-vinilimidazol	
Metakrilamid	
Trans-3-(3-piridil)-akrilik Asit	
Stiren	

Çapraz bağlayıcıların baskılamadaki önemi kalıp molekül çevresinde sabit bir yapı oluşturmak ve kararlılık sağlamaktır (Idiziak ve ark. 2001). Yüksek çapraz bağlanma oranı ile kalıcı gözenekli yapı elde edilir. Böylece baskılanmış polimerlerin çözücü eklendiğinde çözünmeleri engellenmiş olur hem de kullanımı kolaylaşır. Bunun yanı sıra yüksek çapraz bağlanma ve etkin bir baskılama için çapraz bağlayıcılarla fonksiyonel monomerlerin uyumlu olması önemlidir (Büyüktiryaki, 2005 ve Cormack ve Elorza, 2004). Çünkü fonksiyonel monomerden veya çarpaz bağlayıcıdan biri polimerizasyon sırasında baskın çıkar ve kopolimerizasyon gerçekleşmez. Moleküler baskılama için uygun birkaç çapraz bağlayıcı baskılanacak molekül ile fonksiyonel monomer gibi davranarak

kendiliğinden kompleksleşebilir. Farklı çapraz bağlayıcı ajanlar kullanılarak konuk bağlanma bölgelerinin yapılarını ve bunların etrafındaki çevreyi kontrol edebiliriz. Organik çözücülerde moleküler baskılama için etilen glikol dimetakrilat (EDMA) ve divinil benzen yaygın olarak kullanılır. Suda çözünür çapraz bağlayıcı ajanı ise N, N'-metilenbisakrilamid (MDAA)'dır. Pdivinil benzen(DVB), EDMA, tetrametilen dimetakrilat (TDMA), trimetilpropan trimetakrilat (TRIM), MDAA, N, N'-hekzametilen bisakrilamid, 1,3-diisopropenil benzen (DIP) yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcılardır. Çizelge 1.6'da bazı önemli çapraz bağlayıcılar verilmiştir.

Çizelge 1.6. Moleküler baskılamada kullanılan bazı çapraz bağlayıcılar

Çapraz Bağlayıcılar	Çapraz Bağlayıcıların Açık Molekül Yapısı
4-divinilbenzen	
N,N'-metilen-bisakrilamid	
N,N'-fenilen-bisakrilamid	
2,6-bisakrilamidopiridin	
Etilen glikol dimetakrilat	

MIP'ler genelde çözücü bazlı ortamlarda hazırlanıp ve kullanıldıkları için çözücü seçimi önemlidir. Çözücü, polimerizasyonda baskılanacak molekül, fonksiyonel monomer, çapraz bağlayıcı, başlatıcı gibi tüm bileşenlerin tek fazda bulunmasını, gözenekli polimerde ise gözeneklerin oluşmasını sağlar. Ayrıca çözücüler hedef molekülün bağlanma hızını arttırmasını da sağlamaktadır. Bağlanan hedef molekülün polimerden salınmasını da yapının gözenekliliği sağlamaktadır. Polimerizasyon sırasında reaksiyon sıcaklığı bölgesel olarak artar ve istenmeyen yan ürünlerin oluşumuna neden olmaktadır. Çözücülerin bir diğer rolü de polimerizasyon sırasında reaksiyon ısını eşit olarak yaymaktır. Genellikle sentez için polar olmayan organik çözücülerin kullanıldığı MIP'ler daha iyi seçiciliğe sahiptir (Yu ve Mosbach, 1997). Ayrıca kovalent olmayan baskılama polimerizasyonunda baskılanacak molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki kompleks oluşumunu arttırır. Polimerizasyonda çözücü molekülleri polimerlerin içine dahil edilir ve son işlemle uzaklaştırılır. Bu süre zarfında moleküller arası boşluklar çözücü molekülleri tarafından polimerde gözenek olarak tutulur (Cormack ve Elorza, 2004). Çözücü bakımından az olarak hazırlanan polimer çok sert ve yoğun olur ve güçlükle baskılanacak molekülü bağlar. Hazırlanan polimerlerin analite seçiciliği için oluşan boşluğun analite uygun boyutta olması seçilen çözücünün özelliğine bağlıdır. Ayrıca MIP'ler farklı çözücülerde farklı şişme özellikleri gösterirler. Şişme fonksiyonel grupların üç boyutlu yapısını değiştirdiği için bu MIP'lerin seçiciliğinin değişmesine sebep olur. MIP'lerde seçicilik katsayısında bir azalma meydana gelir (Perrin ve Armarego, 1996).

Farklı reaksiyonlar için farklı başlatıcılar tercih edilebilir. Taşınması gereken en önemli özellik aktif olma özelliğidir. Yaygın olarak kullanılan başlıca başlatıcılara örnek olarak benzoilperoksit (BPO) ve azobisisobutironitril (AIBN) verilebilir (Ikegam ve ark. 2004) (Çizelge 1.7).

Çizelge 1.7. Moleküler baskılamada kullanılan bazı kimyasal başlatıcılar

Kimyasal Başlatıcı	Kimyasal Başlatıcının Açık Molekül Yapısı
4,4'-azo (4-siyanovaleirik asit)	
Benzil dimetil asetal	
Benzoil peroksit (BPO)	
Azobisdimetilvaleronitril (ABDV)	
Azobisbutironitril (AIBN)	

Literatürde MIP'lerin sayısız uygulama alanı olduğunu ortaya konmuştur. Lavignac ve arkadaşlarının 2004 yılında yaptığı çalışmada adsorban deneylerinde antikorlara alternatifler olarak MIP kullanılmıştır, Haupt ve Mosbach, 2000 yılında MIP'leri biyobenzetim sensörleri olarak kullanmışlardır, organik bileşiklerin seçici katı faz ekstraksiyonu için yeni moleküler tanıma malzemesi olarak MIP'ler Esteban tarafından 2001 yılında kullanılmıştır ve Xu ve arkadaşları

ise 2004 yılında biyolojik kökenli bileşiklerin ayrılması ve tanınmasında MIP'leri kullanmıştır.

1.4. Moleküler Baskılı Katı Faz Ekstraksiyonu (MISPE) Yöntemi

Moleküler baskılanmış polimerlerin, katı faz ekstraksiyonunda kullanımı ilk kez 1994'de Sellegren ve grubu tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu grup çalışmalarında, idrar örneğinden pentanamitin ekstraksiyonunu seçici bir şekilde ayıran moleküler baskılanmış polimerler hazırlamışlardır. Daha sonra bir çok grup çeşitli matriks ortamından farklı analitleri ayırmak için MIP hazırlayarak katı-faz ekstraksiyonunda kullanmışlardır. MIP'in SPE'de kullanılma dezavantajlarından biri baskılanan analit molekülünün zor uzaklaştırılmasıdır. Yıkama ve elüsyon basamakları seçiciliğin optimizasyonu için en önemli adımdır (Masque ve ark. 2002 ve Sellergren, 1999).

MISPE yöntemi özellikle yüksek seçicilik, kararlılık, tekrar kullanılabilirlik, kolaylık, hazırlanma maliyetinin düşük oluşu nedeniyle tercih edilmektedir. Farklı gerçek örneklerden (çevre, biyolojik, gıda, ilaç ve diğer gerçek örnekleri gibi); çözücü yardımıyla analitlerin ayrılmasında, istenmeyen bileşiklerin temizlenmeside, seçicilik arttırıcı zenginleştirme yönteminde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. On-line MISPE diğer cihazlarla birleştiğinde, gerçek örneklerin karmaşık matrislerinden bileşikleri hızlı analiz etmeleri ile dikkat çekmektedir.

MISPE yönteminin dezavantajları arasında SPE için kullanılan MIP'leri kovalent olmayan baskılama tekniği ile hazırlanmasında düşük örnek kapasitesi ve spesifik olmayan bağlanmalar nedeniyle spesifik bağlanma bölgelerinin veriminin düşmesidir. Ayrıca karmaşık örneklerde MIP'in adsorblanması sırasında eser miktarda bileşiğin etkilenmesi ile istenmeyen sızıntılar kalıba girebilmektedir.

1.5. Konuyla İlgili Yapılmış Olan Çalışmalar

Zeytin ağacı yapraklarının değerlendirilerek ham ekstresinin bitkisel ilaç olarak kullanımı son zamanlarda önem kazanmaya başlamıştır. Çeşitli firmalar

tarafından piyasaya sürülen zeytin yaprağı çayları veya ekstrelerini bulmak mümkündür. Bu ekstralar oleuropeinin yanı sıra rutin, verbaskosit, luteolin, apijenin-7-glukosit, ligstrosit gibi polifenoller ve şeker, protein ve metal gibi diğer bileşenleri de içermektedir. Zeytin yaprağından ham ekstrenin elde edilebilmesi için zeytin yaprakları iyice kıyıldıktan sonra çeşitli ekstraksiyon metotları uygulanmaktadır. Jap'on-Luj'an ve Luque de Castro (2006c), süperısıtılmış sıvı ekstraksiyonu ile etanol-su karışımı kullanarak 23.000 mg / kg 'a kadar oleuropeini 13 dk'da çıkartmışlardır. Jap'on-Luj'an ve ark. (2006a), dinamik ultrasound yardımlı ekstraksiyonla en uygun çalışma koşulları altında, etanol-su karışımı kullanılarak, hedef analitlerin tam ekstraksiyonunu yani, oleuropein verbacoside, apigenin-7-glucoside ve luteolin-7-glucoside sırayla 11.04, 2.68, 1.49 ve 3.91 mg / kg olarak 25 dk'da sağlamışlardır. Le Floch ve ark (1998), çalışmalarında süperkritik akışkan ekstraksiyonu ile metanol kullanarak % 45 verim elde etmişlerdir. Japón-Luján ve ark. (2006b), yaptıkları çalışmada mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemini kullanarak etanol-su karışımı ile 8 dk'da ekstraksiyonu tamamlamışlardır. Bu yöntemlerde genellikle metanol, etanol ya da hekzan gibi organik çözücüler kullanılmaktadır. Bugüne kadar zeytin yaprakları ile ilgili çalışmalar genelde ham ekstreyle sınırlı kalmıştır (Altıok ve ark. 2008).

Ham ekstreten tıbbi değeri yüksek olan bileşenlerinin ayrı ayrı saf bir şekilde eldesi ise preparatif ince tabaka kromatografisi (Walter ve ark. 1973 ve Fleming ve ark. 1969) ile ya da adsorpsiyon kromatografisi teknikleri ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla kollojen, selüloz ve ipek fibroini gibi birçok biyopolimer adsorbent olarak kullanılmıştır.

Altıok ve ark. (2008), zeytin yaprağı ekstresindeki toplam fenol içeriği ve antioksidan aktivitesi üzerine yaptıkları araştırmada ipek fibroin, zeytin yaprağı ekstresinden polifenoller ayırmak için adsorban olarak kullanılmıştır. Rutin ve oleuropein adsorbe miktarları 15 mg rutin / g ipek fibroin ve 96 mg oleuropein / g ipek fibroin olarak bulmuşlardır. Çözücü olarak etanol kullanılan bu çalışmada, zeytin yaprağı ekstresinden % 13,44 oleuropein ve 0,183% rutin elde etmişlerdir.

Oleuropein saflaştırılmasında zeytin yaprağı ekstresi dışında Mulinacci ve ark. (2001), zeytinyağı ekstraksiyonu sonrasındaki atık sularda polifenol analizi yapmışlardır. Bu maddelerin tanımlanmasında ve miktarlarının saptanmasında HPLC-DAD ve HPLC-MS metodları kullanılmıştır. Margari ve Okogeri (2001), yaptıkları çalışmada sızma zeytinyağında fenoller ve tocopherolü HPLC yöntemi ile analiz etmişlerdir. Zeytin meyvesinden, yağından ve zeytin işlenmesi sırasında çıkan atık sulardan oleuropeinin saflaştırılmasına yönelikte birçok çalışma bulunmaktadır. Ryan ve ark (1999a), çalışmalarında iki farklı zeytin örneğinin fenolik madde içeriğini kalitatif ve kantitatif olarak belirlemişler. Fenolik madde analizleri HPLC yöntemi ile UV, floresans ve MS dedektörleri kullanılarak yapılmıştır. Ryan ve ark (1999b), yaptıkları çalışmada freeze-dryer da kurutulmuş zeytin örneğini katı-faz ekstraksiyon yöntemi ile ekstrakte etmişler. Ekstrakt bileşenleri UV ve floresans dedektörleri kullanılarak ters-faz sıvı kromatografisi ile ve elektrosprey iyonlaşma kütle spektrometresi kullanılarak tanımlanmıştır. Oleuropeinin zeytindeki temel bileşen olduğunu ve konsantrasyonunun meyve gelişimi sırasında önemli bir şekilde değiştiğini gözlemişler.

Yapılan literatür incelemesinde herhangi bir MISPE yöntemi ile zeytin yaprağından saf oleuropein eldesine yönelik bir çalışmanın bulunmadığı belirlenmiştir.

2. MATERİYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan kimyasallar

Azobisisobutironitril (AIBN) ve etilenglikoldimetakrilat (EDMA) Fluka AG (Buchs, Switzerland) firmasından alınmıştır ve etilenglikoldimetakrilat hidrokinonin inhibitörü ile vakum altında distile edilerek kullanılmadan önce 4°C’da saklanmıştır. Rutin hydrate, metanol, polivinil alkol (PVA, MA:10.000) Aldrich (Milwaukee, WI, USA) firmasından temin edilmiştir. Oleuropein Extrasynthese (GENAY France) firmasından alınmıştır. Diğer bütün kimyasallar analitik saflıkta olup, Merck AG (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir. Deneylerde kullanılan Fe(III) 1000 mg/L stok çözeltisi, demir (III) klorür kullanılarak hazırlanmıştır. Demir (III) klorür ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Merck, Darmstadt, Germany) firmasında alınmış olup, standart demir çözeltisi, stok çözeltiden günlük olarak hazırlanmıştır.

Deneylerde kullanılan su; yüksek akışlı selüloz membranlı Barnstead (Dubuque, IA) Ropure LP[®] ters ozmoz ünitesinde işleme tabi tutulduktan sonra Barnstead D3804 NANOpure[®] organik/kolloidal uzaklaştırma ve dolgulu iyon değişim sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen saf suyun iletkenliği 18 megaohm/cm’dir.

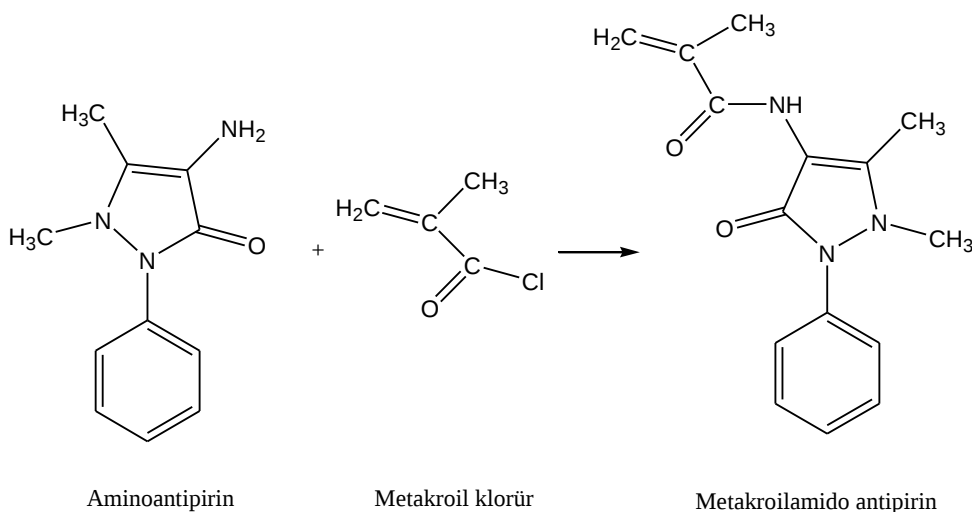
2.1.2. Kullanılan cihazlar

Adsorpsiyon kapasitesi verileri Shimadzu UV 1601 UV-Görünür Bölge Taramalı Spektrofotometresi ile elde edilmiştir. FTIR spektrumları Perkin Elmer Spectrum 100 FT-IR Spectrometer cihazı ile alınmıştır. pH ölçümleri WTW Series InoLab pH730 model pH metre ile yapılmıştır. Taramalı elektron mikroskopisi için Oxford Instruments-7430 Field Emission Gun Scanning Electron Microscope (FEG-SEM) cihazı kullanılmıştır. Polimerlerin BET analizleri için NOVA 2200e Surface Area Pore Size Analyzer kullanılmıştır. Ham ekstredeki oleuropein miktarının analizi için Agilent 1100 Series HPLC kullanılmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Metakroilamido antipirin (MAAP) monomerinin sentezi

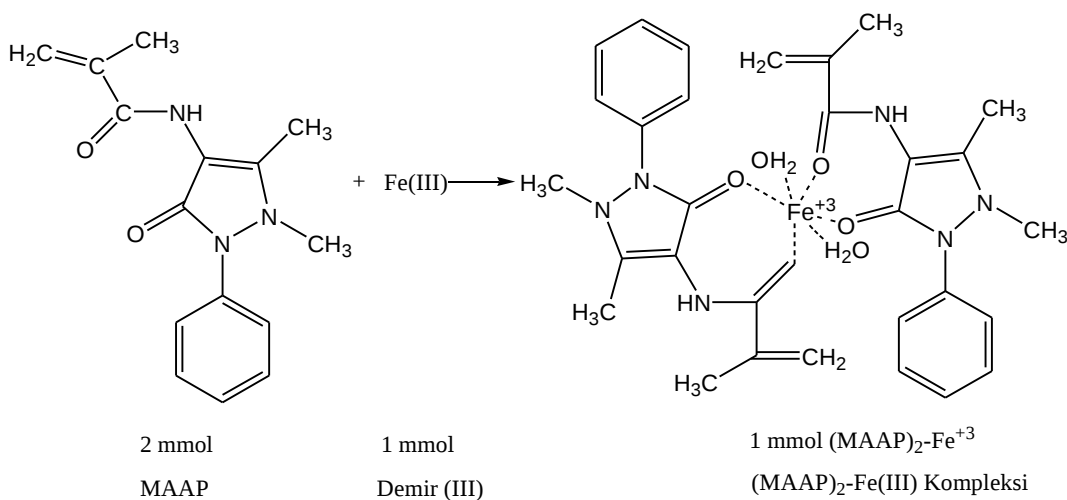
MAAP monomerinin sentezi için uygulanan yöntemde; 0.5 g (2.463 mmol) antipirin ve 0.2 mL (2.46 mmol) piridin, kuru kloroform (100 mL) çözücüsü içerisinde çözülmüştür. Çözelti 0 °C'a soğutulmuş ve 0.26 mL (2.46 mmol) metakroilklorür yavaşça çözeltiye ilave edilmiştir. Bu çözelti azot atmosferi altında manyetik karıştırıcı ile oda sıcaklığında 2 saat karıştırılmıştır. Kimyasal reaksiyon sonunda, çözelti 50 mL seyreltik HCl ve sonra 50 mL seyreltik NaOH ile yıkanmıştır. Daha sonra organik faz döner buharlaştırıcı kullanılarak uzaklaştırılmış ve kalan kısım (MAAP), petrolbenzini ve etil asetat ile kristallendirilerek saflaştırılmıştır. Şekil 2.1'de MAAP monomerinin sentezi verilmiştir. Erime noktası: 132–133 °C, verim: 70 % (Ersöz ve ark. 2004).



Şekil 2.1. Metakroilamido antipirin (MAAP) monomerinin sentez reaksiyonu

2.2.2. Metakroilamido antipirin (MAAP)₂-Fe(III) kompleks monomerinin sentezi

(MAAP)₂-Fe(III) kompleksini sentezlemek için uygulanan yöntemde; 0.562 g (2.0 mmol MAAP) 25 mL etil alkolde çözünmüştür. Bu çözeltiye oda sıcaklığında 0,270 g (FeCl₃.6H₂O) (1 mmol) ilave edilmiştir. Çözelti koyu kırmızıya dönünceye kadar oda sıcaklığında 12 saat süre ile reaksiyona devam edilmiştir. Daha sonra oluşan (MAAP)₂-Fe(III) monomer kompleksi çöktürülüp, süzülmüş % 99'luk etanol (300 mL) çözeltisi ile yıkanmış ve vakum etüvünde 60 °C'de 48 saat kurutulmuştur. Bu sentez reaksiyonu Şekil 2.2'de verilmiştir (Karabörk ve ark. 2008).

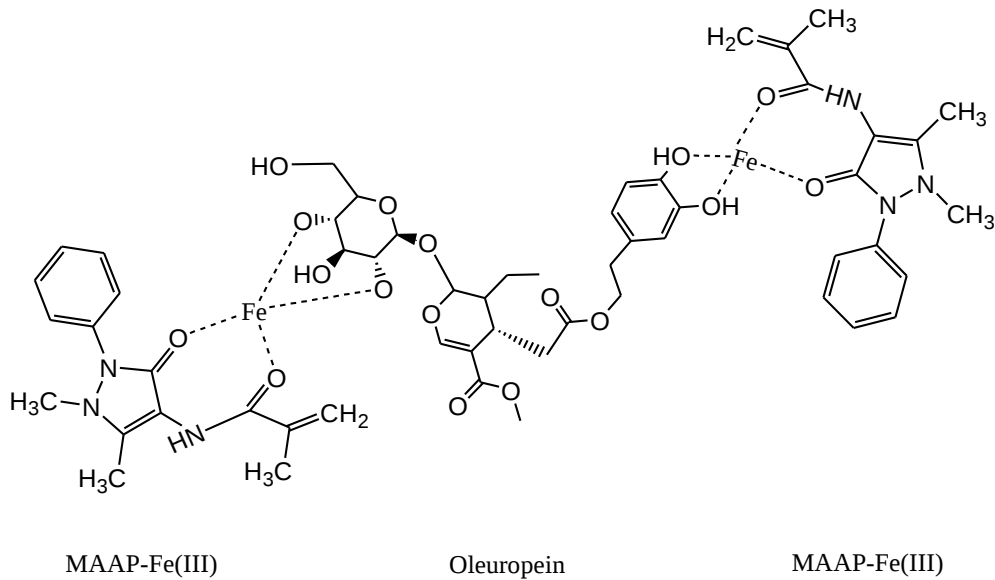


Şekil 2.2. (MAAP)₂-Fe(III) kompleksinin sentez reaksiyonu

2.2.3. Oleuropein baskılanmış polimerlerin hazırlanışı

Hazırlanan monomer, etilenglikoldimetakrilat (EDMA) çapraz bağlayıcısı, çözücü olarak toluen ve başlatıcı olarak azobisbütironitril (AIBN) kullanılarak, PVA(polivinilalkol)-su karışımında süspansiyon polimerizasyonu ile polimerleştirilmiştir. (MAAP)₂-Fe (III) kullanımıyla, MIP bazlı sorbent sentezi için öncelikle (MAAP)₂-Fe(III)-oleuropein ön-organize monomer hazırlanmıştır.

Bu amaçla 0,05 mmol oleuropein, 0,1 mmol MAAP-Fe(III) ile 4 ml metanol içinde çözülüp 1 saat karıştırılmıştır. 0,2 g PVA, 70 ml suda çözülerek dispersiyon ortamı hazırlanmıştır. Sonra MAAP-Fe(III)-oleuropein monomer kompleks çözeltisi 8 mL EDMA/12 mL toluen- karışımı üzerine ilave edilmiş ve 0,06 g AIBN bu monomer karışımı içinde çözülmüştür. Bu çözelti daha sonra süspansiyon ortamına alınıp, termostatik su banyosunda manyetik karıştırıcı ile 600 rpm sabit hızla azot atmosferinde karıştırılmıştır. Polimerizasyon, reaktör sıcaklığının 70°C’de 5 saat tutulmasıyla gerçekleştirilmiştir. Polimerizasyonun ardından oleuropein baskılı polimerler polimerizasyon ortamından süzülerek ayrılmıştır. Elde edilen polimerler kalıp molekülün uzaklaştırılması için metanolik KOH ile birgün karıştırılmıştır ve ardından %50-50 (v/v) H₃PO₄-H₂O ile yine birgün boyunca muamele edilmiştir. Daha sonra polimerler etanol ve su ile yıkanmış ve 70°C’de 48 saat vakum altında kurutulmuştur. Şematik gösterim Şekil 2.3’de verilmiştir.



Şekil 2.3. Oleuropein baskılı polimer oluşumunun şematik gösterimi

2.2.4. Adsorpsiyon çalışmaları

Hazırlanan oleuropein baskılı katı faz sorbentin oleuropein adsorpsiyon ve desorpsiyon işlemleri kesikli sistemde gerçekleştirilmiştir. Yapılan tüm adsorpsiyon işlemlerinde adsorplanan madde miktarları aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

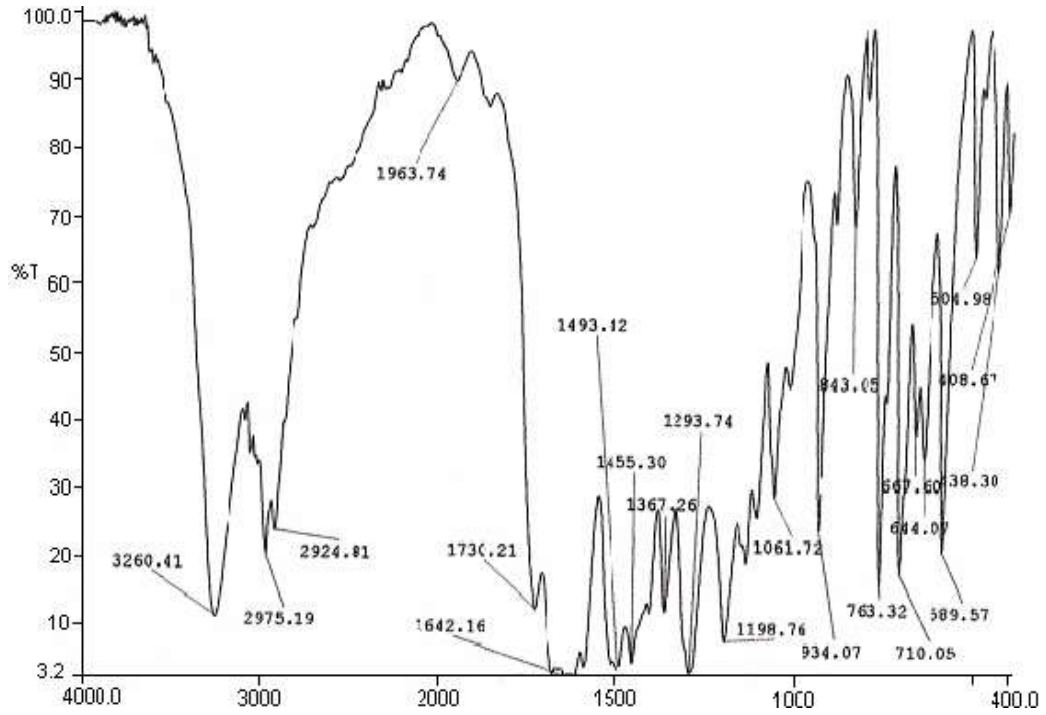
$$Q = [(C_0 - C) V] / m \quad (3.2)$$

Burada, Q polimerlerin birim miktarı başına adsorplanan madde miktarıdır (mg g^{-1}); C_0 ve C, oleuropein çözeltilerinin sırasıyla, başlangıç ve adsorpsiyon sonucu süzüntüde kalan derişimleridir (mg L^{-1}); V sulu faz hacmi (L) ve m de kullanılan MIP ağırlığıdır (g). Adsorpsiyon çalışmaları kapsamında polimerin adsorpsiyon kapasitesine pH'ın, başlangıç derişiminin ve zamanın etkileri incelenmiştir.

3.BULGULAR

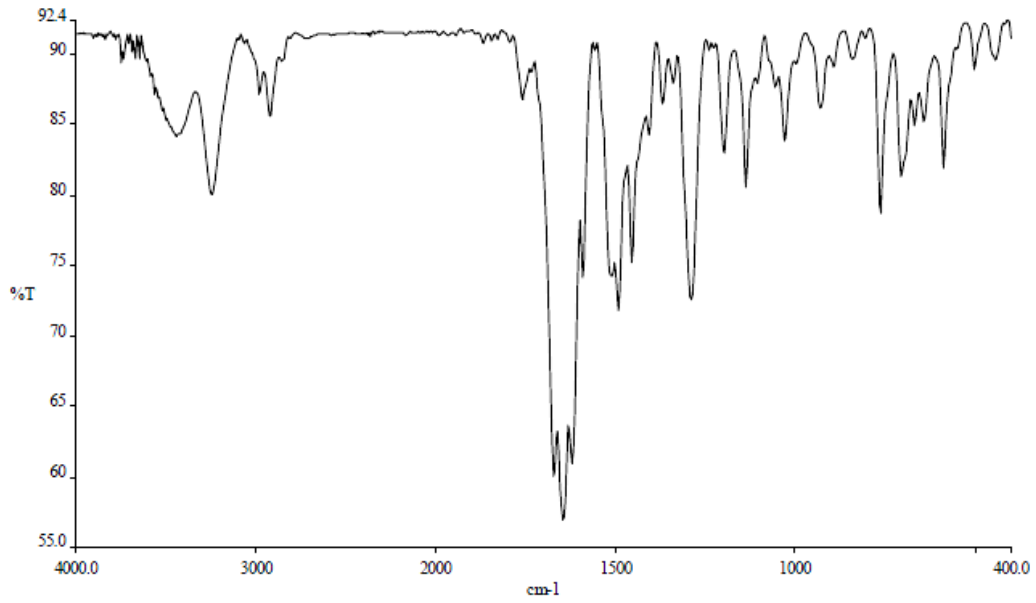
3.1. Polimerik Mikrokürelerin Karakterizasyonu

3.1.1. MAAP ve (MAAP)₂-Fe⁺³ monomerlerinin karakterizasyonu



Şekil 3.1. MAAP monomerinin FTIR spektrumu

MAAP monomerinin karakterizasyonu için kullanılan FTIR spektrumunda; FT-IR (KBr, cm⁻¹): 763–710 cm⁻¹ (monosubstitüe benzen halkası), 1580 ve 1500 cm⁻¹ (aromatik halkadaki konjugasyon, kuvvetli iki veya üç pik), (1600 cm⁻¹ (metakril çift bağı), 1642 cm⁻¹ (amid karbonil piki), 1730 cm⁻¹ (siklik keton pozisyonunda karbonil piki), 2975 ve 2924 cm⁻¹ (C-H piki), 3260 cm⁻¹ (N-H piki). Bu pikler Şekil 3.1’de verilen FTIR spektrumunda da görülmektedir.



Şekil 3.2. Metakroilamido antipirin (MAAP)₂-Fe(III) kompleksinin FTIR spektrumu

Şekil 3.2’de metakroilamido antipirin (MAAP)₂-Fe(III) kompleksinin FTIR spektrumu verilmiştir. Hazırlanan (MAAP)₂-Fe(III) kompleksinin FT-IR (KBr, cm⁻¹) analizlerinin karakteristik pikleri şöyledir: 472 ve 647 cm⁻¹ pikleri Fe-O piki, 768 cm⁻¹ pik monosubstitüye benzen halkası ait olan pik, 1642 cm⁻¹ deki karbonil piki 1617 cm⁻¹’de ortaya çıkmıştır. 1730 cm⁻¹ sıklık keton pozisyonundaki karbonil piki 1672 cm⁻¹’de ortaya çıkmıştır (Ersöz ve ark. 2004). Bu sonuçlar C=O’daki oksijen atomunun metal iyonu ile koordinasyona girdiğini göstermiştir. Sonuç olarak Fe(III) iyonu ile MAAP yapısındaki (C=O)’daki oksijen atomu arasında bir etkileşimin olduğu anlaşılmıştır. FTIR daki önemli değişiklik C=O’daki karbonil piki üzerindeki değişikliktir. 3553 cm⁻¹’deki keskin $\nu(\text{OH})$ piki H₂O molekülü ile Fe(III) iyonunun koordinasyona girdiğini doğrulamıştır (Tangh ve ark. 2003).

3.1.2. Oleuropein baskılanmış polimerlerin karakterizasyonu

3.1.2.1. BET analizi

(MAAP)₂Fe(III)- oleuropein polimerinin kalıp uzaklaştırılmasından önceki ve sonraki toplam yüzey alanları NOVA 2200e Surface Area Pore Size Analyzer kullanılarak ölçülmüştür ve yüzey alanı baskılama öncesi 348 m² g⁻¹ ve baskılama sonrası ise 928,7 m² g⁻¹ olarak bulunmuştur. Görüldüğü gibi kalıp molekül olan oleuropeinin yapıdan uzaklaşmasıyla yüzey alanında bir artış gerçekleşmiştir.

3.1.2.2. Şişme testi

(MAAP)₂Fe(III)-oleuropein polimerinin kalıp uzaklaştırılmasından önceki ve sonraki haldeki su tutma oranları, deiyonize su kullanılarak volumetrik yöntemle belirlenmiştir. Bu işlemde 112 mg kuru baskılama sonrası polimerden ve 64 mg kuru baskılama öncesi polimerden mezürlere koyulup en üst noktaları tüpe işaretlenmiştir. Daha sonra tüpler deiyonize su ile doldurularak polimerlerin oda sıcaklığında şişmesinin ardından polimerlerin yüksekliğinin işaretlenmesi ile belirlenmiştir. Tüpteki şişmiş polimerlerin yüksekliği şişme oranının hesaplanmasında kullanılmıştır. Çizelge 3.1’de polimerin baskılama öncesi ve sonrası kuru ve şişmiş haldeki yükseklikleri verilmiştir.

$$\text{Şişme oranı (\%)} = [(h_{\text{şişmiş}} - h_{\text{kuru}}) / h_{\text{kuru}}] \times 100 \quad (3.1)$$

$h_{\text{şişmiş}}$: şişen polimerlerin yüksekliği, h_{kuru} : kuru polimerlerin yüksekliği

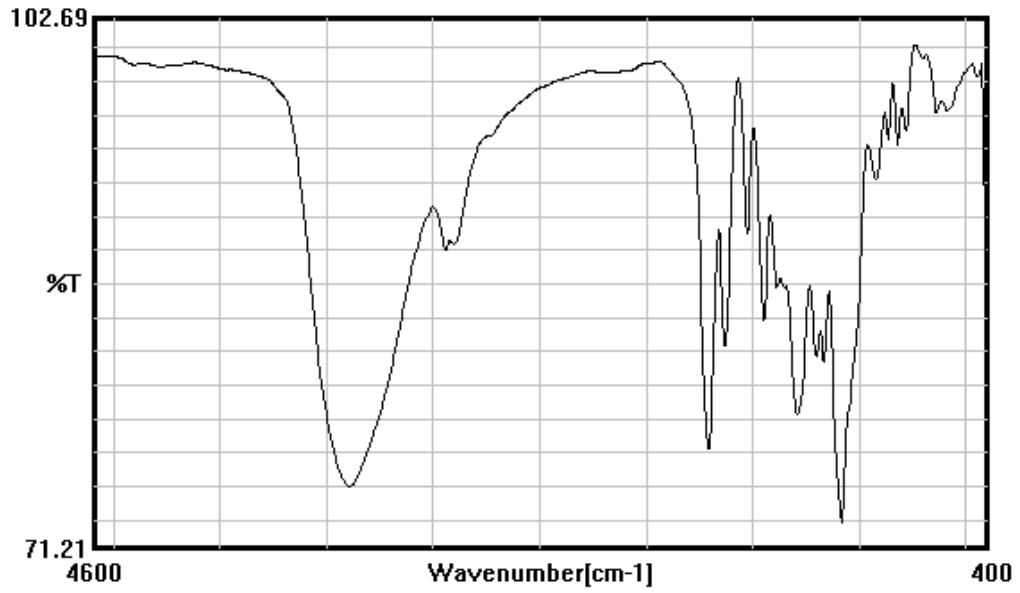
Çizelge 3.1. (MAAP)₂Fe(III)-oleuropein polimerinin kalıp uzaklaştırılmasından önceki ve sonraki haldeki, kuru ve şişmiş birim yükseklikleri

Polimerler	Birim yükseklik h_{kuru}	Birim yükseklik $h_{\text{şişmiş}}$	% Şişme oranı
Baskılama sonrası polimer	0,5 birim	1,9 birim	% 280
Baskılama öncesi polimer	0,5 birim	0,85 birim	% 70

Eşitlik (3.1)'e Çizelge 3.1'deki değerlerin yerleştirilmesi sonucu baskılama sonrası polimerlerin şişme oranı % 280, baskılama öncesi polimerlerin şişme oranı ise % 70 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar baskılama sonrası şişme oranının arttığını göstermektedir. Oleuropein yapıdan uzaklaştırıldığında bu boşluklara su iyonları daha kolay girebilmekte ve polimerlerin daha fazla şişmesine sebep olmaktadır.

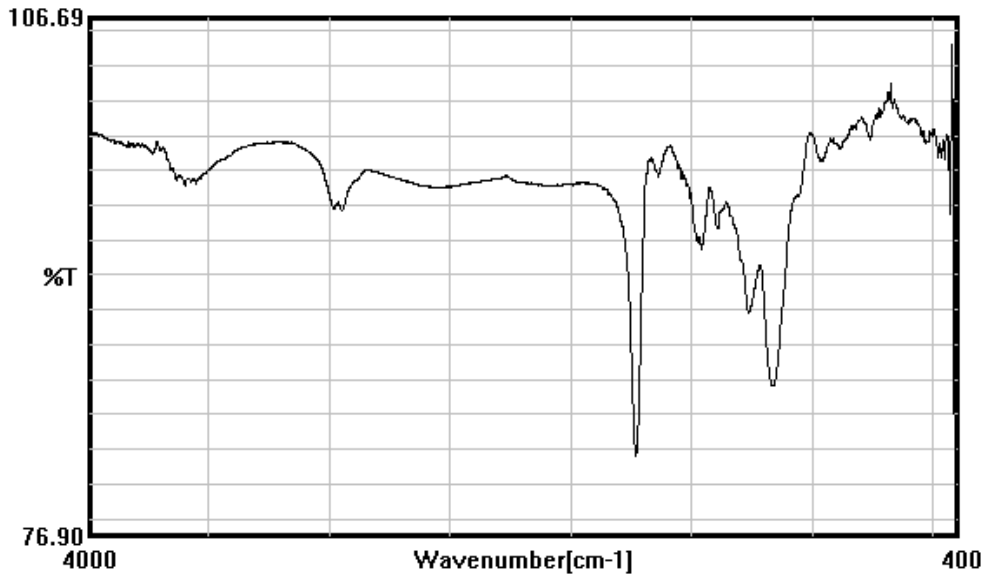
3.1.2.3. FTIR analizi

Saf oleuropeinin ve (MAAP)₂Fe(III)-oleuropeinin FTIR spektrumları, KBr ile tablet hazırlanarak alınmıştır.



Şekil 3.3. Saf oleuropein molekülünün FTIR spektrumu

Saf oleuropeinin Şekil 3.3’de verilen FTIR spektrumu incelendiğinde 3400 cm^{-1} ’deki yayvan pik benzen halkasına bağlı -OH pikidir ve aromatik halkaya ait olan C=C gerilme titreşimi ise 1523 cm^{-1} ’de görülmüştür. Ester ve alifatik aside ait karbonil pikleri 1708 ve 1627 cm^{-1} ’de ortaya çıkmıştır. Ayrıca eter yapılarına ait C-O pikleri 1284 ve 1076 cm^{-1} ’de görülmektedir. 1446 cm^{-1} ’de alifatik C-H gerilme titreşimi ve 1384 cm^{-1} ‘de $-\text{CH}_3$ gerilme titreşimi görülmektedir. Şekil 3.4’de saf oleuropein için FTIR spektrumu verilmiştir.



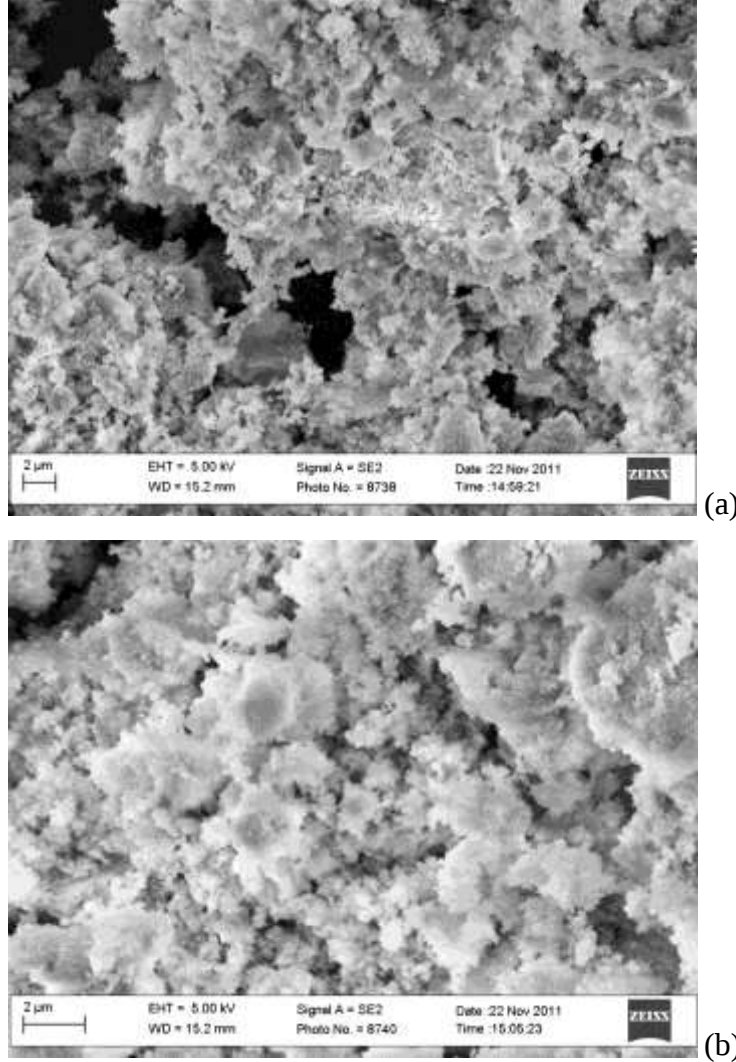
Şekil 3.4. (MAAP)₂Fe(III)-oleuropein polimerine ait FTIR spektrumu

(MAAP)₂Fe(III)-oleuropein polimerine ait FT-IR spektrumunda; 473 cm⁻¹ piki Fe-O piki, 753 cm⁻¹ pik monosubstitüe benzen halkasına ait olan pik, 1637 ve 1650 cm⁻¹'de karbonil pikleri ortaya çıkmıştır. 1260 cm⁻¹'de eter yapısındaki C-O piki görülmektedir. 1456 cm⁻¹'de alifatik C-H gerilme titreşimi ve 1395 cm⁻¹'de -CH₃ gerilme titreşimi görülmüştür. 3553 cm⁻¹'deki H₂O molekülü ile Fe(III) iyonunun koordinasyona girdiği pikin olmadığı görülüyor bu durum Fe(III) iyonuna bağlı H₂O moleküllerinin ayrılarak onların yerini oleuropeindeki -OH gruplarının almasından kaynaklanmaktadır. Oleuropeine ait olan piklerden 3400 cm⁻¹'deki yayvan -OH pikinin ise saf oleuropeindeki gibi keskin ve belirgin olmadığı görülüyor. Bu durum hidroksil gruplarının metal iyonu ile etkileştiğini göstermektedir. Şekil 3.4'te (MAAP)₂-Fe(III)-oleuropein polimerinin FTIR spektrumu verilmiştir.

3.1.2.4. Yüzey morfolojisi

(MAAP)₂Fe(III)-oleuropein polimerinin kalıbın uzaklaştırılmasından sonraki yüzey morfolojisi ve kesit yapıları taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak incelenmiştir. Şekil 3.5'de görüldüğü gibi süspansiyon polimerizasyonu sonucunda elde edilen polimerik yapılar mikroküre şekline

benzemesede oldukça gözenekli yapıya sahiptirler. Bu durum da yüzey alanını ve adsorpsiyon oranını arttırmaktadır.



Şekil 3.5. (MAAP)₂Fe(III)-oleuropein polimerinin kalıptan uzaklaştırıldıktan sonraki SEM görüntüleri (a) 7000 kere yakınlaştırılmış (b) 13000 kere yakınlaştırılmıştır

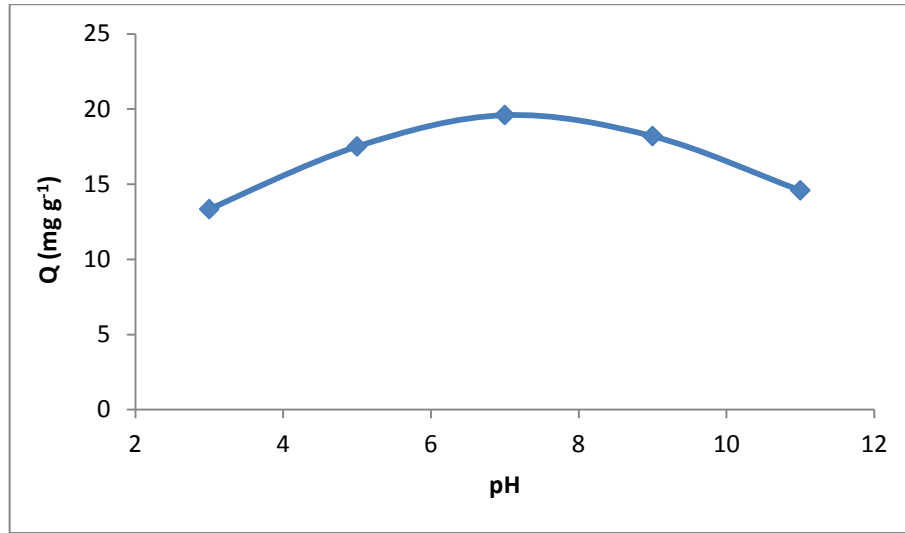
3.2. Oleuropein Baskılanmış Polimerlerin Adsorpsiyon Kapasitesi

3.2.1. Oleuropein adsorpsiyonuna pH'ın etkisi

Oleuropein baskılı polimerlerin adsorpsiyonu için farklı pH'larda (HCl, NaOH ve fosfat tamponları kullanılarak) kesikli sistemde 50 ppm'lik oleuropein

çözeltileri hazırlanmış ve 3 saat boyunca oleuropein baskılı polimer ile işleme tabi tutulmuştur.

Deneyler üç kez tekrar edilmiştir. Her bir veri seti için ortalama değerler kullanılmıştır. Sonuç olarak Şekil 3.6’da görüldüğü gibi en yüksek adsorpsiyon kapasitesinin, pH 7’de ve fosfat tamponuyla sağlandığı bulunmuştur.

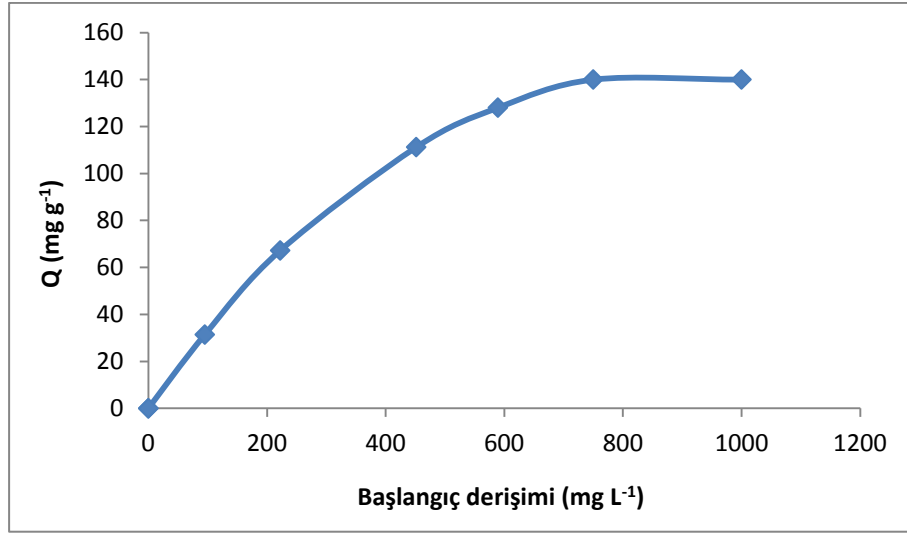


Şekil 3.6. Oleuropein adsorpsiyonuna pH'nın etkisi

3.2.2. Oleuropein adsorpsiyonuna başlangıç derişiminin etkisi

Oleuropeinin başlangıç derişimlerinin adsorpsiyon kapasitesine etkisini gözlemek amacıyla 35 ila 1000 ppm arasında çeşitli derişimlerde oleuropein çözeltileri hazırlanmış ve bu çözeltilerden 5'er mL alınarak 0,01 g adsorbent üzerine ilave edilmiştir. 3 saatlik karıştırma sonucu süzöntülerdeki oleuropein miktarları; UV-Vis cihazı kullanılarak 280 nm’de tayin edilmiştir.

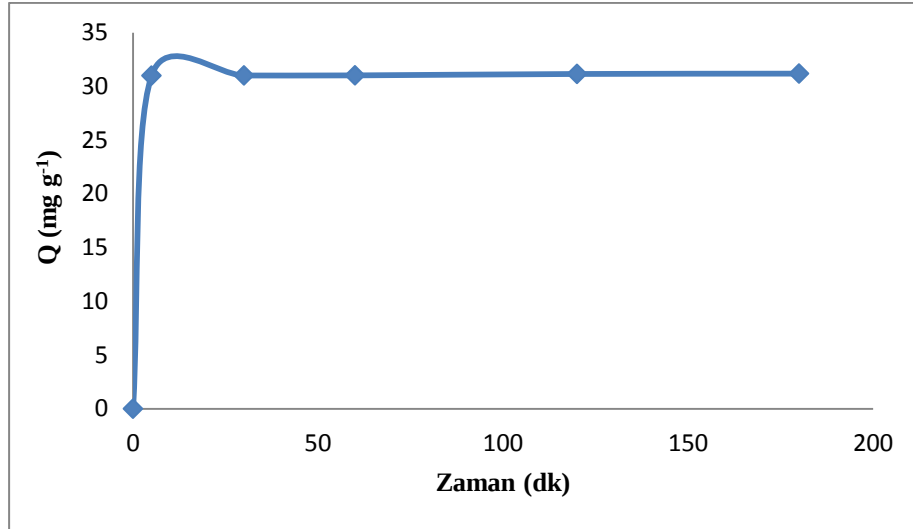
Başlangıç oleuropein derişiminin, oleuropein adsorpsiyonuna etkisi Şekil 3.7’de görülmektedir. Şekil 3.7’den de anlaşıldığı gibi birim sorbent başına düşen oleuropein adsorpsiyon miktarı oleuropein derişimi arttıkça doğrusal olarak hızla artmaktadır ve doygunluğa ulaşmaktadır. Sorbent partiküllerinin oleuropein için maksimum adsorpsiyon kapasitesine 750 ppm oleuropein kullanıldığında ulaşılmıştır ve 140,0 mg g⁻¹ olarak bulunmuştur.



Şekil 3.7. Oleuropein adsorpsiyonuna başlangıç derişiminin etkisi

3.2.3. Oleuropein adsorpsiyonuna zamanın etkisi

Oleuropein baskılanmış polimerin denge adsorpsiyon zamanını bulmak için; oda sıcaklığında 95 ppm'lik oleuropein çözeltisi pH: 7'de farklı süreler tutularak (5-180 dakika) polimerik yapı ile muamele edilmiştir. Şekil 3.8'de polimerin oleuropein adsorpsiyonunun zamanla değişim grafiği verilmiştir. Oleuropein adsorpsiyonunun ilk 5 dakikada hızla gerçekleştiği ve doygunluğa ulaştığı gözlenmiştir.



Şekil 3.8. Oleuropein adsorpsiyonuna zamanın etkisi

3.2.4. Adsorpsiyon izotermi

Adsorpsiyon izotermi, her bir molekülün adsorbanlarla etkileşimlerinin karakterizasyonu için kullanılır. Adsorpsiyon izotermi, iki faz dengede iken katı faza adsorbe olan iyon miktarı ve çözeltideki moleküllerin derişimi arasında ilişki kurulmasını sağlar. Langmuir adsorpsiyon modeli, her biri yalnız bir molekülü tutmaya elverişli belirli sayıdaki tanımlanmış bölümlere moleküllerin adsorbe olduğunu varsayar. Bu bölümlerin enerji olarak eşdeğer olduğu ve yakın bölümlerdeki adsorbe olmuş moleküllerle arasında hiçbir etkileşim olmayacak kadar birbirinden uzak olduğu varsayılır. Langmuir denklemi aşağıdaki gibi gösterilebilir.

$$Q = Q_{\text{maks}} \cdot b \cdot C_{\text{eq}} / (1 + bC_{\text{eq}}) \quad (3.3)$$

Bu eşitlikte;

Q = Adsorbana adsorplanmış oleuropein derişimi (mg g^{-1})

C_{eq} = Çözeltideki oleuropein denge derişimi (mg L^{-1})

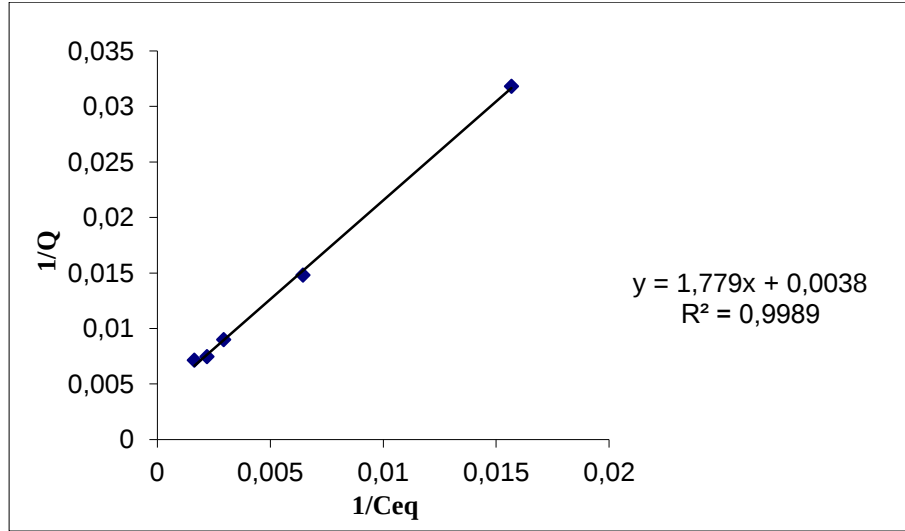
b = Langmuir sabiti (L mg^{-1})

Q_{maks} = Maksimum adsorpsiyon kapasitesi (mmol g^{-1}) dir.

Bu denklem aşağıdaki gibi lineerleştirilebilir.

$$1/Q = [1/(Q_{maks}b)][1/C_{eq}] + [1/Q_{maks}] \quad (3.4)$$

$1/Q$ 'ya karşı $1/C_{eq}$ grafiğe geçirildiğinde; kesim $1/Q_{maks}$, eğim ise $1/Q_{maks}b$ 'yi verir. Şekil 3.9'da oleuropein adsorpsiyonu için Langmuir adsorpsiyon modelinin grafiği verilmiştir.



Şekil 3.9. Oleuropein adsorpsiyonu için Langmuir adsorpsiyon izoterminin grafiği

Sisteme uygulanan diğer bir adsorpsiyon modeli ise Freundlich izotermdir. Freundlich denklemi ideal olarak temiz ve homojen olmayan katı yüzeylerdeki adsorpsiyonlar için Alman fizikokimyacı Herbert Max Finlay Freundlich tarafından deneysel çalışmalara bağlı olarak türetilmiştir.

$$\ln Q = \ln K_f + n \cdot \ln C_{eq} \quad (3.5)$$

Bu eşitlikte;

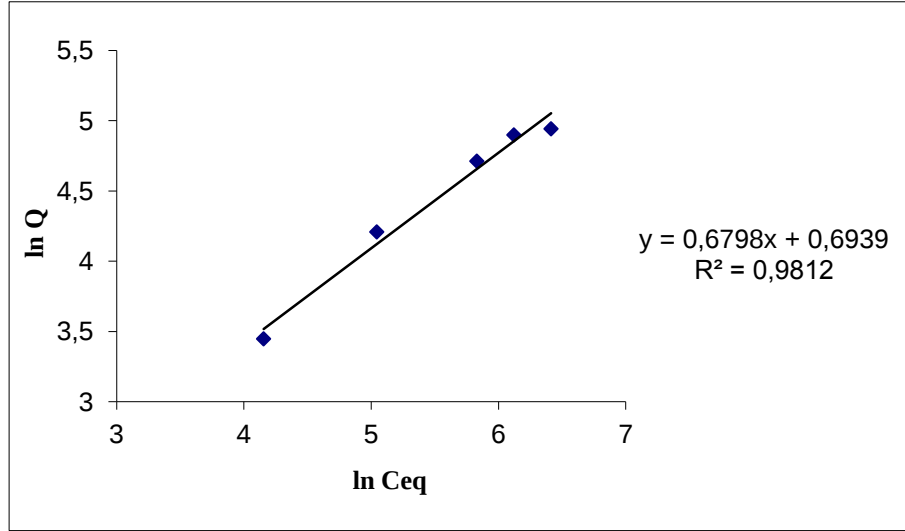
Q = Adsorbana adsorplanmış oleuropein derişimi (mg g^{-1})

C_{eq} = Çözeltideki oleuropein denge derişimi (mg L^{-1})

n = Freundlich sabiti

K_f =Freundlich sabiti

$\ln Q$ 'ya karşı $\ln C_{eq}$ grafiğe geçirildiğinde yine kesimden K_f ve eğimden de n sabitleri bulunabilir. Şekil 3.10'da oleuropein adsorpsiyonu için Freundlich adsorpsiyon modelinin grafiği verilmiştir.



Şekil 3.10. Oleuropein adsorpsiyonu için Freundlich adsorpsiyon izotermi

Oleuropein adsorpsiyon verileri sırasıyla Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izotermine uygulandığında oleuropein adsorpsiyonunun Langmuir izotermine uyduğu bulunmuştur. Çünkü elde edilen grafiklerin regreasyon sabitlerine (R^2) bakıldığında Langmuir için hesaplanan değeri (0,9989) Freundlich için hesaplanan değerden (0,9812) daha yüksek çıkmıştır. Bu yüzden sınırlı sayıda bağlanma bölgesi içeren bir yüzey üzerine tek tabakalı bir adsorpsiyon gerçekleştiği söylenebilir.

Çizelge 3.2. (MAAP)₂Fe(III) baskılı polimerler için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon modellerinin karşılaştırılması

DeneySEL	Langmuir			Freundlich		
	Q_m ($mg\ g^{-1}$)	$b(L\ mg^{-1})$	R^2	$K_f (L\ g^{-1})$	n	R^2
Baskılı Polimerler Q_{maks} ($mg\ g^{-1}$)						
140	263,2	$2,13 \cdot 10^{-3}$	0,9989	2,0015	0,6798	0,9812

3.2.5. Oleuropein baskılı polimerin oleuropein bağlama etkinliğinin ölçülmesi

Baskılı polimer ve kalıp arasındaki bağlanma etkileşimleri ve eşitlikleri Scatchard analizi yöntemi ile elde edilmiş ve bu yöntem MIP çalışmalarında daha önceleri de kullanılmıştır (Özcan, 2007). Bu analizde aşağıdaki eşitlik kullanılmaktadır.

$$Q / [C] = [Q_{\text{maks}} / K_D] - [Q / K_D] \quad (3.6)$$

Bu eşitlikte;

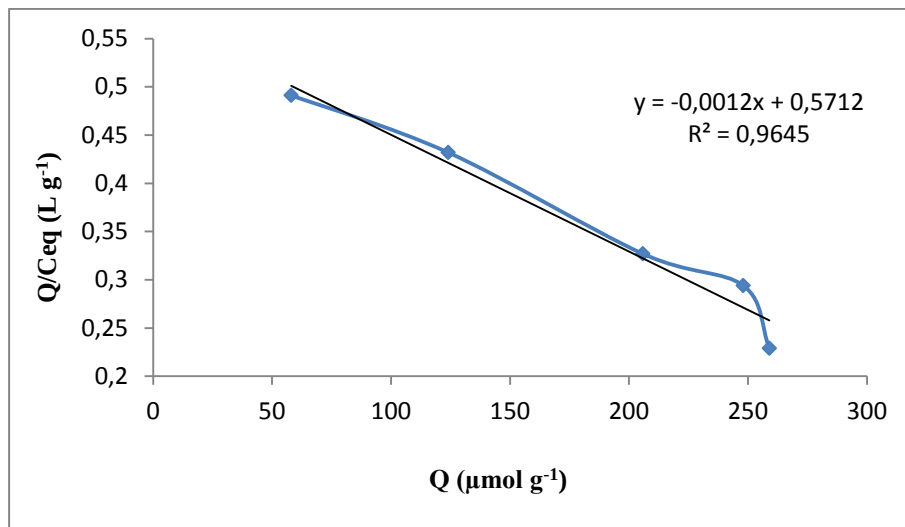
Q : Polimere bağlanan oleuropein miktarını

C : Serbest oleuropein derişimini

Q_{maks} : Bağlanma bölgelerinin maksimum sayısını

K_D : Ligand-değişim temelli metal-şelat kopolimerinin ayrışma sabitini ifade etmektedir.

Oleuropein baskılanmış mikrokürelerin, oleuropein bağlama etkinliğinin belirlenmesi için çizilen Scatchard grafiği (Şekil 3.11) bir doğru içermektedir. Bu durum polimerlerin, oleuropein için bir bağlanma bölgesine sahip olduğunu düşündürmüştür. Bağlanma bölgesi için K_a ($1/K_d$), $1,2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ ve maksimum ligand-değişim etkileşme sayısı olan Q_{maks} , $476 \mu\text{mol g}^{-1}$ ($257,04 \text{ mg g}^{-1}$) olarak bulunmuştur. Şekil 3.11'deki grafikte doğru için R^2 değeri ise 0,9645'dir.



Şekil 3.11. Oleuropein bağlanmasına ilişkin Scatchard grafiği

3.3. Oleuropein Baskılı Polimerlerin Desorpsiyon Çalışması

UV-Vis cihazı ile derişimi 99,026 ppm olarak ölçülen oleuropein çözeltisinden 5 ml alınarak 0,01 g adsorbent ile 3 saat karıştırdıktan sonra süzüntü derişimi 30,875 ppm olarak ölçülmüştür. MIP'e tutunmuş olan oleuropein dört farklı elüent ile 12 saat yıkanmıştır. Sulu fazda son kalan oleuropein derişimi UV-Vis cihazı ile 280 nm'de tayin edilmiştir. Desorpsiyon oranı aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Desorpsiyon oranı(\%)} = \frac{\text{Desorbe olan oleuropein miktarı}}{\text{Adsorplanan oleuropein miktarı}} \times 100 \quad (3.7)$$

Çizelge 3.2'de bu dört elüent için desorpsiyon miktarları verilmiştir. Bu miktarlara bakıldığında % 101,10 ile en yüksek miktarda desorpsiyon sağlayan elüentin %50 metanol + %30 deiyonize su + %20 sodyumhidroksit olduğu anlaşılmıştır. Deneysel olarak (MAAP)₂Fe(III)-oleuropein polimerinden oleuropeinin ayrılması aşamasında çok düşük miktarda içinde kalan oleuropeinde bu elüent ile desorpsiyon sırasında ayrılmıştır. Bu desorpsiyon elüenti kullanılarak farklı derişimlerde oleuropein ile çalışma yapılmıştır.

Çizelge 3.3. Çeşitli elüentlerin desorpsiyon miktarları ve yüzde desorpsiyon oranları

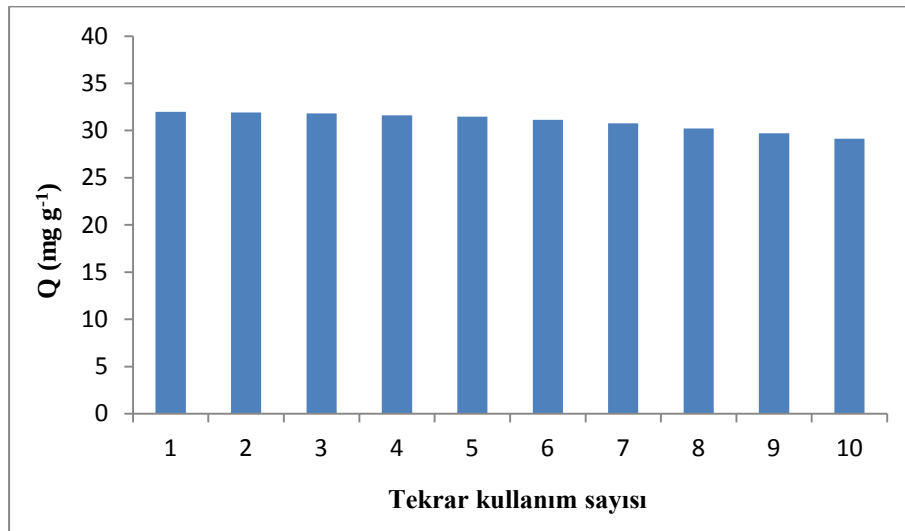
Elüent Çeşidi	Desorpsiyon Miktarı	% Desorpsiyon Oranı
%100 metanol	67,91 ppm	% 99,65
%50 metanol+ %30 deiyonize su + %20 NaOH	68,90 ppm	% 101,10
%40 metanol + %30 deiyonize su + %30 NaOH	64,48 ppm	% 94,61
%100 etanol	60,01 ppm	% 88,05

Adsorplanan oleuropein, %50 metanol+ %30 deiyonize su + %20 NaOH çözeltisinin kullanılması ile oda sıcaklığında 12 saat boyunca karıştırılarak desorbe edilmiştir.

Dört farklı derişimde (100, 250, 500, 750 ppm) yapılan desorpsiyon çalışması sonucunda (3.7)'ye göre yüzde desorpsiyon oranları hesaplanmış ve bu dört desorpsiyon çalışmasının ortalaması alınmıştır. Bu hesaplamalar sonucunda ortalama desorpsiyon oranı % 74,5 olarak bulunmuştur.

3.4. Oleuropein Baskılanmış Polimerlerin Yeniden Kullanılabilirliği

Oleuropein baskılı mikrokürelerinin tekrar kullanılabilirliğini incelemek amacıyla aynı adsorbent 10 kez ardı ardına 100 ppm oleuropein çözeltisi ile adsorpsiyon-desorpsiyon işlemine tabi tutulmuştur. Sonuç olarak, Şekil 3.12'de görüldüğü gibi oleuropein baskılı mikrokürelerin adsorpsiyon kapasitesinde çok fazla kayıp olmaksızın tekrar tekrar kullanılabilir olduğu gözlenmiştir.



Şekil 3.12. Oleuropein baskılı polimerlerin yeniden kullanılabilirliği

3.5. Oleuropein Baskılanmış Polimerlerin Seçiciliği

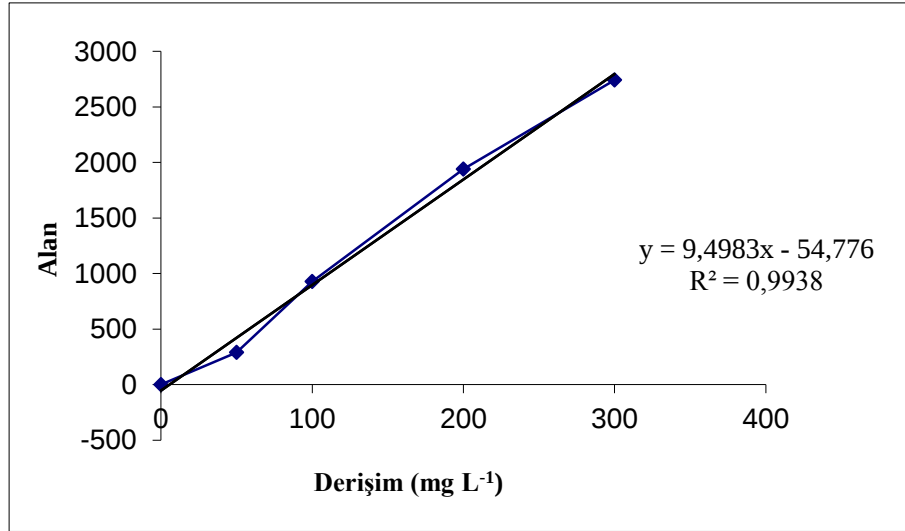
Hazırlanan adsorbentin seçiciliğini incelemek amacıyla oleuropeine yapı olarak benzeyen ve zeytin yaprağı ekstresinde aktif olarak bulunan rutin ile çalışılmıştır. Her iki maddeninde 100 ppm’lik çözeltileri hazırlanmış ve moleküler baskılı polimer ile 3 saat süresince karıştırılmıştır. Hazırlanan polimerin yapılan kesikli sistem adsorpsiyon denemeleri sonucunda rutin’e karşı daha düşük bir afinite gösterdiği belirlenmiştir. Dolayısıyla moleküler baskılı polimerin, yüksek seçiciliğe sahip olduğu söylenebilir. Q değerleri oleuropein için 31,402 mg g⁻¹, rutin için 6,08 mg g⁻¹ olarak bulunmuştur. Eşitlik (3.8)’de verilen formüle göre oleuropein baskılanmış polimerin seçiciliği 5,16 olarak hesaplanmıştır.

$$K = Q_{\text{oleuropein}} / Q_{\text{rutin}} \quad (3.8)$$

Bu sonuca dayanarak hazırlanan MIP sorbentin oleuropeine seçiciliğinin rutine göre 5 kat daha fazla olduğu söylenebilir.

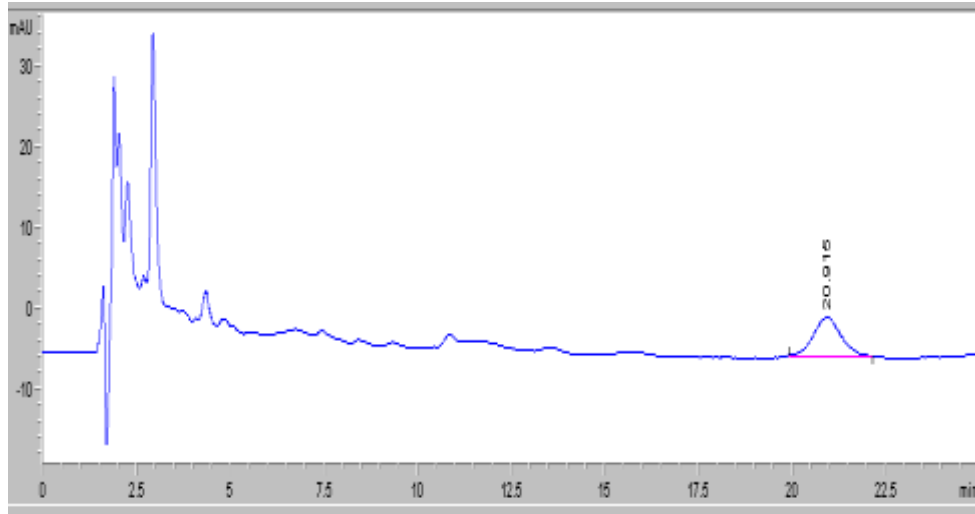
3.6. HPLC Cihazı ile Zeytin Yaprakı Ekstresindeki Oleuropein Tayini

Metanol ile hazırlanmış olan zeytin yaprağı ekstresinden moleküler baskılı polimer sayesinde ayrılan oleuropeinin miktar tayini kesikli sistemle gerçekleştirilip sonuçlar HPLC cihazı kullanılarak belirlenmiştir. HPLC analizleri mobil faz olarak % 60:40’lık 0,1 M asetat tamponu (pH:5) : metanol karışımı kullanılarak oda sıcaklığında, 0,9 ml dak⁻¹ akış hızı ve 240 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Analiz için ilk olarak 50, 100, 200 ve 300 ppm’lik oleuropein çözeltileri hazırlanıp HPLC cihazı ile okutulmuştur. Şekil 3.13’te görüldüğü gibi bu dört farklı derişim için ölçülen alanlar ile kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.

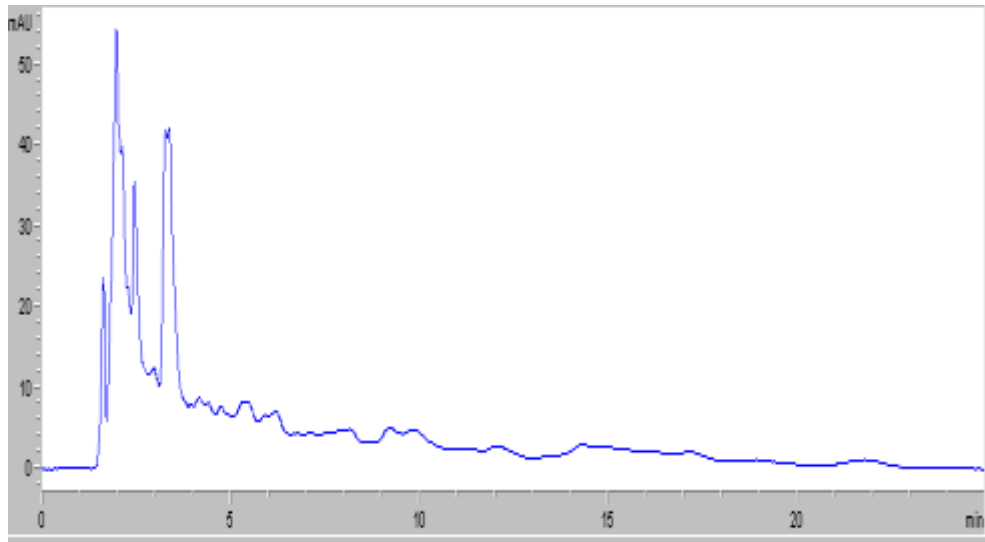


Şekil 3.13. Oleuropein için oluşturulan kalibrasyon eğrisi

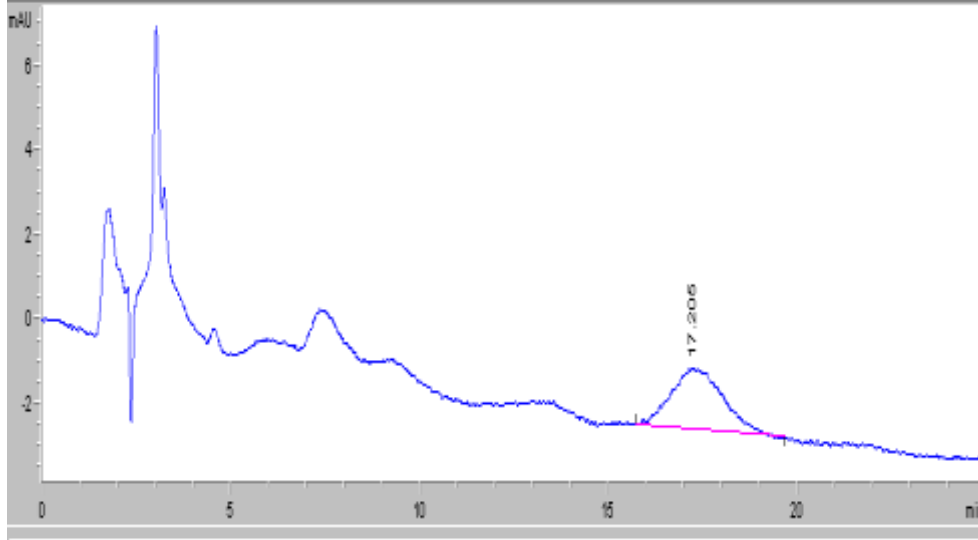
İkinci olarak ise metanol ile hazırlanmış olan kuru zeytin yaprağı ekstresinden 0,05 g alınarak deiyonize saf su ile 50 ml'ye seyreltilmiş ve ekstredeki oleuropeinin derişimi 40,5 ppm olarak bulunmuştur (Şekil 3.14'de HPLC kromatogramı görülmektedir). Hazırlanan ekstreden 5 ml alınarak 0,01 g adsorbent ile 3 saat karıştırılmıştır. Moleküler baskılı polimer ve onun uygun boşluklarına yerleşmiş olan oleuropein mavi bant süzgeç kağıdı ile süzülerek çözeltiden ayrılmıştır. MIP ile muamele sonucu zeytin yaprağı ekstresinin HPLC analizi yapılmış ve ekstrede 8 ppm oleuropein kaldığı tespit edilmiştir (Şekil 3.15). Son olarak adsorplanmış MIP'in desorpsiyonu için 5 ml %50 metanol + %30 deiyonize su + %20 NaOH karışımı ile 18 saat boyunca karıştırılarak oleuropeinin ayrılması sağlanmıştır. MIP'den desorbe edilen oleuropeinin 24,2 ppm olduğu bulunmuştur (Şekil 3.16). HPLC analizlerine bakıldığında MIP ile muameleden sonraki analizde, zeytin yaprağı ekstresinin analizinde olduğu gibi karmaşık bir kromatogram elde edilirken, desorbe edilen oleuropeinin analizinde çok daha sade bir kromatogramın elde edildiği görülmektedir. Bu durum hazırlanan MIP'in oleuropeine seçici olmakla birlikte diğer bazı fenoliklerinde bir miktar MIP'e tutunduğunun göstergesidir. MIP ile muamele sonucu matriks etkisi azaltılmış ve oleuropein önderiştirilmesi sağlanmıştır.



Şekil 3.14. Zeytin yaprağı ekstresinin HPLC kromatogramı



Şekil 3.15. Zeytin yaprağı ekstresinin MIP ile muamele edildikten sonra süzütünün HPLC kromatogramı



Şekil 3.16. Zeytin yaprağı ekstresinden MISPE kullanılarak ayrılan ve elüe edilen oleuropein elüatı için HPLC kromatogramı

3.7. Zeytin Yaprağı Ekstrsinde Bulunan Oleuropein Miktarı

Zeytin yaprağı ekstresindeki oleuropein miktarının tayini kesikli sistemde kütle miktarlarındaki değişimlerden yararlanılarak bulunmuştur. Bu işlem için 0,0303 g zeytin yaprağı ekstresi 50 ml'ye seyreltildikten sonra bu çözeltinin 10 ml'si 0,05 g moleküler baskılı polimer ile 3 saat karıştırılmıştır. (MAAP)₂Fe(III)-oleuropein süzgeç kağıdı ile çözeltiden ayrılıp, kurutulduğunda süzgeç kağıdında 0,0388 g madde tartılmıştır. Desorpsiyon işlemi ise 10 ml %50 metanol+ %30 deiyonize su + %20 NaOH karışımı ile 18 saat karıştırılarak gerçekleştirilmiştir. Süzme işlemi yapılarak oleuropein adsorbentten ayrılmış ve elüsyon çözeltisi uçurulduğunda beherde 1,0 mg oleuropeinin kaldığı görülmüştür.

0,0303 g ile hazırlanmış olan zeytin yaprağı ekstresinden 5,0 mg oleuropein ayrılmıştır. Yani 1 kg zeytin yaprağı ekstresinden 165 g oleuropein ve 1 kg zeytin yaprağından 17,53 g oleuropein saflaştırılmıştır.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada oleuropein için seçici olan (MAAP)₂Fe(III)-oleuropein polimeri sentezlenerek zeytin yaprağı ekstresinden oleuropeinin ayrılması sağlanmıştır. Hazırlanan MIP için adsorpsiyon kapasitesi, seçicilik, tekrar kullanılabilirlik ve desorpsiyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Son olarak zeytin yaprağı ekstresinden oleuropeinin ayrılmasına yönelik çalışma gerçekleştirilmiştir.

Son zamanlarda zeytin yaprağının içeriği ve bileşenlerinin ekstraksiyonu üzerine çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Ancak yapılan bu çalışmalar daha çok ham ekstrakt ile sınırlıdır. Yaprak ekstresindeki spesifik bileşenlerin ayrı ayrı saflaştırılarak elde edilmesine yönelik fazla bir çalışma yoktur. Kullanılan adsorbentlerin de seçicilikleri sınırlıdır. Yapılan literatür incelemesinde oleuropein ayırma ve saflaştırmaya yönelik MIP temelli bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmamda, (MAAP)₂Fe(III) monomerin kullanımıyla oleuropein baskılı polimerler sentezlenmiş ve sentezlenen bu polimerle zeytin yapraklarından oleuropein gibi önemli bir biyofenolün son derece kolay ve ucuz bir yöntemle, yüksek verimle ayrılması sağlanmıştır. Hazırlanan sorbentler oldukça ucuza mal olduğundan ve tekrar kullanılabilirliğinin oldukça fazla olmasından dolayı, yüksek oranda oleuropein piyasaya göre son derece düşük maliyetle elde edilebilmektedir. Biyofenol kaynağı olarak kullanılabilen zeytin yaprakları ise ülkemizde bol miktarda bulunmaktadır. Elde edilen ayrılmış oleuropein biyomedikal alanda oldukça geniş kullanım alanlarına sahiptir.

Oleuropeinin ayrılması için kullanılan MIP metal-şelat etkileşimine dayanmaktadır. Metal-şelat etkileşimleriyle hazırlanan MIP'ler kovalent ya da kovalent olmayan etkileşimlere dayalı MIP'lere göre bir takım avantajlara sahiptir. Bu avantajlardan biri; kullanılan metal (Fe⁺³) iyonu, MAAP monomeriyle şelat oluşturduktan sonra bir Lewis asidi gibi davranarak hedef molekülde yer alan elektron verici bir grupla koordinasyonunu tamamlamaktadır. Bu nedenle oluşan bağlanma oldukça seçici ve kovalent olmayan etkileşimlere göre çok daha güçlüdür.

Hazırlanan MIP'in karakterizasyonu yapıldıktan sonra kesikli sistemde adsorpsiyon-desorpsiyon denemeleri gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

İlk olarak oleuropein baskılı polimerler kullanılarak adsorpsiyon kapasitesini önemli ölçüde etkileyen ortam pH'ın oleuropein adsorpsiyon kapasitesine etkisi incelenmiştir (Şekil 3.6). Elde edilen adsorpsiyon kapasitesi değerlerinin pH 7' ye kadar arttığı daha sonra ise azaldığı görülmüştür. Bu sonuca dayanarak oleuropeinin ayırma işlemini sulu ortamda rahatlıkla gerçekleştirebileceği söyleyebilir. Ayrıca oleuropein adsorpsiyonuna zamanın etkisinin anlaşılması için yapılan çalışmada oleuropein baskılı polimerlerin denge adsorpsiyonuna 5 dakikada çok hızlı bir şekilde ulaştığı görülmüştür.

Oleuropein baskılı polimerlere oleuropein adsorpsiyonunun başlangıç derişimlerinin etkisi incelenmiş ve başlangıç derişimleri arttıkça adsorpsiyon miktarının arttığı ve 140 mg g^{-1} adsorpsiyon kapasitesinde doygunluğa ulaştığı görülmüştür. Bu aşamada elde edilen Q ve C değerleri kullanılarak Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izotermi oluşturulmuş ve Langmuir izotermine uyduğu bulunmuştur. Çünkü elde edilen grafiklerin regresyon sabitlerine (R^2) bakıldığında Langmuir için hesaplanan değer (0,9989), Freundlich için hesaplanan değerden (0,9812) daha yüksek çıkmıştır. Dolayısıyla hazırlanan polimerde, sınırlı sayıda bağlanma bölgesi içeren bir yüzey üzerine tek tabakalı bir adsorpsiyon gerçekleştiği söylenebilir.

Oleuropein baskılı polimerler ve oleuropein arasındaki bağlanma etkileşimleri Scatchard analiz yöntemi ile gerçekleştirilmiştir ve bir doğru elde edilmiştir. Bu durum $(\text{MAAP})_2\text{Fe(III)}$ polimerlerinin, oleuropein için sadece bir bağlanma bölgesine sahip olduğunu düşündürmüştür. Bu bağlanma bölgesi için K_a , $1,2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ ve maksimum ligand-değişim etkileşme sayısı olan Q_{max} , $476 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

Yapılan desorpsiyon çalışmasında çeşitli elüentler denenmiş ve en yüksek desorpsiyon oranı olan % 101,1 ile %50:30:20 metanol:deiyonize su:NaOH elüentinin olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca farklı derişimlerde hazırlanan oleuropein çözeltileri ile yapılan desorpsiyon çalışmasında desorbe edilen oleuropein miktarı %74,5 olarak bulunmuştur.

Katı-faz ekstraksiyon uygulamasına geçilmeden önce hazırlanan polimerin seçiciliği zeytin yaprağında bulunan diğer önemli bir biyofenol olan rutin ile gerçekleştirilmiş ve hazırlanan MIP'in seçiciliğinin rutine göre 5 kat daha fazla olduğu görülmüştür. Hazırlanan MIP için yeniden kullanılabilirlikte incelenmiş ve 10 kullanım sonrası polimerlerin oleuropein adsorpsiyon kapasitelerinde sadece %8,9'luk bir kapasite kaybı gözlenmiştir.

Hazırlanan MIP ile zeytin yaprağı ekstresinden oleuropein ayrılması kesikli sistemle gerçekleştirilmiş ve HPLC cihazı ile tayin edilmiştir. HPLC analizleri mobil faz olarak % 60:40'luk 0,1 M asetat tamponu (pH:5) : metanol karışımı kullanılarak oda sıcaklığında, 0,9 ml dak⁻¹ akış hızı ve 240 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Zeytin yaprağı ekstresinin HPLC kromatogramı (Şekil 3.14) ile 1 kg zeytin yaprağında 3,91 g oleuropein , 1 kg zeytin yaprağı ekstresinde ise 40,5 g oleuropein olduğu belirlenmiştir. HPLC kromatogramı ile 40,5 ppm oleuropein olduğu belirlenen zeytin yaprağı ekstresinden hazırlanan çözelti, oleuropein baskılı polimer ile muamele edildikten sonra 24,2 ppm oleuropeinin ayrıldığı (Şekil 3.16) yine HPLC cihazı ile belirlenmiştir. Sonuç olarak hazırlanan MIP 1 kg zeytin yaprağından 2,34 g oleuropein ve 1 kg zeytin yaprağı ekstresinden ise 24,2 g oleuropeinin ayrılmasına olanak tanımaktadır.

Zeytin yaprağı ekstresinde bulunan oleuropeinin % 59,75'inin saf olarak eldesini sağlayan MISPE yöntemi literatürde ilk olması açısından da önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- Al-Azzawie, H.F. ve Saeed Alhamdani, M.S. (2006), “Hypoglycemic and Antioxidant Effect of Oleuropein in Alloxan-Diabetic Rabbits”, *Life Sciences*, **78**, 1371 – 1377.
- Altıok, E., Bayçın, D., Bayraktar, O. ve Ülkü, S. (2008), “Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea* L.) by adsorption on silk fibroin,” *Separation and Purification Technology*, **62**, 342–348.
- Anonim (2011), ULUSAL ZEYTİN VE ZEYTİNYAĞI KONSEYİ, <http://uzzk.org/ZeytinAgaci.asp>.
- Aziz, N.H., Farag, S.F., Mousa, L.A. ve Abo-Zaid, M.A. (1998), “Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds,” *Microbios*, **93**, 41-44.
- Bae, S.Y., Southard, G.L. ve Murray, G.M. (1999), “Molecularly imprinted ion exchange resing for purification and determination of UO^{+} by spectrophotometry and plasma spectrometry,” *Analytica chimica acta*, **397**, 173-181.
- Beney, P.J., Breuer, G.M., Jacobs, G.H., et. al. (1996), “Review, Evaluation, and Application of Solid Phase Extraction Methods,” *Hotlines*, **35**, 1-5.
- Bonilla, M., Salido, S., Beekb, T., Linares-Palomino, P. J., Altarejos, J., Nogueras, M. ve S´anchez, A. (2006), “Isolation and Identification of Radical Scavengers in Olive Tree (*Olea europaea*) Wood,” *Journal of Chromatography A*, **1112**, 311–318.
- Bouaziz, M. ve Sayadi, S. (2005), “Isolation and Evaluation of Antioxidants from Leaves of Tunisian Cultivar Olive Tree,” *European Journal of Lipid Science and Technology*, **107**, 497-504.
- Bulotta, S., Corradino, R., Celano, M., D’Agostino, M., Maiuolo, J., Oliverio, M., Procopio, A., Iannone, M., Rotiroti, D. ve Russo, D. (2011), “Antiproliferative and antioxidant effects on breast cancer cells of oleuropein and its semisynthetic peracetylated derivatives,” *Food Chemistry*, **127**, 1609–1614.

- Büyüktiryaki, S. (2005), "Metilciva belleklere sahip polimerik mikrokürelerle civa önderistirilmesi ve tayini," Yüksek Lisans Tezi, Osman gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 72s.
- Caro, E., Masqué, N., Marcé, R.M., Borrull, F., Cormack, P.A.G. ve Sherrington, D.C. (2002), "Non-covalent and semi-covalent molecularly imprinted polymers for selective on-line solid-phase extraction of 4-nitrophenol from water samples," *J. Chromatogr. A.*, **963**, 169–178.
- Carson, M.C. (2000), "Ion-pair solid-phase extraction," *Journal of Chromatography A.*, **885**, 343–350.
- Cemeroğlu, B. ve Acar, J. (1986), "Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi," Gıda Teknolojisi Derneği Yayın No:6, Ankara.
- Chang, X., Yang, X., Wei, X. ve Ve Wu, K. (2001), "Efficiency and machanism of new poly(acryl-phenylamidrazonephenylhydrazide) chelating fiber foradsorbing trace Ga, In, Bi, V, Ti from solution," *Analytica chimica acta*, **450**, 231-238.
- Cobert Associates Catalogue, "Solid Phase Extraction (SPE) Guide," <http://www.cobertassoc.com/xpertekspe.jpg> / Erişim tarihi: 17.3.2005.
- Coni, E., Di Benedetto, R., Di Pasquale, M., Masella, R., Modesti, D., Mattei, R. ve Carlini, E.A. (2000), "Protective effect of oleuropein, on live density lipoprotein oxidizabilitiy in rabbits," *Lipids*, **35**, 45-54.
- Cormack, P.A.G. ve Elorza, A.Z. (2004), "Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation," *Journal Chromatography B.*, **804**, 173-182.
- Dong, X.C., Sun, H., Lu, X.Y., Wang, H.B., Lui, S.X. ve Wang, N. (2002), "Separation of ephedrine stereoisomers by molecular imprinted polymers influence of synhetic condition and mobile phase compositions on the chromatographic performance," *Analist*, **127**, 1427-1432.
- Ersöz, A., Denizli, A., Şener, İ., Atılır, A., Diltemiz, S and Say, R. (2004), "Removal of phenolic compound with nitrophenol-imprinted polymer based on π - π and hydrogen –bonding interaction," *Separation and purification Technology*, **38**(2), 173-179.
- Ersus, S. ve Esen, Y. (2008), "Oleuropein and Other Phenolic Compounds in Olive Leaves and Their Health Benefits," *Akademik Gıda*, **6**(2), 34-38.

- Esteban, M.A. (2001), "Molecularly imprinted polymers: new molecular recognition materials for selective solid-phase extraction of organic compounds," Fresen. J. Anal. Chem., **370**, 795-802.
- Fabiani, R., De Bartolomeo, A., Rosignoli, P., Servili, M., Selvaggini, R., Montedoro, G. F., et al. (2006), "Virgin olive oil phenols inhibit proliferation of human promyelocytic leukemia cells (HL60) by inducing apoptosis and differentiation," The Journal of Nutrition, **136**(3), 614–619.
- Fabiani, R., Rosignoli, P., De Bartolomeo, A., Fuccelli, R. ve Morozzi, G. (2008), "Inhibition of cell cycle progression by hydroxytyrosol is associated with up regulation of cyclin-dependent protein kinase inhibitors p21(WAF1/Cip1) and p27(Kip1) and with induction of differentiation in HL60 cells," The Journal of Nutrition, **138**(1), 42–48.
- Fehri, B., Aiache, J.M., Memmi'nin, A., Korbi, G., Yacoubi, M.T., Mrad, S. ve Lamaison, J.L. (1994), "Hypotension, hypoglycemia and hypouricemia recorded after repeated administration of aqueous leaf extract of *Olea europaea* L." J. Pharm. Belg., **49**(2), 101-108.
- Ferreira, D., Guyot, S., Marnet, N., Delgadillo, I., Renard, M.G.C.C. ve Coimbra, A.M. (2002), "Composition of Phenolic Compounds in Portuguese Pear (*Pyrus communis* L. Var. S. Bartolomeu) and Changes after Sun-Drying," Journal of Agricultural and Food Chemistry, **50**, 4537–4544.
- Flemmig, J., Kuchta, K., Arnhold, J. ve Rauwald, H.W. (2011), "*Olea europaea* leaf (Ph.Eur.) extract as well as several of its isolated phenolics inhibit the gout-related enzyme xanthine oxidase," Phytomedicine, **18**, 561–566.
- Garcia, O.B., Castillo, J., Lorente, J., Ortuno, A. ve Del Rio, J.A. (2000), "Antioxidant Activity of Phenolics Extracted from *Olea europaea* L. Leaves," *Food Chemistry*, **68**, 457-462.
- Gonzalez, M., Zarzuelo, A., Gamez, M.J., Utrilla, M.P., Jimenez, J. ve Osuna, I. (1992) "Hypoglycemic activity of olive leaf," *Planta Med* Dec, **58**(6), 513-515.
- Goodwin, W.E. (1997), "Preconcentration Neutron Activation Analysis of Trace Elements with 1-(2-thiazolylazo)-2-naphthol Using Reversed-Phase

- Extraction Chromatography,” Thesis of Doctorate, Dalhousie University, Halifax.
- Gou, Y., Din, B., Liu, Y., Chang, X., Meng, S. ve Tian, M. (2004), “Preconcentration of trace metals with 2-(methylthio)aniline-funtionalized XAD-2 and their determination by flame atomic adsorption spectrometry,” *Analytica chimica acta*, **504**, 319-324.
- Goulas, V., Exarchou, V., Troganis, A. N., Psomiadou, E., Fotsis, T., Briasoulis, E., et al. (2009), “Phytochemicals in olive-leaf extracts and their antiproliferative activity against cancer and endothelial cells,” *Molecular Nutrition and Food Research*, **53**, 600–608.
- Haginaka, J. (2005), “Selectivity of affinity media in solidphase extraction of analytes,” *Trends in Analytical Chemistry*, **24(5)**, 407-415.
- Hamdi, H.K. ve Castellon, R. (2005), “Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **334**, 769-778.
- Han, J., Talorete, T.P., Yamada, P. ve Isoda, H. (2009), “Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells,” *Cytotechnology*, **59**, 45–53.
- Hansen, M. (2002), “Olive Leaf Extract,” Goldgolf Pty Publisher Australia, 3-10.
- Haupt, K. ve Mosbach, K. (2000), “Molecularly imprinted polymers and their use in biomimetic sensors,” *Chem. Rev.*, **100(7)**, 2495-2504.
- Hennion, M.C. (1999), “Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography,” *Journal of Chromatography A.*, **856**, 3–54.
- Idiziak, L., Benrebouh, A. ve Deschams, F. (2001), “Simple NMR experiments as a means to predict the performance of an anti-17 alphaathynylestradiol molecular imprinted polymer,” *Anal. Chim. Acta.*, **435**, 137-140.
- Ikegami, T., Mukawa, T., Nariai H. ve Takeuchi, T. (2004), “Bisphenol Arecognition polymers prepared by covalent molecular imprinting,” *Anal. Chim. Acta.*, **504**, 131–135.

- Jap'on-Luj'an, R., Luque-Rodr'iguez, J.M. ve Luque de Castro, M.D. (2006a), "Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves," *Journal of Chromatography A*, **1108**, 76–82.
- Jap'on-Luj'an, R., Luque-Rodr'iguez, J.M. ve Luque de Castro, M.D. (2006b), "Multivariate optimisation of the microwave-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves," *Anal. Bioanal. Chem.*, **385**, 753–759.
- Jap'on-Luj'an, R. ve Luque de Castro, M.D. (2006c), "Superheated liquid extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves," *Journal of Chromatography A*, **1136**, 185–191.
- Karabörk, M., Ersöz, A., Denizli, A. ve Say, R. (2008), "Polymer-Clay Nanocomposite Iron Traps Based on Intersurface Ion-Imprinting," *Ind. Eng. Chem. Res.*, **47**, 2258-2264.
- Katz, A. ve Davis, M.E. (1999), "Investigation into the mechanisms of molecular recognition with imprinted polymers," *Macromolecules*, **32**, 4113-4121.
- Kriz, D., Ramstrom, O. ve Mosbach, K. (1997), "Molecular imprinting: new possibilities for sensor technology," *Anal. Chem.*, **69**, 345-349.
- Körükoğlu, M., Şahan, Y., Yiğit, A., Tümay Özer, E. ve Güçer Ş. (2004), "In-Vitro Antibacterial Activity of Olive Leaf (*Olea Europea*. L.) Extracts and Their Chemical Characterization," Adnan Menderes University, 4th AACD Congress, 29 Sept-3 Oct., Kuşadası-AYDIN.
- Lavignac, N., Allender, C.J. ve Brain, K.R. (2004), "Current status of molecularly imprinted polymers as alternatives to antibodies in sorbent assays," *Anal. Chim. Acta*, **510**, 139-145.
- LeBlanc, G. (2001), "A review of EPA sample preparation techniques for organic compound analysis of liquid and solid samples," *LCGC North America*, **19**, 1120-1130.
- Lee-Huang, S., Zhang, L. ve Huang, P.L. (2003), "Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1 infection and OLE treatment," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **307**, 1029-1037.

- Lee-Huang, S., Huang, P.L., Zhang, D., Lee, J.W., Bao, J., Sun, Y., Chang, Y. ve Zhang, J. (2007), "Discovery of small-molecule HIV-1 fusion and integrase inhibitors oleuropein and hydroxytyrosol: Part I. Integrase inhibition," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **354**, 872–878.
- Le Floch, F., Tena, M.T., Ri'os, A. ve Valca'rcel, M. (1998), "Supercritical fluid extraction of phenol compounds from olive leaves," *Talanta*, **46**, 1123–1130.
- Liott, C.A., Buthala, D.A. ve DeYoung, E.N. (1969), "Preliminary safety studies with calcium elenolate, an antiviral agent," *Antimicrob Agents Che.*, **9**, 173–76.
- Lok, C.M. ve Son, R. (2009), "Application of Molecularly Imprinted Polymers in Food Sample Analysis – a Perspective," *International Food Research Journal*, **16**, 127-140.
- Luque de Castro, M.D. ve Jap'on-Luj'an, R. (2006), *Trends Anal. Chem.* **25(5)**, 501.
- Luque de Castro, M.D. ve Priego Capote, F. (2010), "Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention," ISBN: 978-0-12-374420-3
- Macherey-Nagel. (2004), "Sample Preparation, Solid Phase Extraction," In: *Macherey-Nagel Catalogue*: 184-241.
- Maheswari, M .A. ve Subramanian, M.S. (2004), "Selective enrichment of U(VI), Th(IV) and La (III) from high acidic streams using a new chelating ion-exchange polymeric matrix," *Talanta*, **64 (1)**, 202-209.
- Majors, R.E. (2001), "New designs and formats in solidphase extraction sample preparation," *LCGC North America*, **19**, 678-687.
- Margari, M.T. ve Okogeri, O. (2001), "Simultaneous determination of phenolic compounds and tocopherols in virgin olive oil using HPLC and UV detection," *Food Chemistry*, **74**, 377-383.
- Maria, Z., Tsimidou ve Vassiliki T. Papoti, (2010), "Bioactive Ingredients in Olive Leaves," *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*, ISBN: 978-0-12-374420-3.
- Markin, D. ve Duek, L. (2003), "Berdicevsky I. In vitro antimicrobial activity of olive leaves," *Mcoses*, **46**, 132-136.

- Masque, N., Marce, R.M., Borrul, E., (2002), "Molecularly imprinted polymers: New tailor-made materials for selective solid-phase extraction," *Trend in Analytical Chemistry*, **20(9)**, 477-486.
- Menendez, J.A., Vazquez-Martin, A., Colomer, R., Brunet, J., Carrasco-Pancorbo, A., Garcia-Villalba, R., et al. (2007), "Olive oil's bitter principle reverses acquired autoresistance to trastuzumab (Herceptin™) in HER2-overexpressing breast cancer cells," *BioMed Central Cancer*, **7**, 80.
- Micol, V., Caturla, N., Perez-Fons, L., et al. (2005), "The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV)," *Antiviral Res.*, **66**, 129-136.
- Mosbach, K. ve Arshady, R. (1981), "Synthesis of substrate-selective polymers by host-guest polymerization," *Makromol. Chem.*, **182**, 687-692.
- Mulinacci, N., Romani, A., Galardi, C., Pinelli, P., Giaccherini, C. ve Vincieri, F.F. (2001), *J. Agric. and Food Chem.*, 3510-3514.
- Önden, G., Tetik, D. ve Sargın, S. (2000), "Sofralık Zeytin Üretiminde (Yeşil-Siyah) Enzimatik Yöntemlerin Kullanılması," *Zeytincilik Araştırma Enstitüsü, Sonuç Raporu Genel Yayın No:85, İzmir*, 55 s.
- Özcan, A. (2007), "Biyomoleküller için molekül baskılanmış polimerik yapay reseptör geliştirilmesi ve biyokromatografi uygulamaları," *Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, 120s.
- Page L. (2002), "Olive Leaf Extract," in *Healthy Healing*, edited by Page L.G., (Traditional Wisdom, USA), 107.
- Perrin, D. ve Armarego, D. (1996), "Purification of Laboratory chemicals," Fourth.ed. Butterworth-Heinemann, Oxford.
- Piga, A., Gambella, F., Vacca, V. ve Agabbio, M. (2001), "Response of Three Sardinian Olive Cultivars to Greek-Style Processing," *Italian Journal of Food Science*, **13**, 29-40.
- Pichon, V. (2000), "Solid-phase extraction for multiresidue analysis of organic contaminants in water," *Journal of Chromatography A.*, **885**, 195-215.
- Piletsky, S.A., Alcock, S. ve Turner, A.P.F. (2001), "Molecular imprinting at the edge of the third millennium," *Trends in Biotechnology*, **19**, 9-12.

- Pohl, P. ve Prusisz, B. (2004), "Pre-concentration of Cd, Co, Cu, Ni and Zn using different off-line ion exchange procedures followed by inductively coupled plasma atomic emission spectrometric detection," *Analytica chimica acta*, **502**, 83-90.
- Poole, C.F., Gunatilleka A.D. ve Sethuraman R. (2000), "Contributions of theory to method development in solid-phase extraction," *Journal of Chromatography A.*, **885**, 17–39.
- Ramström, O., Skudar, K., Haines, J., Patel, P. ve Brüggemann, O. (2001), "Food Analyses Using Molecularly Imprinted Polymers," *Journal of agricultural and food chemistry*, **49**,5.
- Ryan, D., Robards, K. ve Lavee, S. (1999a), "Changes in phenolic content of olive during maturation," *International Journal of Food Science and Technology*, **34**, 265-274.
- Ryan, D., Robards, K. ve Lavee, S. (1999b), "Determination of phenolic compounds in olives by reversed-phase chromatography and mass spectrometry," *Journal of Chromatography A.*, **832**, 87-96.
- Samuelsson, G. (1951), "The blood pressure lowering factor in leaves of *Olea Europaea*," *Farmaceutisk Revy*, **15**, 229-239.
- Sanchez, D.M., Martin, J. ve Munuera, M.L. (2000), "Preconcentration speciation method for mercury compounds in water samples using solid phase exrtraction followed by reserve phase high performance liquid chromatography," *Talanta*, **52**, 671-679.
- Savournin, C., Baghdikian, B., Elias, R., Dargouth-Kesraoui, F., Boukef K. ve Balansard, G. (2001), "Rapid High-Performance Liquid Chromatography Analysis for the Quantitative Determination of Oleuropein in *Olea europaea* Leaves," *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **49**, 618-621.
- Sellergren, B., Lepistö, M. ve Mosbach, K. (1988), "Highly enantioselective and substrate-selective polymers obtained by molecular imprinting utilizing noncovalent interactions - NMR and chromatographic studies on the nature of recognition," *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 5853–5860.

- Sellergren, B. (1999), "Polymer-and template-related factors influencing the efficiency in molecular imprinted solid-phase extraction," *Trend in Analytical Chemistry*, **18**, 164-174.
- Shahidi, F. ve Naczki, M. (1995), "Food Phenolics, Chemistry, Effects, Applications," Technomic, USA.
- Shamsipur, M., Shokrollahi, A., Sharghi, H. ve Eskandari, M.M. (2005), "Solid-phase extraction and determination of sub-ppb levels of hazardous Hg²⁺ ions," *Journal of hazardous materials B*, **117**, 129-133.
- Sirianni, R., Chimento, A., De Luca, A., Casaburi, I., Rizza, P., Onofrio, A., et al. (2010), "Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit MCF-7 breast cancer cell proliferation interfering with ERK1/2 activation," *Molecular Nutrition and Food Research*, **54(6)**, 833-840.
- Soliman, E. M., Saleh, M.B. ve Ahmed, S.A. (2004), "New solid phase extractors for selective separation and preconcentration of mercury (II) based on silica gel immobilized aliphatic amines 2-thiophenecarboxaldehyde Schiff's bases," *Analytica chimica acta*, **523**, 133-140.
- Steinke, J., Sherrington, D. ve Dunkin, I. (1995), "Imprinting of Synthetic Polymers Using Molecular Templates," *Adv. Polym. Sci.*, **123**, 80-125.
- Stevenson, D. (2000), "Immuno-affinity solid-phase extraction," *Journal of Chromatography B*, **745**, 39-48.
- Swain, K., Raje, N. ve Kayastha, S. (2000), "Preconcentration and determination of mercury in high arsenic," *Analytica chimica acta*, **405**, 297-301.
- Tang, H. A., Sheng, Y., Yang, R.D. (2003), "Synthesis, characterization, thermal constant and relaxation of galolinium(III), iron(III) and manganese(II) chelates of diethylenetriamine-bis-inositol-N,N',N''-triacetic acid," *Inorganic chemistry communication*, **6 (9)**, 1213-1216.
- Tuck, K.L. ve Hayball, P.J. (2002), "Major Phenolic Compounds in Olive Oil: Metabolism and Health Effects," *Journal of Nutritional Biochemistry*, **13**, 636-644.
- Tutour, B. ve Guedon, D. (1992), "Antioxidative activities of olea europaea leaves and related phenolic compounds," *Phytochemistry*, **31(4)**, 1173-78.

- Walter, W.M., Fleming, H.P. ve Etchells, J.L. (1973), "Preparation of antimicrobial compounds by hidrolisis of oleuropein from gren olives," *Appl microbiol*, **26**, 773- 76.
- Wulff, G., Grobe-Einsler, R., Vesper, W. ve Sahran, A. (1977), "Enzyme-analogue built polymers, 5. On the specificity distribution of chiral cavities prepared in synthetic polymers," *Makromol Chem.*, **178**, 2817-2825.
- Wulff, G. (2002), "Enzyme-like Catalysis by Molecularly Imprinted Polymers," *Chemical Reviews*, **102**, 1-25.
- Visioli, F. ve Galli, C. (1994), "Oleuropein protects low density lipoprotein oxidation," *Life Sci*, **55**, 1965-1971.
- Visioli, F. ve Bellomo, G. (1998), "Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols," *Bioc. And Biop*, **247**, 60-64.
- Vlatakis, G., Andersson, L.I., Müller, R. ve Mosbach, K. (1993), "Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting," *Nature*, **361**, 645–647.
- Yu, C. ve Mosbach, K. (1997), "molecular imprinting utilizing an amide functional group for hydrogen bonding leading to highly efficient polymer," *J.Org. chem.*, **62**, 4057-4064.
- Zarzuelo, A. (1991), "Vasodilator effect of olive leaf," *Planta Medica*, **57**, 417-419.
- Xie, C., Zhang, Z., Wang, D., Guan, G., Gao, D. ve Liu, J. (2006), "Surface Molecular Self-Assembly Strategy for TNT Imprinting of Polymer Nanowire/nanotube Arrays," *Anal. Chem.*, **78**, 8339-8346.
- Xie, C., Liu, B., Wang, Z., Gao, D., Guan, G. ve Zhang, Z. (2008), "Molecular Imprinting at Walls of Silica Nanotubes for TNT Recognition," *Anal. Chem.*, **80**, 437-443.
- Xu, X., Zhu, L. ve Chen, L. (2004), "Separation and screening of compounds of biological origin using molecularly imprinted polymers," *J. Chromatogr. B*, **804**, 61-69.