

**MANYETİK ÖZELLİĞE SAHİP MONODİSPERS-GÖZENEKLİ SİLİKA
MİKROKÜRELER ÜZERİNE BİYOMOLEKÜL BASKILAMA
YOLUYLA SORBENT SENTEZİ VE SORBENTİN SEÇİCİ
BİYOMOLEKÜL İZOLASYONUNDA KULLANIMI**

**SYNTHESIS OF A SORBENT VIA MOLECULAR IMPRINTING ONTO
MAGNETIC-MONODISPERSE-POROUS SILICA MICROSPHERES
AND ITS USAGE IN SELECTIVE BIOMOLECULE ISOLATION**

BENSU ALAN

PROF. DR. S. ALİ TUNCEL

Tez Danışmanı

DR. ÇİĞDEM KİP

Eş Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

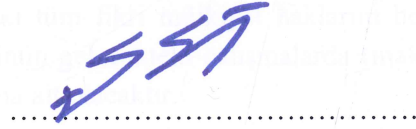
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2018

BENSU ALAN'ın hazırladığı ‘‘Manyetik Özelliğe Sahip Monodispers-Gözenekli Silika Mikroküreler Üzerine Biyomolekül Baskılama Yoluyla Sorbent Sentezi ve Sorbentin Seçici Biyomolekül İzolasyonunda Kullanımı’’ adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

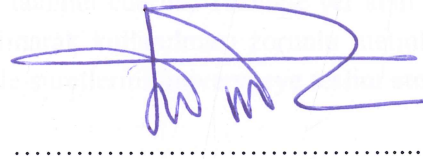
Prof. Dr. Yeşim SAĞ AÇIKEL

Başkan



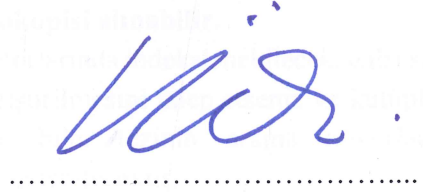
Prof. Dr. S. Ali TUNCEL

Danışman



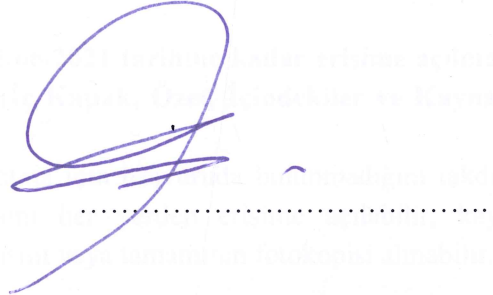
Doç. Dr. Selis ÖNEL

Üye



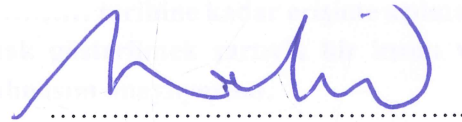
Doç. Dr. Dilek ÇÖKELİLER SERDAROĞLU

Üye



Doç. Dr. Halil Murat AYDIN

Üye



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

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

- Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**
(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)
- Tezimin/Raporumun 22/06/2021 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**
(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.)
- Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**
- Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

22/06/2018

Benu ALAN

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kullarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında,

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

beyan ederim.

22/06/2018

Bensu ALAN

ÖZET

MANYETİK ÖZELLİĞE SAHİP MONODİSPERS-GÖZENEKLİ SİLİKA MİKROKÜRELER ÜZERİNE BİYOMOLEKÜL BASKILAMA YOLUYLA SORBENT SENTEZİ VE SORBENTİN SEÇİCİ BİYOMOLEKÜL İZOLASYONUNDA KULLANIMI

Bensu ALAN

Yüksek Lisans, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. S. Ali TUNCEL

Eş Danışmanı: Dr. Çiğdem KİP

Haziran 2018, 68 Sayfa

Tez kapsamında, moleküler baskılama yoluyla biyomolekül izolasyonu için seçici sorbent sentezinde destek materyali olarak kullanılan monodispers-gözenekli silika mikroküreler, “çok basamaklı hidroliz/kondenzasyon yöntemi ile sentezlenmiştir. Manyetik formunun eldesi için, silika mikroküreler içerisine demir oksit nanopartiküller immobilize edilmiştir. Sonrasında her iki formdaki mikroküreler üzerine folik asit (FA) moleküler olarak baskılanmıştır. Moleküler baskılama sonrası sorbent yıkanarak baskılanan hedef molekül yapıdan uzaklaştırılmış ve elde edilen sorbentin hedef moleküle (FA) karşı seçici adsorpsiyon davranışı kesikli ve sürekli sistemde incelenmiştir. Kesikli sistemde manyetik ve manyetik formda olmayan moleküler baskılanmış mikroküreler (MMIP ve MIP) ve baskılanmamış mikroküreler (MNIP ve NIP) ile sorbent derişimi ve hedef molekül derişimi taramaları yapılarak, denge adsorpsiyon kapasitesi değerleri (Q) bulunmuş ve baskılama faktörleri (IF) belirlenmiştir. En uygun sorbent derişiminde MIP ve NIP için Q değerleri sırasıyla, 30.88 mg FA/g mikroküre ve 7.57 mg FA/g mikroküre olup IF değeri 4.08 olarak belirlenmiştir.

MMIP ve MNIP için ise Q değerleri sırasıyla, 48.19mg FA/g mikroküre ve 17.57mg FA/g mikroküre ve IF değeri ise 2.74 olarak tayin edilmiştir.

Seçicilik testi folik asitin benzer yapıdaki moleküllere kıyasla kesikli adsorpsiyon sisteminde daha yüksek IF değerine sahip olduğunu göstermiştir. Kesikli sistemde MIP ve MMIP sorbentlerinin tekrarlı formda kullanılabilir olduğu gösterilmiştir.

Mikrokürelerin boy dağılımı ve yüzey morfolojileri, taramalı elektron mikroskopundan (SEM) alınan görüntülerle belirlenmiş, moleküler baskılama sonrası mikroküreler üzerindeki polimerik yapının varlığı ise geçirimli elektron mikroskopundan (TEM) elde edilen görüntüler ile belirlenmiştir. Gözenek boyutu ve özgül yüzey alanları azot adsorpsiyon/desorpsiyon yöntemi (BET) ile tespit edilmiş olup, manyetik formdaki mikrokürelerin manyetik davranışları ise titreşimli örnek manyetometresi (VSM) ile tespit edilmiştir.

Sürekli sistemdeki adsorpsiyon davranışı incelendiğinde, MIP ve NIP içeren mikrokolonların sırasıyla 6 ve 3 dakikada doygunluğa ulaştığı görülmüştür. Sürekli sistem için yapılan tekrarlanabilirlik testi ile 4 döngü boyunca mikrokolonun tekrar kullanılabilir olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar, kesikli ve sürekli sistemin her ikisinin de folik asit izolasyonu için uygun olduğunu ve moleküler baskılama yöntemi ile FA ayrımının başarılı olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Monodispers-gözenekli silika, manyetik mikroküre, moleküler baskılama, sorbent, adsorpsiyon, folik asit.

ABSTRACT

SYNTHESIS OF A SORBENT VIA MOLECULAR IMPRINTING ONTO MAGNETIC-MONODISPERSE-POROUS SILICA MICROSPHERES AND ITS USAGE IN SELECTIVE BIOMOLECULE ISOLATION

Bensu ALAN

Master of Science, Department of Chemical Engineering

Supervisor: Prof. Dr. S. Ali TUNCEL

Co-Supervisor: Dr. Çiğdem KİP

June 2018, 68 Pages

In the scope of the thesis, monodisperse-porous silica microspheres used as support material for selective sorbent synthesis for biomolecule isolation by molecular imprinting were synthesized by multi-step hydrolysis / condensation method. For the magnetic form, iron oxide nanoparticles were immobilized in silica microspheres. Subsequently, folic acid (FA) was imprinted molecularly on the microspheres in both forms. After molecular imprinting, the sorbent was washed away and the imprinted target molecule was removed from the structure and the selective adsorption behavior of the obtained sorbent to target molecule (FA) was studied in a batch and continuous system. Equilibrium adsorption capacity values (Q) were found and imprinting factors (IF) were determined by scanning sorbent concentration and target molecule concentration with molecularly imprinted microspheres (MMIP and MIP) and unimprinted microspheres (MNIP and NIP) in magnetic and non-magnetic form in the batch system. At optimal sorbent concentration, the Q values for MIP and NIP were 30.88 mg FA/g microspheres and 7.57mg FA/g microspheres, respectively, and the IF value was 4.08.

For MMIP and MNIP, the Q values were determined as 48.19mg FA/g microspheres and 17.57mg FA/g microspheres, so the IF value was 2.74.

The selectivity test showed that folic acid had a higher IF value in the batch adsorption system than molecules of similar structure. It has been shown that MIP and MMIP sorbents can be used in a reusable form in a batch system.

The size distribution and surface morphologies of the microspheres were determined by scanning electron microscopy (SEM) images and the presence of the polymeric structure on the microspheres after molecular imprinting was determined by images obtained from the transmission electron microscope (TEM). Pore size and specific surface areas were determined by nitrogen adsorption / desorption method (BET) and the magnetic behaviors of microspheres in magnetic form were determined by vibrating sample magnetometer (VSM).

When the adsorption behavior of the continuous system was examined, it was observed that the microcolumns containing MIP and NIP reached saturation in 6 and 3 minutes, respectively. Reusability testing for the continuous system revealed that the microcolumn can be reused for 4 cycles. These results demonstrate that both the batch and the continuous system are suitable for folic acid isolation and FA assay is successful with molecular imprinting.

Keywords: Monodisperse-porous silica, magnetic microspheres, molecular imprinting, sorbent, adsorption, folic acid.

TEŞEKKÜR

Tez çalışması süresince; engin bilgilerini ve tecrübesini ortaya koyup, her geçen gün yeni bir şey öğrenmemi ve kendimi geliştirmemi sağlayan, beni öğrencisi olarak kabul ettiği ilk günden tezimi tamamladığım son güne kadar desteğini benden esirgemeyen tezimin yaratıcısı saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. S. Ali TUNCEL'e,

Danışmanlık yaptığı ilk öğrencisi olmaktan gurur duyduğum, tezim boyunca her ihtiyacım olduğunda yardımını benden eksik etmeyen, yeri gelip tatlı sert uyardığı zamanlarda bile her defasında yüzümü güldürebilen, başarılarına ve çalışkanlığına hayran olduğum değerli eş danışmanım Dr. Çiğdem KİP'e,

Birlikte çalışmasak da bana her zaman moral veren, güler yüzüyle enerjimi yükselten, hocam olduğu kadar ablam da olabilen, akademik hayatta idolüm diyebileceğim sevgili Dr. Özlem HAMALOĞLU'na,

Bu yola birlikte çıktığım, en tecrübesiz zamanlarımda hiç bıkmadan benimle tüm bilgisini paylaşan, her yüzüm düştüğünde bana cesaret verip sonunda gülmeme sebep olan ve en önemlisi bana her zaman labın prensesiymişim gibi davranan canım Ebru SAĞ'a,

Tez boyunca iyi kötü her anımda benimle aynı hisleri yaşayan, tüm zorlukları birlikte çekerken aynı zamanda tüm güzel anılarıma ortak olan, yüksek lisansın bana kazandırdığı yegâne dost, imprinting kardeşim Çağıl SÜNGÜ'ye,

Bölümdeki en büyük destekçilerim olup bu süreçte tüm nazımı çeken, beni dinlemekten ve bana moral vermekten hiç bıkmayıp hep yanımda olan canım dönem arkadaşlarım Anıl KUBAN'a ve tanıdığım en pozitif insan Fatma ÇAMBAY'a,

Yardımlarını ve desteklerini benden esirgemeyen, başta Eda ÖĞÜT olmak üzere tüm değerli SATLAB arkadaşlarıma ve tezimdeki katkısının hakkını ödeyemeyeceğim tatlı dilli ablam Belgin ASLAN'a,

Tezime verdiği hizmetler ile katkıda bulunup gösterdikleri güler yüz ve paylaştıkları bilgiler için sevgili UNAM ailesine,

Çalışkanlığına ve azmine her gün imrendiğim, bana verdiği cesaretle bu tezin başına oturmamı ve kısa zamanda bitirmemi sağlayan, tatlı arkadaşları ile birlikte bana her zaman destek olup kendimi yalnız hissetmeme fırsat vermeyen, bölüme her geldiğimde yüzümün gülme sebebi olup keşke daha önce tanışaymışım dediğim değerli Gökay ADALI'ya,

Dostluğunu her saniye hissettiren, bu süreçte iyi kötü yaşadığım tüm olayları benimle birlikte yaşayan, varlığına ihtiyacım olduğu her an düşünmeden yanıma koşan ve her geçen gün iyi ki var dediğim kız kardeşim Ceren SEYHAN'a,

Son olarak en büyük teşekkürü hak eden, beni her zaman doğru yola yönlendirip sevgi ve desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen, her koşulda arkamda olduklarını bildiğim ve varlıklarına her an şükrettiğim güç kaynağım canım ailem, sevgili annem Suna TEKİNER ve sevgili babam Tansu ALAN'a,

Tüm kalbimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELER	x
ŞEKİLLER	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Moleküler Baskılama	2
2.1.1. Moleküler Baskılama Yöntemi	2
2.1.2. Moleküler Baskılama Uygulamaları	4
2.1.2.1. Biyosensörler	5
2.1.2.2. Kromatografik Ayırma	6
2.1.2.2.1. Sıvı Kromatografisi	7
2.1.2.2.2. Afinite Kromatografisi	7
2.1.2.3. Katı Faz Ekstraksiyonu	8
2.1.2.4. İlaç Salımı	8
2.2. Silika Mikroküreler	9
2.2.1. Silika Mikrokürelerin Sentezi	10
2.2.2. Silika Mikrokürelerin Uygulama Alanları	11
2.3. Manyetik Silika Mikroküreler	11

2.3.1. Manyetik Silika Mikrokürelerin Uygulama Alanları	12
2.4.1. FA Yapısı ve Özellikleri.....	13
2.4.2. FA ile Moleküler Baskılama Çalışmaları	14
3. MATERYAL VE METOD	16
3.1. Biyomoleküllerin İzolasyonu için Moleküler Baskılama Yönteminde Kullanılacak Sorbentlerin Sentezi.....	17
3.1.1. Materyal.....	17
3.1.2. Çıkış Lateksi Olan Poli(GMA) Mikrokürelerin Sentezi.....	18
3.1.3. Monodispers-Gözenekli Polimerik Mikrokürelerin Sentezi.....	18
3.1.4. Monodispers-Gözenekli Silika Mikrokürelerin Sentezi	19
3.1.5. Monodispers-Gözenekli Manyetik Silika Mikrokürelerin Sentezi.....	19
3.2. Moleküler Baskılama Yöntemi ile Biyomolekül İzolasyonu	20
3.2.1. Materyal.....	20
3.2.2. Moleküler Baskılama Yöntemi.....	20
3.2.2.1. Silika Mikrokürelerin Moleküler Baskılama için Hazırlanması.....	20
3.2.2.2. Manyetik Silika Mikrokürelerin Moleküler Baskılama için Hazırlanması	21
3.2.2.3. Kesikli Sistemde Moleküler Baskılama	21
3.2.2.4. Kesikli Sistemde FA'in Adsorpsiyonu	22
3.2.2.5. Kesikli Sistemde Tekrar Kullanılabilirlik Testi	23
3.2.2.6. Kesikli Sistemde Seçicilik Testi.....	23
3.2.2.7. Sürekli Sistemde Moleküler Baskılama	24
3.2.2.8. Sürekli Sistemde FA Adsorpsiyonu	25
3.2.2.9. Sürekli Sistemde Basınç Testi	26
3.2.2.10. Sürekli Sistemde Tekrar Kullanılabilirlik Testi.....	26
3.3. Silika Bazlı Mikrokürelerin ve Moleküler Baskılanmış Mikrokürelerin Karakterizasyonu	27

3.3.1. Gözenek Boyutu ve Özgül Yüzey Alanı Ölçümü	27
3.3.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM).....	27
3.3.3. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM)	28
3.3.4. Titreşimli Örnek Manyetometresi (VSM)	29
3.3.5. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR-ATR).....	29
4.SONUÇLAR VE TARTIŞMA	31
4.1. Manyetik Olmayan ve Manyetik Formdaki Silika Mikroküreler ile Moleküler Baskılanmış Mikrokürelerin Karakterizasyonu	31
4.1.1. Silika Mikrokürelerin SEM Görüntüleri.....	31
4.1.2. Moleküler Baskılanmış Mikroküre (MIP)'lerin SEM Görüntüleri	32
4.1.3. Manyetik Silika Mikrokürelerin SEM Görüntüleri	33
4.1.4. Manyetik Formdaki Moleküler Baskılanmış Mikroküre (MMIP)'lerin SEM Görüntüleri	34
4.1.5. Silika Mikroküreler ile Moleküler Baskılanmış Mikroküre (MIP)'lerin TEM Görüntüleri	35
4.1.6. Manyetik Silika Mikroküreler ile Manyetik Formdaki Moleküler Baskılanmış Mikroküre (MMIP)'lerin TEM Görüntüleri	37
4.1.7. Mikrokürelerin Gözeneklilik Özellikleri	39
4.1.8. Manyetik Mikrokürelerin Manyetizasyonu	41
4.1.9. Manyetik Olmayan ve Manyetik Formdaki Moleküler Baskılanmış Silika Mikrokürelerin FTIR-ATR Spektrumları	42
4.1.10. Sürekli Sistemde Basınç Testi	44
4.2. Kesikli Sistemde Moleküler Baskılanmış ve Baskılanmamış Silika Mikroküreler ile FA Adsorpsiyonu	45
4.3. Kesikli Sistemde MMIP ve MNIP ile FA Adsorpsiyonu	47
4.4. Kesikli Sistemde Tekrar Kullanılabilirlik Testi	50

4.5. Kesikli Sistemde Seçicilik Testi	53
4.6. Sürekli Sistemde FA Adsorpsiyonu	56
4.7. Sürekli Sistemde Tekrar Kullanılabilirlik.....	57
5. GENEL SONUÇLAR	59
KAYNAKLAR.....	61

ÇİZELGELER

Sayfa

Çizelge 4.1. Silika mikrokürelerin EDX ile saptanan yüzey bileşimi.	36
Çizelge 4.2. Moleküler baskılanmış silika mikrokürelerin EDX ile saptanan yüzey bileşimi ..	36
Çizelge 4.3. Manyetik silika mikrokürelerin EDX ile saptanan yüzey bileşimi.	38
Çizelge 4.4. Moleküler baskılanmış manyetik silika mikrokürelerin EDX ile saptanan yüzey bileşimi.	38
Çizelge 4.5. Silika, moleküler baskılanmış silika ve moleküler baskılanmayan silika mikrokürelerin gözenek boyutu, hacmi ve özgül yüzey alanı değerleri.....	40
Çizelge 4.6. Kesikli sistemde MIP ve NIP için yapılan sorbent taraması sonucu bulunan moleküler baskılama faktörü değerleri.	45
Çizelge 4.7. Kesikli sistemde MIP ve NIP için yapılan FA başlangıç derişimi taraması sonucu bulunan moleküler baskılama faktörü değerleri.	47
Çizelge 4.8. Kesikli sistemde MMIP ve MNIP için yapılan sorbent derişimi taraması sonucu bulunan moleküler baskılama faktörü değerleri.	48
Çizelge 4.9. Kesikli sistemde MMIP ve MNIP için yapılan FA başlangıç derişimi taraması sonucu bulunan moleküler baskılama faktörü değerleri.	50
Çizelge 4.10. Kesikli sistemde MIP ve NIP için yapılan tekrar kullanılabilirlik testi sonucu hesaplanan baskılama faktörü değerleri	51
Çizelge 4.11. Kesikli sistemde MMIP ve MNIP için yapılan tekrar kullanılabilirlik testi sonucu hesaplanan baskılama faktörü değerleri.	52
Çizelge 4.12. Kesikli sistemde MIP ve NIP için yapılan seçicilik testi sonucu hesaplanan baskılama faktörü değerleri.	54
Çizelge 4.13. Kesikli sistemde MMIP ve MNIP için yapılan seçicilik testi sonucu hesaplanan baskılama faktörü değerleri.	55
Çizelge 4.14. Literatürdeki folik asit baskılama çalışmalarının IF değerleri	56

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 2.1. Moleküler baskılama yönteminin genel şeması [8].....	2
Şekil 2.2. FA'in yapısı [66].....	14
Şekil 3.1. Deneysel Tasarımın Genel Şeması.....	17
Şekil 3.2. FA'e benzer yapıdaki biyomoleküller	24
Şekil 3.3. FA izolasyonu için geliştirilen sürekli mikroakış sistemi : (A) Sürekli mikroakış sisteminin genel görünümü, (B) Sürekli mikroakış sisteminde kullanılan dolgulu kolonun enjektöre bağlanması, (C) Dolgulu mikrokolonun görünümü.	25
Şekil 3.4. Taramalı elektron mikroskopu (SEM)	28
Şekil 3.5. Geçirimli elektron mikroskopu (TEM)	29
Şekil 4.1. Monodispers-gözenekli silika mikrokürelerin SEM görüntüleri. Büyütme oranı: (A) 80000X, (B) 38905X, (C) 21526X, (D) 2000X.....	31
Şekil 4.2. Moleküler baskılanmış silika mikrokürelerin SEM görüntüleri. Büyütme oranı: (A) 68327X, (B) 38905X, (C) 20182X, (D) 2500X.	32
Şekil 4.3. Monodispers-gözenekli manyetik silika mikrokürelerin SEM görüntüleri. Büyütme oranı: (A) 65430X, (B) 33636X, (C) 16818X, (D) 2000X.	33
Şekil 4.4. Manyetik formdaki moleküler baskılanmış mikrokürelerin SEM görüntüleri. Büyütme oranı: (A) 50000X, (B) 25000X, (C) 12691X, (D) 1000X.	34
Şekil 4.5. Silika mikroküreler ile moleküler baskılanmış mikrokürelerin TEM görüntüleri. (A) Silika mikroküre (B) Moleküler baskılanmış mikroküre	35
Şekil 4.6. Moleküler baskılanmış silika mikrokürelerin EDX spektrum görüntüsü.....	36
Şekil 4.7. Manyetik silika mikroküreler ile moleküler baskılanmış manyetik silika mikrokürelerin TEM görüntüleri. (A) Manyetik silika mikroküre (B) Moleküler baskılanmış manyetik silika mikroküre	37
Şekil 4.8. Moleküler baskılanmış manyetik silika mikrokürelerin EDX spektrum görüntüsü..	39
Şekil 4.9. Silika, moleküler baskılanmış silika ve moleküler baskılanmayan silika mikrokürelerin azot adsorpsiyon/desorpsiyon yöntemi ile elde edilen gözenek boy dağılım eğrileri.....	40

Şekil 4.10. Moleküler baskılanmış manyetik mikroküreler (MMIP), moleküler baskılanmamış manyetik mikroküreler (MNIP), manyetik silika (Mag-SiO ₂) ve TMSPM bağlı manyetik silika (TMSPM@Mag-SiO ₂) mikrokürelerin titreşimli örnek manyetometresi ile elde edilen manyetizasyon eğrileri.....	41
Şekil 4.11. Moleküler baskılanmış silika mikrokürelerin FTIR-ATR spektrumları. (A) Moleküler baskılanmış, FA içeren silika mikroküreler (MIP-FA), (B) Moleküler baskılanmış, FA içermeyen silika mikroküreler (MIP).	42
Şekil 4.12. Moleküler baskılanmış manyetik silika mikrokürelerin FTIR-ATR spektrumları. (A) Moleküler baskılanmış, FA içeren manyetik silika mikroküreler (MMIP-FA), (B) Moleküler baskılanmış, FA içermeyen manyetik silika mikroküreler (MMIP).	43
Şekil 4.13. Sürekli sistemde basınç testi. Kolon boyutları: 300 mm iç çap, Uzunluk: 500 mm. Hareketli faz: % 10 asetik asit + % 10 SDS + su.	44
Şekil 4.14. Kesikli sistemde MIP ve NIP için sorbent taraması. Koşullar: Adsorpsiyon hacmi: 4ml, FA derişimi: 1mg/ml, Süre: 2 saat, Oda sıcaklığı, Karıştırma hızı: 100rpm.....	45
Şekil 4.15. Kesikli sistemde MIP ve NIP için FA başlangıç derişimi taraması. Koşullar: Adsorpsiyon hacmi: 4ml, Sorbent miktarı: 5mg, Süre: 2 saat, Oda sıcaklığı, Karıştırma hızı: 100rpm.....	46
Şekil 4.16. Kesikli sistemde MMIP ve MNIP için sorbent miktarının değiştirilmesi ile FA denge adsorpsiyonunun değişimi. Koşullar: Adsorpsiyon hacmi: 4ml, FA başlangıç derişimi: 1mg/ml, Süre: 2 saat, Oda sıcaklığı, Karıştırma hızı: 100rpm.....	48
Şekil 4.17. Kesikli sistemde MMIP ve MNIP için FA başlangıç derişimi taraması. Koşullar: Adsorpsiyon hacmi: 4ml, Sorbent miktarı: 5mg, Süre: 2 saat, Oda sıcaklığı, Karıştırma hızı: 100rpm.....	49
Şekil 4.18. Kesikli sistemde MIP ve NIP için tekrar kullanılabilirlik testi. Koşullar: Adsorpsiyon hacmi: 4ml, FA başlangıç derişimi: 1mg/ml, Sorbent miktarı: 5mg, Süre: 2 saat, Oda sıcaklığı, Karıştırma hızı: 100rpm.	51
Şekil 4.19. Kesikli sistemde MMIP ve MNIP için tekrar kullanılabilirlik testi. Koşullar: Adsorpsiyon hacmi: 4ml, FA başlangıç derişimi: 1mg/ml, Sorbent miktarı: 5mg, Süre: 2 saat, Oda sıcaklığı, Karıştırma hızı: 100rpm.	52

Şekil 4.20. Kesikli sistemde MIP ve NIP için seçicilik testi. Koşullar: Adsorpsiyon hacmi: 4ml, Hedef molekül başlangıç derişimi: 1mg/mL, Sorbent miktarı: 5mg, Süre: 2 saat, Oda sıcaklığı, Karıştırma hızı: 100rpm.	53
Şekil 4.21. Kesikli sistemde MMIP ve MNIP için seçicilik testi. Koşullar: Adsorpsiyon hacmi: 4ml, Hedef molekül başlangıç derişimi: 1mg/ml, Sorbent miktarı: 5mg, Süre: 2 saat, Oda sıcaklığı, Karıştırma hızı: 100rpm.	55
Şekil 4.22. Sürekli sistemde zamana karşı C_{FA}/C_{FA0} değişimi. Kolon uzunluğu: 10cm, Koşullar: Adsorpsiyon Ortamı: 20mM PB tamponu, FA başlangıç derişimi: 0.05mg/mL, Akış hızı: 0.002ml/dak, Süre: 15 dak, Oda sıcaklığı.....	57
Şekil 4.23. Sürekli sistemde tekrar kullanılabilirlik testi. Kolon uzunluğu: 10cm, Koşullar: Adsorpsiyon, Ortam: 20mM PB tamponu, FA başlangıç derişimi: 0.05mg/ml, Akış hızı: 0.002ml/dak, Süre: 15 dak, Oda sıcaklığı. Desorpsiyon ortamı: Su (%10 astetik asit + %10 SDS)	57
Şekil 4.24. Sürekli sistemde tekrar kullanılabilirlik testi sonuçları	58

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

μm	Mikrometre
nm	Nanometre
mL	Mililitre
μL	Mikrolitre
l	Litre
mg	Miligram
g	Gram
cpm	Dakikada çalkalama hızı (Circulation per minute)
rpm	Dakikada dönme hızı (Rate per minute)
D_n	Sayıca ortalama çap değeri
D_i	Partikül çap değeri
N_i	D_i çap değerine sahip partiküllerin sayısı
N_T	Toplam partikül sayısı
CV	Boy dağılımı için değişim katsayısı
θ	FA adsorpsiyon verimi (%)
M_{FA}	FA miktarı (ng)
Q_A	Adsorpsiyon ortamı akış hızı ($\mu\text{L}/\text{dak}$)
t	Adsorpsiyon ortamı akış süresi (dak)
V_A	Adsorpsiyon sırasında toplanan örneğin hacmi (μL)
C_A	Adsorpsiyon sırasında toplanan örneğin FA derişimi ($\text{mg}/\mu\text{L}$)
Q	Denge adsorpsiyon kapasitesi
C_0	Adsorpsiyon ortamındaki FA başlangıç derişimi (mg/mL)
C_f	Adsorpsiyon ortamındaki FA sonuç derişimi (mg/mL)
V	Adsorpsiyon ortamının hacmi (mL)
W	Sorbentin ağırlığı (g)
IF	Baskılanma faktörü
Q_{MIP}	Moleküler baskılanmış mikrokürelerin bağlanma kapasitesi (mg/g)
Q_{NIP}	Moleküler baskılanmamış mikrokürelerin bağlanma kapasitesi (mg/g)

Kısaltmalar

FA	Folik asit
MIT	Moleküler Baskılama Teknolojisi
MIP	Moleküler baskılanmış mikroküre
NIP	Moleküler baskılanmamış mikroküre
MMIP	Moleküler baskılanmış manyetik mikroküre
MNIP	Moleküler baskılanmamış manyetik mikroküre
GMA	Glisidil metakrilat
MAA	Metakrilik asit
EDMA	Etilen glikol dimetakrilat
TEOS	Tetraetoksisilan
TBAI	Tetrabütülamonyum iyodat
CTAB	Asetiltrimetilamonyum bromür
PVP-K30	Poli(vinil piroolidon)
PVA	Poli(vinil alkol)
SDS	Soydum dodesil sülfat
THF	Tetrahidrofur
AIBN	2,2'-azobisisobütironitril
BPO	Benzoil peroksit
VIm	1-Vinilimidazol
DMF	N,N Dimetilformamid
TMSPM	3-Trimetoksisililpropil metakrilat
TEA	Trietilamin
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu (Transmission Electron Microscope)
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope)
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)
VSM	Titreşimli Örnek Manyetometresi (Vibrating Sample Magnetometer)
BET	Brunauer-Emmett-Teller
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
LC	Sıvı Kromatografisi

1. GİRİŞ

Moleküler baskılama, son yıllarda özellikle biyomoleküllerin seçici izolasyonunda yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir. Yöntemde hedef molekül etrafında silika veya polimer bazlı bir katman oluşturularak, hedef molekülün oluşturulan katman içerisinde moleküler kalıbı alınmaktadır. Baskılanan hedef molekül daha sonra sorbent üzerinden desorbe edilerek moleküler boşluklara sahip sorbentler elde edilmektedir [1-3].

Moleküler baskılama yöntemi, seçicilik özelliği, yüksek termal kararlılığı, yüksek basınç altında dayanıklı olması, kolay sentezlenebilirliği, tekrar kullanılabilirliği ve düşük maliyetli olması gibi önemli özellikleri sebebiyle kromatografik çalışmalar, katı faz ekstraksiyonu, ilaç salımı gibi birçok popüler alanda tercih edilen bir yöntem haline gelmiştir [4,5].

Tez kapsamında hedef molekül olarak kullanılacak olan folik asit (FA), suda çözünen B9 vitamini'dir. Nükleik asitlerin yapımında rol alan önemli bir bileşendir. Vücutta düşük miktarda bulunması halinde Alzheimer hastalığı, karaciğer, pankreas, deri hastalıkları olasılığı artar. Bundan dolayı, FA miktarının doğru ve hızlı bir şekilde ölçülmesi oldukça önemlidir [6]. Biyolojik sistemlerde düşük derişimde olması, asidik koşullarda düşük kararlılığı, ışığa ve sıcaklığa duyarlılığı gibi sebeplerden dolayı FA analizi kolay yapılamamaktadır. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), sıvı kromatografisi (LC), spektrofotometri gibi birçok yöntemle FA analizi yapılabilmesine rağmen bu yöntemler zaman alıcı ve zor olarak nitelendirilmektedir [7].

Tez çalışmasında, moleküler baskılama yöntemi ile FA'in seçici şekilde izole edilebilmesinin yanında, hızlı, kolay ve ucuz bir şekilde miktar tayininin yapılabilmesi hedeflenmiştir. Bu amaç doğrultusunda öncelikle monodispers-gözenekli polimerik mikroküreler, "çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu" yöntemi ile sentezlenmiştir. Sonrasında folik asit izolasyonunda destek materyali olarak kullanılmak üzere normal ve manyetik formda monodispers-gözenekli silika mikroküreler, "çok basamaklı hidroliz/kondenzasyon yöntemi" ile elde edilmiştir. Takiben moleküler baskılama yoluyla normal ve manyetik sorbentlerin sentezi yapılarak, kesikli ve sürekli sistemde sentezlenen sorbentlerin FA'ya karşı seçici adsorpsiyon davranışları incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Moleküler Baskılama

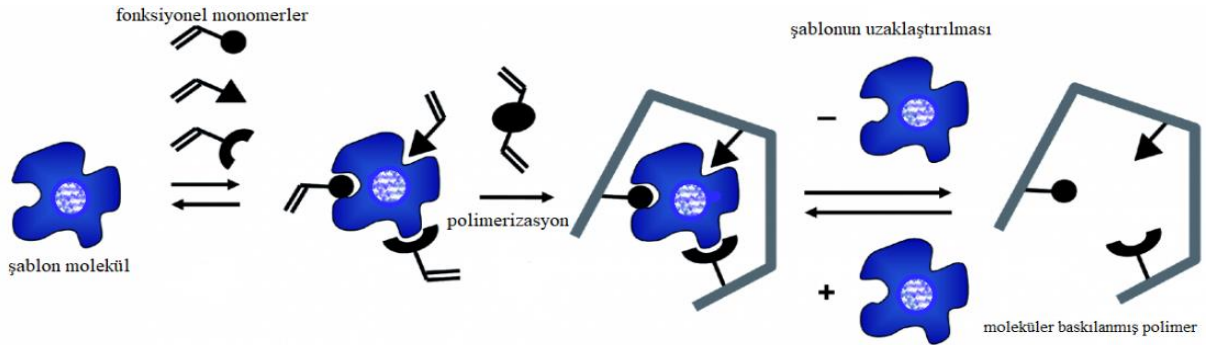
Moleküler baskılama, tanıma bölgesini kolaylaştırmak için bir şablonun kullanıldığı, bu şablonların şekline, büyüklüğüne ve fonksiyonel gruplarına ait belleğe sahip bağlantı bölgelerinin oluşturulması için uygulanan bir yöntemdir.

1930'lu yıllarda Polyakov'un silika matrisleri kullanarak hazırladığı moleküler baskılanmış malzemelerin tasarımı, hazırlanması, karakterizasyonu ve uygulaması üzerine yaptığı çalışmalar moleküler baskılama teknolojisinin gelişmesini sağlamış ve bilim insanlarının ilgisini çekmiştir. 1990'lı yılların sonuna doğru moleküler baskılama üzerine yapılan çalışmalar ile ilgili makale sayısı ve yapılan atıflar hızlı bir şekilde artmaya başlamıştır [1-3].

Biyolojik molekülleri tanımlamak için UV-görünür bölge spektrofotometri, sıvı kromatografisi ve gaz kromatografisi, kütle spektrometresi gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler duyarlı ve özgül olmasına rağmen, genellikle zaman alıcıdır veya karmaşık ve pahalı araçlar gerektirir. Yapının öngörülebilirliği ve evrensel uygulanabilirliği açısından moleküler baskılı sorbentler başlıca özellikleri olan seçicilikleri, yüksek termal kararlılıkları, kolay sentezlenmesi, dayanıklılıkları ve düşük maliyetleri sayesinde katı faz ekstraksiyonu, saflaştırma ve ayırma, kromatografik ayırma kemosensör – biyosensörler, ilaç salınımı gibi birçok alanda cazip hale gelmiştir [4,5].

2.1.1. Moleküler Baskılama Yöntemi

Moleküler Baskılama Teknolojisi (MIT), bir şablon ve fonksiyonel bir monomer arasındaki kompleksin oluşumuna dayanır. Moleküler baskılama işlemi, çoğunlukla fonksiyonel monomer ve çapraz bağlayıcının hedef molekül varlığında polimerizasyonunu içerir [8].



Şekil 2.1. Moleküler baskılama yönteminin genel şeması [8]

İdeal şablon molekülü üç gereksinimi karşılamalıdır: polimerizasyonu önlemeyen fonksiyonel gruplar içermelidir, polimerizasyon reaksiyonu sırasında yüksek kimyasal kararlılık sergilemelidir ve fonksiyonel monomerlerle kompleks oluşturabilen fonksiyonel gruplar içermelidir [5]. Fonksiyonel monomerin rolü, fonksiyonel gruplar sağlayarak şablonla bir ön polimerizasyon kompleksi oluşturmaktır. Bu nedenle, şablonla kuvvetli bir şekilde etkileşebilen ve polimerizasyondan önce spesifik donör-reseptör veya antikör-antijen kompleksleri oluşturabilen uygun bir fonksiyonel monomerin seçilmesi önemlidir. Metakrilik asit (MAA), hidrojen bağ verici ve alıcı özellikleri nedeniyle en yaygın olarak kullanılan fonksiyonel monomerdir. Moleküler baskılama etkisini arttırmasının yanında, yüksek molar fraksiyonları sayesinde polimerlerin adsorpsiyon kapasitesini arttırdığı görülmüştür [9]. Polimerizasyon işleminde, şablon moleküllerin etrafındaki fonksiyonel monomerleri sabitlemek için bir çapraz bağlayıcı kullanılır, böylece şablonların çıkarılmasından sonra bile çapraz bağlanmış bir katı polimer oluşturulur. Çapraz bağlayıcının türü ve miktarı, moleküler baskılanmış polimerlerin (MIP) seçicilik ve adsorpsiyon kapasitesi üzerinde önemli etkilere sahiptir. Az miktarda çapraz bağlayıcı kullanıldığında düşük çapraz bağlama derecesi nedeniyle kararsız mekanik özellikler görülürken, yüksek miktarda çapraz bağlayıcı varlığında ise MIP birim kütlesi başına tanıma alanlarının sayısının azaldığı görülür [8]. Gözenek yapıcı çözücülerin polaritesi, şablon molekülü ile fonksiyonel monomer arasındaki etkileşimi belirler ve MIP adsorpsiyon özelliklerini etkileyebilir.

Moleküler baskılama prosesi; şablonun, fonksiyonel monomerin, çapraz bağlayıcının ve başlatıcının bir gözenek yapıcı çözücü içinde çözünmesiyle başlar. Fonksiyonel monomerler, moleküler tanıma başarısı için kararlı bir şablon-monomer kompleksinin oluşumu temel teşkil ettiğinden, şablon molekülü ile etkileşime girebilecek şekilde seçilir. Monomerler, şablonun etrafında konumlandırılarak çapraz bağlayıcı monomerler ile kopolimerizasyon ile sabitlenir. Sonrasında, şablon moleküllerinin polimerden çözücü ile yıkanarak uzaklaştırılması, şablona şekil olarak tamamlayıcı olan bağlanma bölgelerini bırakır. Sonuç olarak ortaya çıkan polimer, seçici olarak şablon moleküllerini tanıır ve kendine bağlar. Bağlanma bölgeleri, polimerizasyon sırasında kurulan etkileşimlere bağlı olarak farklı özellikler göstermektedir. Genel olarak, moleküler baskılama, polimerizasyon sırasında monomer ve şablon arasındaki etkileşimin doğasına göre sınıflandırılır [10,11]. MIP üretmek için kovalent ve non-kovalent baskılama olmak üzere iki ana yöntem vardır.

Bu yöntemler, şablon ve fonksiyonel monomer arasındaki etkileşimlere dayanır. Kovalent baskılama, fonksiyonel monomer kalıntılarının sadece baskılı boşluklarda mevcut olmasını sağlar. Özellikle borat esterleri [12], ketalleri/asetalleri [13] içeren tersinir kondenzasyon reaksiyonlarında kullanılan tipik bir yöntemdir. Bu yöntemde şablonlar, kovalent bağlarla uygun monomere bağlanır. Polimerizasyondan sonra kovalent bağ bozulur ve şablon polimerden çıkarılır. Molekül, MIP tarafından yeniden bağlanarak aynı kovalent bağ yeniden oluşturulur. Kovalent bağların yüksek stabilitesi sayesinde kovalent baskılama yöntemi daha homojen bir bağlanma alanı dağılımı sağlar. Ancak kovalent baskılama yönteminde, tersinir kondenzasyon reaksiyonları sınırlı olduğundan daha az esnek bir yöntem olarak kabul edilir. Ayrıca, güçlü kovalent etkileşimlerinin yavaş bağlanması ve ayrışması özelliği yüzünden termodinamik dengeye ulaşmak çok zordur [3,4]. Aksine, non-kovalent baskılamanın böyle bir kısıtlaması yoktur. Non-kovalent baskılama yöntemi ise uygun bir çözücüde şablon-monomer komplekslerinin iyonik etkileşimler, hidrojen bağlanması, van der Waals kuvvetleri ve π - π etkileşimleri gibi çeşitli etkileşimlere dayanarak oluşturulmasına imkan verir. Polimerizasyondan ve şablonun çıkarılmasından sonra, işlevselleştirilmiş polimerik matris, aynı kovalent olmayan etkileşimler vasıtasıyla hedefe (şablona) tekrar bağlanır. Yaygın olarak görülen en güçlü etkileşim, polarize olmayan çözücüler içindeki metakrilik asit (MAA) grupları ve birincil aminler arasında oluşan hidrojen bağıdır [14].

Son zamanlarda, non-kovalent baskılama, yöntemin basitliği, bağlanma ve çıkarmanın hızlı olması nedeniyle en popüler ve genel sentez stratejisi haline gelmiştir. Diğer bir yandan bu yöntem, kompleksi bir arada tutan etkileşimlerin az da olsa bozulmasına duyarlıdır ve bu nedenle çok sağlam değildir. Hedef molekül ile hızlı etkileşim sağlamak için, semi-kovalent baskılama denilen yeni bir yöntem ortaya çıkmıştır. Bu yöntem, şablonun fonksiyonel monomere kovalent olarak bağlandığı bir alternatif sunar, ancak şablonun yeniden bağlanması non-kovalent etkileşimlere dayanır [5].

2.1.2. Moleküler Baskılama Uygulamaları

Moleküler baskılanmış mikroküreler kendine özgü özellikleri, onları kromatografik ayırma bilimleri, arıtma, biyomolekül izolasyonu, katı faz ekstraksiyonu, sensörler ve biyosensörler, kataliz, ilaç salımı gibi farklı uygulama alanları için önemli bir alternatif yapı haline getirmiştir. Moleküler baskılanmış mikrokürelerin en kapsamlı olarak incelenen uygulama alanlarından biri kromatografik ayırma yöntemidir.

Bu yöntem, istenilen seçicilik özelliği olan destek materyallerinin hazırlanmasına izin verir [15]. Moleküler baskılanmış mikroküreler ayrıca, katı faz ekstraksiyonu (SPE) prosedürleri için yeni seçici sorbentler olarak ortaya çıkmıştır, bu da sadece örneklerin ön-derişimi ve temizlenmesine değil, aynı zamanda kompleks analitlerden hedef analitlerin seçici ekstraksiyonuna da izin vermektedir. Moleküler baskılanmış mikroküreler doğal antikorların yapay bağlanma taklitleri olarak da kullanılmış ve bağışıklık analizlerinde tanıma öğeleri olarak yer aldığı birçok çalışmada görülmüştür [16]. Moleküler baskılanmış mikrokürelerin bazı reaksiyonları katalizlemeleri konusunda da önemli araştırmalar yapılmıştır. Katalitik özelliklere sahip moleküler baskılanmış mikroküreler, doğal enzimlerin taklitleri olarak kabul edilebilir ve enzim benzeri katalizde kullanılabilirler [17]. Diğer bir uygulama alanı ise medikal tedavilerdir. Moleküler baskılanmış mikrokürelerin biyoaktif molekülleri belirli koşullarda bağlayabilme yeteneği, MIT'ni uygun dozaj formları oluşturmak için büyük bir potansiyel haline getirmektedir. Moleküler baskılanmanın bu uygulamalar üzerinde, yüksek stabilitesi, kolay uygulanabilir olması, sağlamlığı ve düşük maliyetli olması gibi birçok avantajı vardır. Bunun yanında şablon sızıntısı, düşük bağlama kapasitesi ve yavaş kütle transferi gibi birçok problemleri bu sistemlerde görülmektedir.

2.1.2.1. Biyosensörler

Biyosensör, biyolojik veya biyolojik olarak türetilmiş algılama elemanına sahip bir analitik cihaz olarak tanımlanabilir. Teşhis, çevresel izleme ve gıda süreçlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır [18,19]. Bir biyosensörü diğer sensörlerden ayıran şey, karmaşık bir karışımdaki bir bileşenle seçici olarak etkileşim kurma kabiliyetine sahip olmasıdır. Bir biyosensör, kullandığı biyolojik tanıma molekülünün tipine veya dönüştürme mekanizmasının tipine göre sınıflandırılabilir. Genel olarak, katalitik veya afinite bazlı biyosensörler olarak da tanımlanabilirler. Biyosensörlerin, özel bir hedef molekülü tanıyabilen mikrop, antikor veya enzim gibi çeşitli biyolojik molekülleri kullanabilmeleri gibi avantajı varken, bazı zorlukları da bulunmaktadır. Önemli sorunların çoğu, biyosensörün kalbinde bulunan biyolojik makro molekülün fiziksel ve kimyasal özelliklerine doğrudan bağlıdır. Özellikle, öngörülemez raf ömrü ve kararlılık, kötü kümeler arası tekrarlanabilirlik ve kullanılabilirlik, biyomoleküllerin sensör platformlarına dahil edilmesindeki zorluklar, çevresel faktörler (pH, sıcaklık, iyonik güç, organik çözücüler) bunlara örnektir.

Moleküler baskılama, bu önemli sorunların bir kısmını çözebilecek bir teknolojidir. Moleküler baskılanmış mikroküreler, antikörlerin ve enzimlerin polimerik taklitleridir. Kararlı, sağlam, tekrarlanabilir ve üretilebilir mikrokürelerdir. Spesifik tanıma ve katalitik hacimlerin oluşumuna izin veren moleküler baskılama tekniği, çok çeşitli moleküller için özel bağlanma bölgeleri olan polimerlerin üretiminde yaygın bir şekilde kullanılmıştır [20-25]. Moleküler baskılanmış polimer-bazlı tanıma elemanları, tabakalar ya da ince filmler olarak dönüştürücü platformu üzerine biriktirme ya da aşılama yoluyla da hazırlanmıştır. Dönüştürücü üzerine yerleştirilen filmin kalınlığı, sensörün kısa zamanda cevap vermesi için önemlidir [26,27]. Bu yöntem öncelikle akustik [28] ve optik [29] dönüştürücüler ile ve daha sonra elektrokimyasal sensörler [30] ile kullanılmıştır. Diğer bir araştırmada, biyolojik sıvılarda parasetamol ve nikotin miktarını belirlemek amacıyla moleküler baskılanmış polimer kaplı sensörler oluşturulmuştur. Bu durumda, piezoelektrik kuvarz kristal yüzeyi, algılama malzemesi olarak bir parasetamol baskılı polimer kullanılarak Bulk Akustik Dalga (BAW) sensörü için seçicilik elde etmek amacıyla modifiye edilmiştir.

Kinetik empedans analizinde, tespit sırasında polimer kaplamanın viskoelastisitesinde hiçbir değişiklik görülmemiş, parasetamolün insan serum ve idrarında tanınmasında tatmin edici sonuçlar elde edilmiştir [31,32]. Bunlar gibi birçok çalışmada sensörler için moleküler baskılanmış mikroküreler kullanılmakta ve her geçen gün araştırmalar geliştirilmektedir.

2.1.2.2. Kromatografik Ayırma

Birçok uygulama alanının yanı sıra, moleküler baskılanmış mikroküreler yüksek çekim kuvveti ve seçiciliğe sahip olmaları nedeniyle dolgu malzemeleri ve monolitik kolon malzemeleri olarak yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) [33], kılcal elektrokromatografi (CEC) [34], sıvı kromatografisi (LC) [35] ve ince tabaka kromatografisi (TLC) gibi kromatografi tekniklerinde durağan fazlar olarak da kullanılırlar. Dolgu malzemeleri olarak moleküler baskılanmış mikroküreler, bir kromatografi kolonuna doldurulur ve şablon analitlerinin ayrılması için kromatografinin sabit fazı olarak kullanılır. Yaygın olarak kullanılan yığın polimerizasyon teknolojisi ile, moleküler baskılanmış monolitler sentezlenebilir [36]. Mikroküre içeren kolonlarla karşılaştırıldığında monolitik kolon, kolay şekilde hazırlanan bir sabit faz olarak kabul edilir. Son yıllarda, monolitik moleküler baskılama popüler bir konu haline gelmiş, monolitik kolon ve baskılama teknolojisinin avantajlarını birleştiren sabit fazların hazırlanması için yeni bir yöntem oluşturmuştur.

Bu yöntemde monolitik formda baskılanan polimerler, doğrudan paslanmaz çelik kolonlar veya kılcal kolonlar içinde basit bir işlemle, hazırlanır. Şimdiye kadar, monolitik formda baskılanan polimerler, kolay hazırlanma, yüksek tekrarlanabilirlik, geniş yüzey alanı, düşük ters basınç ve hızlı kütle aktarımı kolaylıkları nedeniyle yaygın fazlar olarak kullanılmıştır [37]. Özetle, moleküler baskılanmış mikrokürelerin, ön kolon ve monolitik kolon olmak üzere iki şekilde de kromatografide sabit fazlar olarak kullanıldığını görebiliriz. Her ikisi de, çevresel, gıda, biyolojik ve tıbbi alanlarda analitlerin ayrılması için yaygın olarak kullanılmıştır.

2.1.2.2.1. Sıvı Kromatografisi

Sıvı kromatografisi, bir örneği kendi bileşenlerine ayırmak için kullanılan bir tekniktir. Bu ayırım, örneğin mobil ve sabit fazlarla etkileşimlerine dayanarak gerçekleşir. Bir karışımı ayırırken kullanılacak birçok sabit/hareketli faz kombinasyonu olduğu için, bu fazların fiziksel durumlarına göre tanımlanan farklı kromatografi türleri vardır. Genel olarak sıvı kromatografisinde bir karışım içindeki bileşenler, her bir bileşenin mobil faza olan ilgisine dayalı olarak bir kolonda ayrılır.

Moleküler baskılanmış mikrokürelerin sıvı kromatografisi (LC) için sabit fazlar olarak kullanılması, şimdiye kadar baskılı mikrokürelerin en çok çalışılan uygulamasıdır [38,39].

2.1.2.2.2 Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisi, bir örnekteki spesifik analitlerin ayrılması ve analizi için bir "biyolojik etkileşim" kullanan sıvı kromatografisi olarak tanımlanır. Genellikle ilaç bilimi ve biyoteknoloji gibi alanlarda sıklıkla tercih edilen ayırma yöntemidir. Biyolojik etkileşimler genellikle bir enzim ile inhibitör veya bir antikor ile antijenin bağlanmasıyla olmaktadır [40]. Bu yöntemde sabit faza bağlı bir afinite ligandı, istenen analit ile etkileşime girer ve bu etkileşimin derecesine bağlı olarak kromatografik kolonda ayırma işlemi gerçekleşir. Immobilize ligand, herhangi bir afinite kromatografisi yönteminin başarısını belirleyen temel faktördür. Afinite kromatografisi için kullanılan ligandların çoğu biyolojik kökenlidir. Bunun yanı sıra yıllar boyunca, biyolojik olmayan ligandlar (boronatlar, immobilize metal iyon kompleksleri, sentetik boyalar gibi) yaygın olarak kullanılır. Afinite kromatografisinde kolonda kullanılan desteğin tipi önemli rol oynar. Düşük performanslı afinite kromatografisinde genellikle agaroz, dekstran veya selüloz gibi büyük gözenekli jeller kullanılmaktadır. Yüksek performanslı afinite kromatografisinde (HPAC) ise destek, akış hızına ve basınca dayanabilen silika veya sentetik polimer bazlı parçacıklardır.

Hem düşük hem de yüksek performanslı afinite kromatografisi klinik yöntemlerde kullanılmıştır. Düşük performanslı afinite kromatografisi yaygın olarak örnek ekstraksiyonu ve ön-etkileşim için kullanılır, çünkü kullanımı kolay ve ucuzdur. Bununla birlikte, yüksek performanslı afinite desteklerinin daha iyi akış ve basınç kararlılığı, HPAC'ın enstrümental sistemlere dahil edilmesini kolaylaştırır ve bu da analitlerin otomatik olarak ölçülmesi için daha iyi hız ve hassasiyet sağlamaktadır [41,42].

2.1.2.3 Katı Faz Ekstraksiyonu

Katı Faz Ekstraksiyonu (SPE), analitik kimyada moleküler baskılanmış mikrokürelerin önemli bir uygulama alanıdır. Seçici sorbent materyaller olarak kullanılan moleküler baskılanmış mikroküreler, sürekli kullanımda bir HPLC ön kolonu ve kesikli kullanımda ise iki frit arasında bir kartuşta sabitlenebilir. Sürekli MISPE prosedürü, örneklerin manipülasyonunu en aza indirerek ve analitlerin kaybını ve kirlenme riskini azaltarak HPLC gibi analitik sistemler ile doğrudan birleştirilir [43-45]. Ayrıca bu yöntem, örneklerin ön-muamele sürelerini önemli ölçüde azaltır. Bu avantajlara rağmen, sürekli MISPE yöntemi, sadeliği için en çok kullanılan yöntemdir.

MISPE prosedürü dört ana işlemi kapsar. Bunlar sırasıyla; sorbentin koşullandırılması, örneğin yüklenmesi, tıkanıklıkların yıkanarak giderilmesi ve hedef analitin elüsyonu basamaklarıdır. Yükleme basamağında, örnek moleküler baskılanmış mikroküre üzerine adsorplanır. Genel olarak, bu işlemdeki çözücünün polimerizasyon işleminde kullanılan benzer bir polaritesi olmalıdır, çünkü bu tür çözücüler moleküler baskılanmış sorbent üzerinde bulunan spesifik bağlanma yerleri ve analit arasındaki etkileşimi artırır. MISPE genel olarak, biyolojik, çevresel örnekler ve gıda analizleri gibi farklı örnek matrislerindeki çeşitli bileşiklerin ekstraksiyonu için uygulanmaktadır [46].

2.1.2.4 İlaç Salımı

Moleküler baskılanmış mikrokürelerin güçlü ve seçici olarak biyoaktif molekülleri bağlama yeteneği, bu materyalleri biyolojik uygulamalara uygun hale getirir. Yüksek yükleme kapasitesi ve analitlerin uzatılmış salım süresi, uygun dozaj formları oluşturmak adına moleküler baskılanmış mikroküreler için büyük bir potansiyel yaratır [47]. Son yıllarda moleküler baskılanmış mikroküreler ilaç salınımında tedavi edici ajan olarak sıkça kullanılmaktadır ve ilacın doğru yerde, doğru dozda ve zamanda salınmasını sağlamaktadır [48,49].

İlaç salınımı uygulamaları için moleküler baskılanmış mikrokürelerin spesifik özellikleri olmalıdır: baskılı boşluklar şablonun yokluğunda konformasyonun korunması için kararlı olmalıdır. Aynı zamanda şablonun serbest bırakılması ve yeniden alınması arasında hızlı bir dengenin gerçekleştirilmesini kolaylaştırmak için esnek olmalıdır. Bu amaçla non-kovalent baskılama, kovalent baskılamadan daha hızlı denge kinetiği sağlar. Bunun yanında moleküler baskılanmış mikroküreler, biyolojik sıvılarda bulunabilen enzimatik ve kimyasal saldırılara ve mekanik strese direnmek için kararlı olmalıdır [50]. Moleküler baskılanmış mikroküreler, hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşimleri geliştirmek için organik çözücülerde sentezlenir. Ancak, moleküler baskılanmış mikroküre sentezinde yaygın olarak kullanılan organik çözücülerin varlığı, hücresel hasarlara neden olabilir. Bu nedenle, ilaç salınımı uygulamalarında, biyolojik sistemlerle uyumlu hidrofilik polimerlerin hazırlanması genellikle avantajlıdır [51].

Moleküler baskılı mikroküreler, farmakolojik tedavinin bir tamamlayıcısı olarak, vücuttaki emilimini bloke ederek, mide bağırsak yolundaki birkaç maddeyi bağlamak için de kullanılabilir. Aynı zamanda moleküler baskılanmış mikroküreler, glikoz, kolesterol, safra asidi gibi vücutta istenmeyen maddeleri çıkarmak için kimyasal tuzaklar olarakta kullanılmaktadır [52].

2.2. Silika Mikroküreler

Bilimsel araştırmalarda, özellikle heterojen sistemlerin kuramsal tedavilerinde genellikle küresel simetri tercih edilir. Bunun için eş boyutlu kolloidal küreler ile çalışmalar yapılır. Bu küreler; çap, kimyasal yapı, kristallenme derecesi ve yüzey fonksiyonel grubu gibi parametreleri değiştirilerek kontrol edilebilmesi açısından avantaj sağlar. Aynı zamanda, kolloidal bir kürenin ara yüzey enerjisinin en aza indirilmesiyle nükleasyon veya büyüme prosesi sırasında kolaylıkla benimseyebildiği en basit şekli de simgeler [53]. Boyut olarak monodispers kolloidal küreler üretmek için çok çeşitli kimyasal yaklaşımlar mevcuttur. En iyi bilinen ve yaygın olarak kullanılan yöntemler, polimer lateksler için inorganik oksitler ve emülsiyon polimerizasyonu için kontrollü çöktürme yöntemleridir. Bu yöntemleri kullanarak, günümüzde sıkça kullanılan silika gibi inorganik oksitler, birkaç nanometreden 1 mikrometreye kadar değişen çapa sahip homojen küreler elde edilmiştir; 20 nm'den 100 µm'ye kadar olan polimer lateksleri de, eş boyutlu küreler olarak rutin olarak üretilmiştir [54].

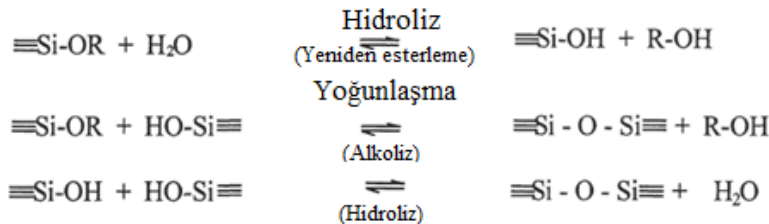
Silika mikroküreler ilk kez 1968 yılında Stöber ve Fink tarafından geliştirilen bir yöntemle elde edilmiştir. Yüksek pH'ta etanol içinde seyreltik bir tetraetilortosilikat (TEOS) çözeltisini hidrolize etmişler ve boyutlarını, reaktiflerin derişimlerini değiştirerek, 50 nm ile 2 µm arasında değişebilen eş boyutlu amorf silika küreleri elde etmişlerdir [55]. Silika mikroküreler, sulu süspansiyonlar halinde veya serbest akışlı, kuru tozlar halinde mevcuttur. Bu parçacıklar, DNA veya RNA saflaştırması, düz panel ekranları, hız ölçüm çalışmaları ve bağışıklık testleri gibi çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır.

2.2.1. Silika Mikrokürelerin Sentezi

Stöber ve Fink tarafından bulunan silika mikroküre sentezinin temeli, silisik asitin (tetraalkil silikat) tetraesterlerinin belirli solüsyonlarla kimyasal reaksiyonu ile üretilebilmelerine dayanmaktadır.

İlk olarak 1956'da Kolbe, bazların varlığında, su ile alkollü solüsyonda tetraetil silikatın reaksiyona girmesiyle silika parçacıklarının oluşumunu tanımlamıştır. Birkaç deneme sonucunda çok saf reaktantlar ile eş boyutlu küresel silika parçacıklarının oluşumuna yol açan ve yavaş ilerleyen bir reaksiyon gözlemlemiştir [56]. Bunun üzerine yapılan çalışmaların çoğu jel oluşumu ile sonuçlanmış ve yaklaşık 0.08µm boyutunda elips şeklinde partiküller görülmüştür. Daha sonra, reaksiyon parametrelerine yönelik deney koşullarında bazı önemli değişiklikler yapıldıktan sonra, 2 µm'ye kadar olan boyutlarda silika kürelerin yarı-eş boyutlu süspansiyonları alınmıştır. Bunun sonunda bir saatten daha kısa sürede reaksiyon gerçekleşmiş ve çok saf reaktantlara ihtiyaç duyulmadığı görülmüştür. Genel olarak Stöber yöntemi, silika kaynağı olarak bir alkoksisilan, hidroliz maddesi olarak su, katalizör olarak amonyak ve çözücü olarak kısa zincirli alkol içermektedir. Büyüme süreci iki reaksiyondan oluşmaktadır. Alkoksisilan birkaç saniye içinde hidrolize edilmiş, ardından silisik asitlerin polisilik asit ve küresel silika hidrojeline yoğunlaştırılması takip etmiştir.

Reaksiyonlar:



Silikaların yüzeyi hidroksil grupları ile kaplıdır. Amonyak sadece morfolojik bir katalizör olarak kullanılmaz, aynı zamanda silikaların negatif, sabit bir yüzey yüküne sahip olmasını sağlar. Oluşan son partiküllerin, ortalama çapının % 10'dan az standart sapmaya sahip eş boyutlu partiküller olduğu görülmüştür. Daha sonra ise hidrojel formundaki partiküllerin küresel hale dönüşmesi için kalsinasyon işlemi uygulanmıştır [57]. Daha sonra bu yöntem birçok çalışmada modifiye edilerek kullanılmaya başlanmıştır.

2.2.2. Silika Mikrokürelerin Uygulama Alanları

Silika mikroküreler birçok farklı alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Öncelikle kromatografik uygulamalar ve polimer dolgular için destek malzemeleri olarak kullanılmasının yanı sıra, son yıllarda yenilikçi uygulamalarda da ortaya çıkmıştır. Polimerik filmlerin kayganlığını arttırmak için, bu mikrokürelerin polimerik malzemeye yerleştirildiği görülmüştür. Ayrıca seramik malzemelerde, eczacılıkta ve kozmetik ürünlerde de kullanılmaktadır.

Yapılan bir çalışmada silika mikrokürelere nükleik asit adsorpsiyonu yapılarak, nükleik asitin silika ile etkileştirilerek serum veya hücre lizatları gibi malzemelerden izole edilmesi sağlanmıştır. Başka bir çalışmada, silika mikroküreler, düşük sıkıştırılabilirlik ve yüksek sıcaklık toleransına sahip olması sayesinde, düz panel ekran oluşturmak için kullanılan iki cam panel arasındaki boşlukları doldurmada performansı açısından tercih edilen bir malzeme olmuştur. Bunların yanı sıra, silika mikrokürelerin benzersiz özellikleri nedeniyle, araştırmacılar bunları Lazer Çoğaltıcı Hızölçer (LDV), Parçacık Görüntüleme Velosimetri (PIV), Dijital Görüntüleme Velosimetri (DIV) ve diğer akış görüntüleme ve ölçüm yöntemleri için kullanmaktadır. Özellikle 1000°C'ye kadar dayanmaları sayesinde yüksek sıcaklıklardaki akışları incelemek için tercih edilmektedirler. Öte yandan, silika yoğunluğu, immünolojik testlerde kolay ve hızlı ayrılma için idealdir. Proteinleri adsorplamaması sayesinde bu testlerde sıklıkta kullanılmaktadır. Bu mikroküreler çok kolay manipüle edilebildiğinden, aktin ve miyozinin etkileşimini incelemek için bir dizi lazer yakalama deneyinde katı destek olarak da kullanılmıştır [57].

2.3. Manyetik Silika Mikroküreler

Manyetik mikroküreler, yüksek dağılıma kararlılığı, mükemmel biyoyumluluk ve yüksek manyetik duyarlılığa sahiptir. Ayrıca araştırma ihtiyacına göre farklı fonksiyonel gruplarla kolaylıkla modifiye edilebilir.

Bu özelliklerinden dolayı, kataliz, klinik tanı ve tedavi, biyoteknoloji, biyoayırma ve hedefe yönelik ilaç salınımı, immünolojik testler gibi çeşitli uygulama alanlarında fazla ilgi görmüştür [58]. Manyetik mikroküreler, bileşimlerine göre polimer, biyomoleküler ve inorganik malzemelere ayrılabilirler. Literatürde çok sayıda manyetik malzeme ve biyomoleküler malzeme bulunmaktadır, ancak inorganik manyetik mikroküreler şimdiye kadar çok az ilgi görmüştür [59]. Yakın zamanlarda, yüksek kararlılıkları nedeniyle nükleik asit, enzim immobilizasyonu ve ultrasonik ekografinin ayrılması için silika manyetik mikroküreler araştırılmıştır. Manyetik silika mikroküreler, silika mikrokürelerin yüzeyinin manyetit (Fe_3O_4) ile ferrit kaplama [60] veya $Fe(CO)_5$ 'in sonokimyasal birikmesi sonucu kaplanmasıyla oluşmaktadır [61]. Genel olarak manyetik silika mikroküreler, manyetik alana, çevresel sıcaklığa ve ultraviyole radyasyona karşı duyarlı olduğundan birçok uygulama alanında kullanılmaktadır.

2.3.1. Manyetik Silika Mikrokürelerin Uygulama Alanları

Manyetik silika mikrokürelerin en önemli uygulama alanı ilaç salınımidir. Bu mikrokürelerin in vitro ilaç yükleme verimliliği ve ilaç salma davranışı, kontrollü ilaç salınımı için taşıyıcı olarak kullanılabilmelerine neden olmaktadır. Bunların yanı sıra, manyetik ilaç hedefleme ve doku etiketleme gibi çeşitli alanlarda uygulama yapılmaktadır [62]. Başka bir çalışmada ise, manyetik silika mikroküreler sayesinde, mikrodalga destekli protein sindiriminin hızlı ve etkili bir proteoliz yaklaşımı geliştirilmiştir. Manyetik mikrokürelerin mikrodalgadaki yüksek absorbans özelliğinden yararlanılarak, yüksek verimli yeni bir sindirim yöntemi ortaya çıkmıştır ve bu yöntem, biyomedikal ve klinik araştırmalara proteome tekniğinin uygulanmasını hızlandırmıştır [63]. Diğer bir çalışmada ise, manyetik silika mikrokürelerin yüksek kimyasal, termal kararlılıkları ve modifiye edilebilir fonksiyonel grupları göz önüne alınarak hipertermi tedavisinde tümör hücrelerini yok etmek amaçlı çalışmalarda kullanıldığı görülmüştür [64]. En önemli uygulama alanlarından biri ise moleküler baskılamadır. Manyetik mikroküreler MIP'lerle kaplandığında, elde edilen manyetik kompozit baskılı mikroküreler, sadece kompleks matriks içindeki şablon moleküllerini baskılı polimer kabuktan seçici olarak tanımakla kalmaz, aynı zamanda manyetik çekirdekten dış manyetik alanla kolayca ayrılabilir [65].

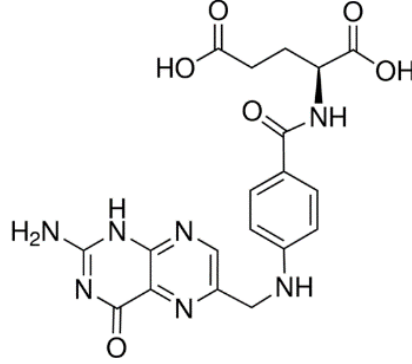
2.4.1. FA Yapısı ve Özellikleri

FA, kan hücresi üretmek için gerekli olan, suda çözünen bir B9 vitamini türüdür. Genetik materyalin bir parçasını oluşturan nükleik asitlerin yapımında anahtar bir bileşendir. B9 vitaminleri ve formları, daha fazla kırmızı kan hücresi oluşturma, işitme kaybını önleme, bebeğin beyin sağlığını koruma gibi önemli işlevleri yerine getirmektedir. Aynı zamanda, vasküler tıkanıklığa neden olan doğal histidin oranının azaltılmasına katkıda bulunmakta ve böylece inme ve kalp hastalığını önlemeye de yardımcı olmaktadır.

Vücutta düşük derişimde olması halinde, Alzheimer hastalığı, rahim ağzı kanseri, karaciğer, pankreas, deri hastalıkları olasılığını artmaktadır. Bu nedenle, vücuda mutlaka yeterli miktarda alınmalıdır. Özellikle hamilelik döneminde vücuttaki FA miktarına daha fazla dikkat edilmesi gerekmektedir. FA'nın düşük miktarda alınması, kadınların doğurganlığında azalmaya neden olabilmektedir. Tüm bu nedenlerden dolayı, FA'nın gıda ve tıbbi örneklerde doğru ve hızlı bir şekilde ölçülmesi önemlidir. Ticari ürünlerde kalite güvence ve kontrolünü sağlamak için FA miktarını doğru ve kesin olarak ölçen analitik yöntemler gerekmektedir [6]. FA takviyesi önemli sağlık yararları sağlamaktadır. Sayısız kronik hastalık, kalp krizi, gebelikte nöral tüp defektleri FA eksikliğinden kaynaklanmaktadır. FA, sebzeler, meyveler, kümes hayvanları ve et de dahil olmak üzere geniş bir alanda doğal olarak bulunmaktadır. Bu nedenle çeşitli gıda örneklerinde FA miktarını izlemek gerekmektedir. Ancak, asidik koşullar altında düşük kararlılığı, ışığa ve yüksek sıcaklığa karşı hassas olmasından dolayı, biyolojik sistemlerde düşük derişimine bağlı olarak FA analizi kolay yapılamamaktadır. Spektrofotometri, HPLC, LC gibi FA'nın belirlenmesi için bir takım yöntemler kullanılmıştır. Öte yandan, FA'nın mikrobiyolojik analizi yaygın olarak kullanılmaktadır, ancak bu analizler uzun zaman alıcı ve beceri gerektirmektedir [7].

FA; pteridin halkası, p-aminobenzoik asit ve L-glutamik asit olmak üzere üç ana halkaya sahiptir. Pteridin halkası, p-aminobenzoik asit ile bağ yaparak pteroik asit meydana getirmekte ve bu moleküle L-glutamik asit bağlanarak FA'ı oluşturmaktadır. Moleküler formülü "C₁₉H₁₉N₇O₆" şeklinde ve molar kütlesi 441.40 g/mol'dür. Rengi sarı ve turuncu olan tatsız, kokusuz, iğne yapısındaki kristallerdir. Erime noktası 250°C'dir ve bu sıcaklığın üzerinde ayrışmaktadır. Su, etanol, metanol ve bütanol içinde az çözünmektedir.

Aseton, kloroform, eter ve benzende ise çözünmemektedir. Hidroksitler ve karbonatların çözeltileri, klorhidrik ve sülfürik asitin sıcak ve seyreltik çözeltileri ile birlikte en iyi çözücüler haline gelmektedir. FA'in sulu çözeltileri ısıya duyarlıdır, ışık veya riboflavin varlığında hızla ayrışmaktadır [6].



Şekil 2.2. FA'in yapısı [66]

2.4.2. FA ile Moleküler Baskılama Çalışmaları

Literatürde, FA'in moleküler baskılandığı, ayırma veya tanıma yönelik malzemelerin sentezi yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda, moleküler baskılanan polimerlerin baskılanmayan polimerlere oranı ile bulunan baskılama faktörü (IF) değeri dikkate alınmıştır. 2010'da yapılan bir çalışmada moleküler olarak baskılanmış membranlar, membran malzemesi olarak poli(akrilonitril-co-akrilamid) kopolimeri ve şablon molekülü olarak FA kullanılarak faz inversiyon tekniği ile hazırlanmıştır. Referans malzeme olarak poli (akrilonitril) bazlı membranlar kullanılmıştır. Polimer kompozisyonu, membran hazırlama yöntemi ve pH değerleri değiştirilerek membranların tanıma özellikleri incelenmiştir [67]. 2016 yılında yapılan başka bir çalışmada moleküler olarak baskılanmış manyetik polimerler (MMIPler) sentezlenmiş ve farklı gıda örneklerinde FA tayini için test edilmiştir. MMIP'ler, Fe₃O₄@SiO₂ manyetik nanopartiküllerin yüzeyinde akrilonitril (fonksiyonel monomer), etilen glikol dimetakrilat (EDMA) (çapraz bağlayıcı) ve 2,2'-azobisisobütironitril (AIBN) (radikal başlatıcı) kullanılarak polimerize edilmiştir. Bu çalışma sonucunda baskılama faktörü (IF) değeri 1.47 bulunmuştur [68]. Yine moleküler baskılanmış mikroküreler, FA'in belirlenmesi için kadmiyum tellürid kuantum noktalarının (CdTe QDs) yüzeyinde kullanılmıştır.

Başka bir çalışmada moleküler olarak baskılanmış manyetik mikroküreler, şablon olarak FA kullanılarak sol-jel yöntemi ile başarılı bir şekilde sentezlenmiştir. Sentezlenen malzemeler, domates örneklerinde yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile yapılan folat tayininden önce manyetik katı faz ekstraksiyonunda başarıyla uygulanmıştır ve bu çalışma sonucunda baskılama faktörü değeri 1.79 bulunmuştur [69]. Literatürde araştırılan bir başka çalışmada ise, sulu ortamda folik asit ekstraksiyonu uygulanmış ve sonucunda baskılama faktörü 1.57 olarak hesaplanmıştır [70].

3. MATERYAL VE METOD

Tez kapsamında, silika bazlı manyetik ve manyetik olmayan mikrokürelerin moleküler baskılama yoluyla sentezi yapılmış, sentezlenen mikrokürelerin belirlenen hedef moleküle (FA) karşı izolasyon davranışları tanımlanmıştır. Bunun için sentezlenen manyetik ve manyetik olmayan mikrokürelerin spesifik yüzey alanları ve gözenek yapıları azot adsorpsiyon/desorpsiyon deneyleriyle (Brunauer-Emmett-Teller (BET) analizi yoluyla) ölçülmüştür. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve geçirimli elektron mikroskobu (TEM) yardımıyla boy dağılımları ve yüzey morfolojileri hakkında bilgi edinilmiş, baskılanmış mikrokürelerdeki polimerik katman incelenmiştir. EDX sonuçları doğrultusunda, mikrokürelerin yüzey bileşimleri hakkında bilgi edinilmiştir. Manyetik mikrokürelerin özellikleri ise Titreşimli Örnek Manyetometresi (VSM) ile analiz edilmiştir. Monomer-şablon etkileşimlerini karakterize etmek için de BioDrop kullanılmıştır. Bunun yanında, örneklerin yapılarındaki fonksiyonel grupları belirlemek ve bağlanma yerlerini öğrenebilmek için Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) analizi yapılmıştır.

Öncelikle silika bazlı moleküler baskılama yöntemleri denenmiş ve bu yöntemler ile sentezlenen sorbentlerin FA'e karşı seçici adsorpsiyon davranışı, kesikli ve sürekli sistemlerde incelenmiştir. Böylelikle sorbentlerin FA izolasyon seçiciliği belirlenmiştir. Literatürde folik asit ile ilgili moleküler baskılama çalışmaları göz önüne alındığında, bu tez çalışmasında baskılama faktörünün 2.00'ın üzerine çıkılması hedeflenmiştir.

Tez kapsamında bu amaçla yapılan çalışmaların genel şeması Şekil 3.1'de gösterilmektedir. Bu şemaya göre ilk olarak poli(glisidil metakrilat) mikrokürelerin sentezi gerçekleşmiştir. Ardından, monodispers-gözenekli poli(metakrilik asit-co-etilen glikol) mikroküreler sentezlenmiştir. Bu mikroküreler kullanılarak, monodispers-gözenekli silika mikroküreler elde edilmiştir. Silika mikrokürelere manyetik özellik kazandırılarak, manyetik silika mikroküreler elde edilmiş ve sonrasında hem manyetik olmayan hem de manyetik formdaki silika mikroküreler üzerinde moleküler baskılama tekniği uygulanmıştır. Kesikli ve sürekli sistemde adsorpsiyon deneyleri yapılarak, mikrokürelerde sorbent ve FA başlangıç derişiminin etkisine bakılmıştır. Tekrar kullanılabilirlik testi ve seçicilik testi yapılarak, FA'in izolasyondaki seçicilik etkisi ve tekrar kullanılabilirliği hakkında bilgi edinilmiştir.



Şekil 3.1. Deney Tasarımı Genel Şeması

3.1. Biyomoleküllerin İzolasyonu için Moleküler Baskılama Yönteminde Kullanılacak Sorbentlerin Sentezi

3.1.1. Materyal

Glisidil metakrilat (GMA) ve metakrilik asit (MAA), monodispers gözenekli silika mikrokürelerin sentezindeki polimerizasyon aşamasında monomer olarak kullanılmıştır. Bu sentezde etilen dimetakrilat (EDMA) ise çapraz bağlayıcı olarak kullanılmıştır. Bunlarla birlikte kullanılan izopropanol, tetraetoksisilan (TEOS), tetrabutilamonyum iyodat (TBAI), asetiltrimetilamonyum bromür (CTAB), poli(vinil pirolidon) (PVP K-30), poli(vinil alkol) (PVA) ve sodyum dodesil sülfat (SDS)'ın tamamı Sigma-Aldrich Co., ABD firmasından temin edilmiştir. Riedel De Haen firmasından ise etanol, etil benzen ve tetrahidrofuran (THF) alınmış ve çözücü olarak kullanılmıştır.

Across Organics'ten temin edilen ve polimerizasyonda başlatıcı görevini yapan 2,2'-azobisizobütironitril (AIBN), polimerizasyon öncesinde metanol ile yıkanmıştır. Aynı firmadan alınan diğer bir başlatıcı ise benzoil peroksit (BPO)'tir.

Mikrokürelerin manyetik formunu oluşturmak için ise, yine Sigma-Aldrich Co., ABD'den alınan demir (III) klorür heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Fe^{+3}) ve demir (II) klorür tetrahidrat ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Fe^{+2}) tuzları kullanılmıştır.

3.1.2. Çıkış Lateksi Olan Poli(GMA) Mikrokürelerin Sentezi

Monodispers-gözenekli silika mikrokürelerin çıkış materyali olan poli(MAA-co-EDMA)'nın eldesi için poli(GMA) lateks partiküller dispersiyon polimerizasyonu yöntemi ile sentezlenmiştir [71]. Polimerizasyon sırasında 30 mL etanol sızdırmaz cam Pyrex® reaktöre eklenmiş, 0.45 g PVP K-30 ve 3 mL GMA bu reaktör içindeki etanolde çözülmüştür. Daha sonra 0.28 g AIBN (başlatıcı) reaktördeki çözeltiliye eklenmiş ve tamamen çözünene kadar ultrasonik banyoda (Elma LC 30, Germany) bekletilmiştir. Çözünme işlemi bittikten sonra reaktör, sıcaklığı kontrol edilebilir olan çalkalamalı su banyosuna (Memmert, Germany) yerleştirilip sabitlenmiş ve polimerizasyonun gerçekleşmesi için sıcaklık 70°C 'ye ayarlanmıştır. Su banyosu bu sıcaklığa geldikten sonra çözelti, 120 cpm hız ile 24 saat karıştırılmıştır. Polimerizasyon sona erdiğinde reaktör su banyosundan alınmış ve oda sıcaklığına gelene kadar soğuması beklenmiştir. Oluşan poli(GMA) lateks partiküllere önce etanol daha sonra distile su olmak eklenmiş ve santrifüjleme (Hettich Universal 320 R, Germany)-dekantasyon yoluyla yıkama işlemleri uygulanmıştır. Son basamakta, poli(GMA) lateks partiküller santrifüjlendikten sonra distile su ile ultrasonik su banyosunda dağıtılmış ve sulu ortamdaki partiküllerin derişimi gravimetrik yöntem ile belirlenmiştir.

3.1.3. Monodispers-Gözenekli Polimerik Mikrokürelerin Sentezi

Mikroküreler, laboratuvarımızda geliştirilen çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu yöntemi sayesinde monodispers-gözenekli yapıda elde edilmektedir [71]. Bu yöntemde öncelikle 50 mL % 0.25 SDS içeren sulu ortama 3.5 mL etilbenzen eklenmiş ve 200 W gücündeki ultrasonikasyonda 5 dakika boyunca bekletilerek gözeneklerin oluşmasını sağlayan solventin iyice sulu ortamda dağılması sağlanmıştır. Sonrasında çözeltiliye 0.3 g poli(GMA) mikroküre eklenerek tekrar ultrasonikasyon ile dağıtma işlemi gerçekleştirilmiştir.

Poli(GMA) partikülleri solventin şişirebilmesi için çözelti, manyetik karıştırıcı (IKA RO 10, Germany) yardımıyla oda sıcaklığında 24 saat boyunca karıştırılmıştır.

Aynı zamanda, 50 mL % 0.25 SDS içeren distile suya 2 mL MAA (monomer), 4 mL EDMA (çapraz bağlayıcı) ve 0.25 g BPO (başlatıcı) eklenerek bileşenler sulu ortamda ultrasonikasyon ile dağıtılmıştır.

Oluşan emülsiyon bir önceki basamakta hazırlanan dispersiyona eklenerek, elde edilen emülsiyon 25°C’de 24 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. 24 saat tamamlandıktan sonra ilk basamakta 0.8 g PVA’nın 10 mL distile suda çözündüğü karışım ortama eklenmiş ve oluşan dispersiyon cam reaktöre alınmıştır. 150 cpm hız ile 80°C’ye ayarlanan çalkalamalı su banyosunda 24 saat karıştırılarak polimerizasyonun gerçekleşmesi sağlanmıştır. Polimerizasyon sonrasında ortamdaki çözücünün uzaklaştırılması amacı ile çözelti, santrifüjleme-dekantasyon yoluyla 3 defa teknik etanol ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra ortam, önce 2 defa THF ile, sonrasında 3 defa etanol ile tekrar yıkanmıştır. Bunun sonucunda oluşan poli(MAA-co-EDMA) mikroküreler, etanol içinde dispers edilmiştir.

3.1.4. Monodispers-Gözenekli Silika Mikrokürelerin Sentezi

Çok basamaklı hidroliz/kondenzasyon yöntemi ile monodispers gözenekli silika mikroküreler elde edilmektedir [72]. Bunun için önceki bölümde sentezi anlatılan poli(MAA-co-EDMA) partikülleri şablon olarak kullanılmıştır. Öncelikle, 50 mL izopropanol ve 5 mL distile su karışımına 0.25 g TBAI eklenmiştir. Oluşan homojen ortama 0.25 mL amonyum hidroksit ve ardından poli(MAA-co-EDMA) partiküller eklenerek partiküllerin ultrasonikasyon ile dağılması sağlanmıştır. 400 rpm hız ile çalışan manyetik karıştırıcıda oda sıcaklığında 1 saat boyunca çözeltinin karışması sonucunda, ortama %25 TEOS içeren 5 mL izopropanol-TEOS çözeltisi eklenmiştir. Sonrasında ortam, 30°C’ye ayarlanmış manyetik karıştırıcıda 400 rpm hız ile 24 saat karıştırılmıştır. Bu aşama tamamlandıktan sonra elde edilen partiküller önce 2 defa izopropanol, sonra ise 2 defa distile su ile santrifüj yoluyla yıkanmıştır. Yıkanan partiküller 24 saat boyunca 70°C’lik etüvde kurutulmuştur. Son basamakta ise, etüvden alınan partiküller, 6 saat boyunca 450°C’de kalsinasyona bırakılmıştır. Bu sayede partiküller, polimerik kısımlarından uzaklaştırılmış ve istenilen özellikteki silika mikroküreler elde edilmiştir.

3.1.5. Monodispers-Gözenekli Manyetik Silika Mikrokürelerin Sentezi

Çok basamaklı hidroliz/kondenzasyon yöntemi ile sentezlenen silika mikrokürelerin manyetik özellik kazanması, ikili çöktürme yöntemiyle Fe⁺² ve Fe⁺³ iyonlarının Fe₃O₄ formuna mikroküreler içinde dönüşmesiyle başlamıştır [73,74]. Bu iyonlar, mikrokürelerdeki karboksil gruplarıyla etkileşerek, mikroküreler üzerine absorplanmıştır.

Öncelikle, 50 mL suyun içerisine 0.27 g demir (III) klorür heksahidrat, 0.4 g demir (II) klorür tetrahidrat ve 0.7 g poli(MAA-co-EDMA) mikrokürelerin eklenmesiyle bir dispersiyon oluşturulmuştur.

Bu ortam 5 dakika boyunca, 25°C’de manyetik karıştırıcıda azot varlığında karıştırılmıştır. Ortamdaki oksijen varlığını sonlandırmak ve mikropartiküllere demir iyonlarının tutunmasını sağlamak için yaklaşık 10 dakika vakum uygulanmıştır. Daha sonra sıcaklık 85°C’ye çıkarılarak 50 mL amonyak eklenmiş, böylece Fe₃O₄ nanopartiküller oluşturulmuştur. Ortam 1 saat karıştırıldıktan sonra, manyetik mikroküreler mıknatıs yardımıyla 3 defa distile su ile yıkanmış ve distile su içerisinde dağıtılmıştır. Oluşan manyetik poli(MAA-co-EDMA) mikrokürelere, manyetik olmayan silika mikrokürelerin sentezinde kullanılan yıkama prosedürünün aynısı uygulanmıştır. Aradaki fark, yıkama işleminin santrifüjleme yerine mıknatıs yardımıyla yapılmasıdır. Sonrasında manyetik silika mikroküreler, aynı şekilde 24 saat boyunca 70°C’lik etüvde kurutulmuştur. Sonrasında, 6 saat boyunca 450°C’de kalsinasyona bırakılarak manyetik mikrokürelerin polimerik kısmının uzaklaşması sağlanmış ve su içerisinde dağıtılmıştır.

3.2. Moleküler Baskılama Yöntemi ile Biyomolekül İzolasyonu

3.2.1. Materyal

Silika mikroküreler, 3-trimetoksisililpropil metakrilat (TMSPM) ile bağlanmadan önce hidroklorik asit (HCl) ile etkileştirilmiştir. TMSPM ile bağlanma işlemi sırasında kullanılan trietilamin (TEA) ile birlikte malzemelerin hepsi Sigma-Aldrich Co., ABD’den temin edilmiştir. Manyetik ve manyetik olmayan monodispers gözenekli silika mikroküreler üzerine baskılanacak hedef molekül olan FA, Sigma-Aldrich Co., ABD firmasından alınmıştır. Çözücü olarak kullanılan N,N dimetilformamid (DMF) ise Merck Chemicals, Almanya firmasından temin edilmiştir. Moleküler baskılama yönteminde fonksiyonel monomer olarak 1-vinilimidazol (VIm) kullanılmıştır. Başlatıcı olarak 2,2’-azobisisobütironitril (AIBN) ve çapraz bağlayıcı olarak kullanılan etilen glikol dimetakrilat (EDMA) ile birlikte bu malzemeler Sigma-Aldrich Co., ABD firmasından alınmıştır.

3.2.2. Moleküler Baskılama Yöntemi

3.2.2.1. Silika Mikrokürelerin Moleküler Baskılama için Hazırlanması

Moleküler baskılama yönteminde kullanılması için silika mikroküreler ilk olarak hidroklorik asit (HCl) ile etkileştirilmiştir. Bunun için 0.1 g silika mikroküre, % 5 HCl içeren 25mL’lik sulu çözeltiye eklenerek tamamen dağılıncaya kadar ultrasonikasyon işlemi yapılmıştır. Dispersiyon, cam reaktöre alınarak, 6 saat boyunca 80°C’lik çalkalamalı su banyosunda karıştırılmıştır. Sonrasında oluşan HCl ile etkileştirilmiş silika mikroküreler, 3 kere distile su ile santrifüjleme-dekantasyon ile yıkanmış ve etanol ile alınarak etüvde kurutulmuştur.

Kurutulan mikroküreler, 3-trimetoksisililpropil metakrilat (TMSPM) ile etkileştirilmiştir. Bunun sebebi, silika mikrokürelerdeki hidroksil gruplarının TMSPM'in yapısındaki trietoksisilan grupları ile etkileşerek, mikrokürelerin yüzeyinde polimerleşebilir metakrilat gruplarının oluşmasını sağlamaktır. Bunun için, 10 mL izopropanol ile 2 mL TMSPM cam reaktör içerisinde çözüldükten sonra 0.3 mL trietilamin (TEA) ortama eklenmiş ve ultrasonikatör ile tamamen çözünmeleri sağlanmıştır. Ortama 0.2 g HCl ile etkileştirilmiş silika mikrokürelerin de eklenmesinden sonra reaktörden bir süre azot geçirilmiş ve çalkalamalı su banyosuna yerleştirilerek 6 saat boyunca 65°C'de karıştırılmıştır. Elde edilen TMSPM bağlı silika mikroküreler 2 kere izopropanol ile yıkanarak etüvde kurutulmuştur.

3.2.2.2. Manyetik Silika Mikrokürelerin Moleküler Baskılama için Hazırlanması

Sentezlenen manyetik silika mikroküreler TMSPM ile etkileşimden önce koruyucu bir silika katman ile kaplanmıştır. Bu katmanın sebebi, manyetik mikrokürelerin manyetik özelliğini korumak ve asidik ortamlarda zarar görmesini engellemektir. Bu aşamada cam bir şişeye 25 mL izopropanol ve 2.5 mL distile su karışımına 0.125 g TBAI eklenip çözüldükten sonra, 0.125 mL amonyum hidroksit'in eklenmesiyle 1 saat mekanik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Sonrasında % 50 TEOS içeren 1mL'lik TEOS-izopropanol çözeltisi ortama damla damla eklenmiştir. 400 rpm karıştırma hızında 40°C sıcaklığındaki su banyosu içerisinde 24 saat boyunca mekanik karıştırıcıda ortamın karışması sağlanmıştır. Elde edilen manyetik mikroküreler etüvde kurutulmuş ve manyetik olmayan silika mikrokürelere uygulanan TMSPM etkileşim prosedürünün aynısı manyetik mikroküreler için tekrarlanmıştır.

3.2.2.3. Kesikli Sistemde Moleküler Baskılama

Manyetik ve manyetik olmayan monodispers gözenekli silika mikroküreler üzerine baskılanacak hedef molekül FA olarak seçilmiştir. Çözücü olarak N,N-dimetilformamid (DMF), fonksiyonel monomer olarak ise 1-vinilimidazol (VIm) kullanılmıştır. Yapılan deneyler moleküler baskılanmış mikroküreler (MIP) ve baskılanmamış mikroküreler (NIP) olmak üzere iki ayrı koldan yürütülmüştür. Öncelikle 50 mL'lik iki tane falkona ayrı ayrı, 18 mL DMF ve 25 µL VIm eklenmiştir. Sonrasında falkonlardan birine 58 mg folik asit eklenmiştir. FA içeren ortam "MIP", FA içermeyen ortam ise "NIP" sentez ortamı olarak tanımlanmıştır.

Aynı ortamların manyetik mikroküreleri içeren formları ise "MMIP" ve "MNIP" sentez ortamları olarak tanımlanmıştır. Hazırlanan iki ortam da 1 saat boyunca oda sıcaklığında rotator (Finepcr) yardımıyla karışmıştır.

1 saat sonunda, her iki falkona da 0.1 g TMSPM bağlı silika mikroküreler eklenmiş ve ortam 3 saat boyunca oda sıcaklığında tekrar karıştırılmıştır. Sonrasında ortamlara ayrı şişelerde hazırlanan 2 mL DMF (çözücü), 400 µL EDMA (çapraz bağlayıcı), 10 mg AIBN (başlatıcı) karışımı eklenerek ultrasonikatörde iyice çözünmesi beklenmiş ve ortamlar cam reaktörlere alınarak çalkalamalı su banyosuna yerleştirilmiştir. 24 saat boyunca 65°C’de çalkalanarak reaksiyon gerçekleşmiştir. 24 saat sonunda her iki reaktördeki ortam tekrar falkonlara alınarak santrifüj yardımıyla çöktürülmüş ve %10 asetik asit + %10 sodyum dodesil sülfat (SDS) içeren 10 mL’lik sulu ortam ile her saat başı yıkanarak 1 saat boyunca karıştırılmıştır. Bu yıkama işlemi 3 kez tekrarlandıktan sonra, son olarak ortamdan asiti ve SDS’yi uzaklaştırmak için çözeltiler, 5 kez distile su ile yıkanmıştır. Tüm bu basamaklar manyetik ve manyetik olmayan silika mikroküreler için aynı şekilde uygulanmıştır.

3.2.2.4. Kesikli Sistemde FA’ın Adsorpsiyonu

Manyetik ve manyetik olmayan moleküler baskılanmış sorbentlerin seçilen hedef moleküllere karşı seçici adsorpsiyon davranışı kesikli sistemde FA kullanılarak incelenmiştir. Adsorpsiyon deneyleri ile istenilen değerlerde sorbent ve FA başlangıç derişimi taramaları yapılmıştır. Bunun için, 4 mL fosfat tamponu (PB) içerisinde 4 mg FA çözünerek ortamın pH’ı 7’ye ayarlanmıştır. Sorbent taraması için, gravimetrleri alınmış sulu ortamdaki moleküler baskılanmış mikroküre süspansiyonlarından 1, 2, 5, 10 ve 20 mg’daki sorbent miktarlarına göre sıvı hacim çekilmiş ve mikroküreler hazırlanan adsorpsiyon ortamıyla etkileşmeden önce 5 kez fosfat tamponu ile yıkanmıştır. Sonrasında ise hazırlanan PB + FA ortamıyla 2 saat boyunca etkileştirilmiştir. FA başlangıç derişimi taraması için ise, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2 ve 4 mg FA/mL PB başlangıç derişimleri için moleküler baskılanmış mikroküre süspansiyonundan 5 mg sorbent içerecek şekilde çekilmiş ve yine hazırlanan PB + FA ortamlarıyla 2 saat karıştırılmıştır. Adsorpsiyon işlemi gerçekleştikten sonra, santrifüj yoluyla partiküller çöktürülmüş ve üstlerinden örnek alınarak adsorpsiyon değerleri okunmuştur. Okuma işlemi, 281 nm dalga boyunda BioDrop cihazı ile gerçekleşmiştir. Okunan değerler ile moleküler baskılanmış mikrokürelere hedef molekülün denge adsorpsiyon kapasitesi (Q) hesaplanmıştır. Hesaplama için şu formüller kullanılmıştır [75]:

$$Q = [(A_0 - A_f) / A_0] \times [(C_0 \times V) / m_A] \quad (3.1)$$

Bu denklemde hedef molekülün başlangıç ve adsorpsiyon sonrası absorbans değerleri sırasıyla A_0 ve A_f olarak tanımlanmıştır. V (mL) değeri adsorpsiyon ortamının hacmi, C_0 (mg/mL) değeri hedef molekülün başlangıç derişimi ve m_A (g) değeri ise kullanılan sorbentin kütlesidir.

Moleküler baskılama faktörü (IF) aşağıdaki eşitlikten hesaplanır [76]:

$$IF = Q_{MIP} / Q_{NIP} \quad (3.2)$$

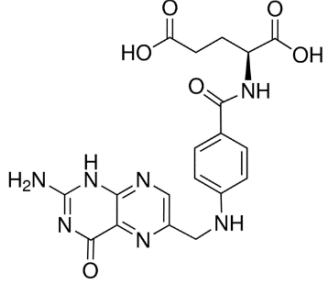
Buradaki Q_{MIP} ve Q_{NIP} (mg/g) sırasıyla baskılanan mikrokürede ve baskılanmamış mikrokürede FA denge adsorpsiyon kapasitelerini göstermektedir.

3.2.2.5. Kesikli Sistemde Tekrar Kullanılabilirlik Testi

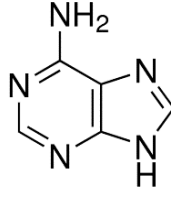
Moleküler baskılanmış mikrokürelerden, pratik uygulamalarda tekrar tekrar kullanıldıklarında kararlı bir performans beklenir. Bu nedenle, sentezlenen moleküler baskılanmış mikrokürelerin yeniden kullanılabilirliğini incelemek için adsorpsiyon döngüsü 5 kez tekrarlanmıştır. Bu işlemde, her adsorpsiyondan sonra sıvı kısımdaki FA derişimi belirlenerek mikrokürelerin adsorpsiyon kapasiteleri hesaplanmıştır. Sonrasında distile su ile 5 kez, ardından da fosfat tamponu ile 5 kez yıkanmış mikroküreler, tekrar adsorpsiyona hazır hale getirilmiştir. 5 tekrar sonucunca mikrokürelerin adsorpsiyon kapasitelerinin değışimi grafiğe alınmıştır.

3.2.2.6. Kesikli Sistemde Seçicilik Testi

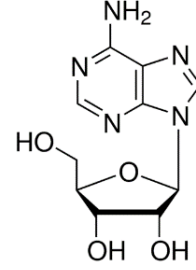
Sentez sırasında uygulanan moleküler baskılama etkisini değerlendirmek için FA ile birlikte farklı biyomoleküller (kafein, p-aminobenzoik asit, adenin, adozin ve tiramin) kullanılarak adsorpsiyon deneyleri yapılmıştır. Bu moleküller, FA kimyasal yapısı ile benzer olup, FA'in kimyasal yapısından bazı alt gruplar olduğu için seçilmiştir. Şekil 3.2'ye bakıldığında, seçilen moleküllerin fonksiyonel gruplarının FA'in yapısındaki fonksiyonel gruplar ile aynı olduğu görülmektedir. Böylelikle moleküler baskılama etkisinin sadece FA'e karşı seçici olması beklenmektedir. Bu amaçla, optimum değer olarak belirlenen 5 mg sorbent miktarı ile derişim taraması yapılmış ve okunan değerler ile adsorpsiyon kapasiteleri hesaplanmıştır. Değerler karşılaştırılarak FA seçiciliği değerlendirilmiştir. Seçicilik testi hem manyetik hem de manyetik formda olmayan mikroküreler için tekrarlanmıştır.



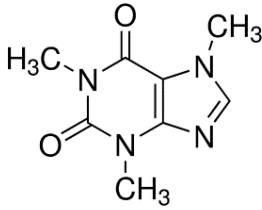
Folik Asit [66]



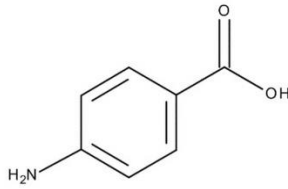
Adenin [77]



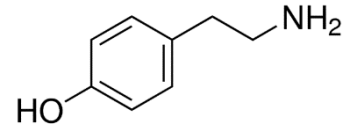
Adenozin [78]



Kafein [79]



P-aminobenzoik asit [80]



Tiramin [81]

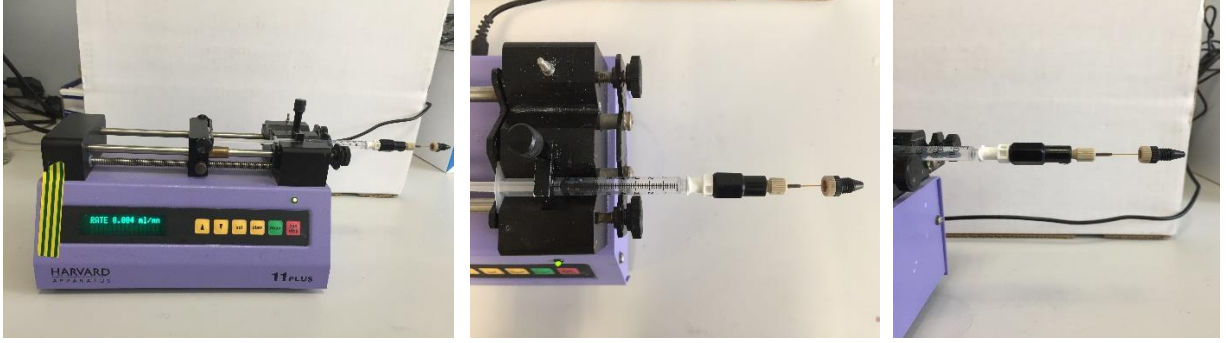
Şekil 3.2. FA'e benzer yapıdaki biyomoleküller

3.2.2.7. Sürekli Sistemde Moleküler Baskılama

Çalışmanın bu aşamasında ise, önceki bölümde sentezi anlatılan manyetik olmayan silika mikroküreler üzerine moleküler baskılama ile elde edilen sorbent (MIP) ve moleküler baskılanmamış sorbent (NIP), 300 mikron iç çap değerine sahip silika kapiler kolonlar içerisine dolgulanmıştır. Sulu ortamdaki 160 mm boyundaki silika kapilere (300 µm iç çap, 430 µm dış çapa sahip) enjektör yardımıyla konulduktan sonra sistemin mikro-HPLC pompasına (Dionex-Ultimate3000, A.B.D) bağlanması sağlanmış ve pompa 10 µL/dak akış hızına ayarlanarak kolondan su geçişi gerçekleşmiştir. Kapiler kolon ucundaki frit yardımıyla mikroküreler sıvı akışı ile kolona dolgulanmıştır. 1 saatlik su geçişinin sonucunda mikrokürelerin silika kapiler kolon içerisinde iyice sıkışması sağlanmıştır. Dolum işlemi tamamlandıktan sonra mikroskop yardımıyla kolonun mikroküreler ile ne kadar dolduğu gözlenmiş ve elmas kesici kullanılarak 10 cm uzunluğunda kolon kesilmiştir. Böylece elde edilen kolon, adsorpsiyon deneyine hazır hale getirilmiştir.

3.2.2.8. Sürekli Sistemde FA Adsorpsiyonu

Sürekli sistemde yapılacak adsorpsiyon deneyleri için kurulan düzenek Şekil 3.3'te verilmektedir. Sistem; izole edilecek FA çözeltisi, enjeksiyon pompası, adsorpsiyon ve desorpsiyon çözeltilerini kolona verebilmek için kullanılan 1 mL'lik enjektör ve bu enjektöre bağlanan kapiler mikrokolondan oluşmaktadır. Çalışan sistemde kolondan sıvı faz geçirildiği sırada mikrokürelerin kolon içinde kalmasını sağlamak için 2 µm'lik gözenek açıklığına ve 0.5 mm çapına sahip paslanmaz çelik frit kullanılmıştır.



(A)

(B)

(C)

Şekil 3.3. FA izolasyonu için geliştirilen sürekli mikroakış sistemi : (A) Sürekli mikroakış sisteminin genel görünümü, (B) Sürekli mikroakış sisteminde kullanılan dolgulu kolonun enjektöre bağlanması, (C) Dolgulu mikrokolonun görünümü.

Sürekli sistemde adsorpsiyon işlemi, öncelikle MIP ile dolgulanan 10 cm uzunluğundaki mikrokolondan fosfat tampon geçirilmesiyle başlamıştır. Sonrasında 0.05 mg FA/mL PB derişimindeki FA çözeltisi enjektör yardımıyla çekilerek şırınga pompasına bağlanmıştır. Dolgulu mikrokolon enjektöre bağlanarak sağlaştırıldıktan sonra, şırınga pompası çalıştırılarak 2 µl/dak akış hızında, hazırlanan FA çözeltisi kolondan geçirilmiştir. Bu sürede fritin ucundan gelen damlalar, 6 µL olacak şekilde ependorflarda toplanmıştır. Mikrokolon doygunluğa ulaştıktan sonra BioDrop yardımıyla çıkış akımı absorbands değerleri 281 nm'de okunarak moleküler baskılanmış sabit faza hedef molekülün adsorpsiyon kapasitesi (Q) hesaplanmıştır. Böylece FA'in kolon üzerine adsorpsiyonu izlenmiştir. Adsorpsiyon sonrası kolon, %10 asetik asit %10 SDS içeren desorpsiyon ortamı ile 2 □L/dak akış hızıyla etkileştirilerek kolondaki FA uzaklaştırılmıştır. Bu aşamalarda elde edilen veriler şu denklemler ile değerlendirilmiştir.

Sürekli sistemde FA adsorpsiyon verimi (θ , % ağırlık)

$$\theta = [M_{FA, \text{ adsorplanan}} / M_{FA, \text{ yüklenen}}] \times 100 \quad (3.3)$$

$$M_{FA, \text{ adsorplanan}} = M_{FA, \text{ yüklenen}} - M_{FA, \text{ adsorplanmayan}} \quad (3.4)$$

$$M_{FA, \text{ yüklenen}} = Q_A \times C_o \times t \quad (3.5)$$

$$M_{FA, \text{ adsorplanmayan}} = V_A \times C_A \quad (3.6)$$

Bu denklemlerde büyüklükler aşağıdaki şekilde tanımlanmıştır.

$M_{FA, \text{ yüklenen}}$: Kolona yüklenen FA miktarı (mg)

Q_A : Adsorpsiyon ortamı akış hızı ($\mu\text{L}/\text{dak}$)

t : Adsorpsiyon ortamı akış süresi (dak)

C_o : Adsorpsiyon ortamındaki FA derişimi ($\text{mg}/\mu\text{L}$)

$M_{FA, \text{ adsorplanmayan}}$: Adsorpsiyon sırasında toplanan örneğin FA miktarı (mg)

V_A : Adsorpsiyon sırasında toplanan örneğin hacmi (μL)

C_A : Adsorpsiyon sırasında toplanan örneğin FA derişimi ($\text{mg}/\mu\text{L}$)

3.2.2.9. Sürekli Sistemde Basınç Testi

Sürekli sistemde yapılan çalışmalar için moleküler baskılanmış mikroküreler ile dolgulanmış silika kapiler mikrokolona basınç testi uygulanmıştır. Bunun için 5 cm uzunluğundaki kolondan sırasıyla 1, 2, 3, 4 ve 5 $\mu\text{L}/\text{dak}$ akış hızıyla desorpsiyon ortamı geçirilerek, basınç değerleri belirlenmiştir. Bu test MIP ve NIP ile dolgulu kolonlar için uygulanmıştır.

3.2.2.10. Sürekli Sistemde Tekrar Kullanılabilirlik Testi

Kesikli sistemde olduğu gibi, sürekli sistemde de moleküler baskılı mikrokürelerden tekrar kullanılmaları halinde kararlı bir performans sergilemeleri beklenir. Bu amaçla, manyetik olmayan moleküler baskılanmış mikroküreler mikrokolonda 4 kez adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsüne tabi tutulmuştur. Bu döngü uygulanırken her seferinde kolondan yaklaşık 30 dakika boyunca 2 $\mu\text{L}/\text{dak}$ akış hızında fosfat tamponu geçirilmiş, ardından 0.05 mg FA/mL PB derişimindeki FA çözeltisi mikrokolona beslenerek çıkış akımı 6 μL 'lik hacimler halinde ayrı ependoflarda toplanmıştır.

Örneklerin 281 nm’de absorbans değerleri okunurken mikrokolondan bir yandan desorpsiyon ortamı (asetik asit + SDS + su) geçirilip, mikrokolon ikinci kez adsorpsiyona hazırlanmıştır. 4 tekrar sonucunda okunan tüm değerler ile adsorpsiyon kapasiteleri hesaplanıp, grafikte gösterilmiş ve sürekli sistemin FA izolasyonu için tekrarlı kullanılabilirliği belirlenmiştir.

3.3. Silika Bazlı Mikrokürelerin ve Moleküler Baskılanmış Mikrokürelerin Karakterizasyonu

3.3.1. Gözenek Boyutu ve Özgül Yüzey Alanı Ölçümü

Laboratuvarımızdaki Quantochrome, Nova 2200e cihazı sayesinde sentezlenen mikrokürelerin gözenek boy dağılımı ve özgül yüzey alanı, azot adsorpsiyon/desorpsiyon yöntemi ile ölçülmüştür. Bu uygulamada öncelikle mikroküreler 80°C’de 24 saat boyunca kurutulmuştur. Yaklaşık 0.05 g ağırlığındaki mikroküreler cihaza konulmuş ve 250°C’de 6 saat boyunca vakumlanarak mikrokürelerdeki nemin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Sıvı azot içerisine konulan örnek haznesinde ölçüm yapılmıştır ve azot gazının mikroküreler üzerinden geçirilerek mikrokürelere adsorplanması sağlanmıştır. Azotun buhar basıncı kullanılarak, adsorplanan miktar hesaplanmıştır. Brunauer-Emmett-Teller (BET) modeline göre azotun adsorpsiyon/desorpsiyon izotermi göz önüne alınarak örneğin özgül yüzey alanı bulunmuştur.

3.3.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Bu aşamada, SiO₂, MIP, NIP ve manyetik formları olan Mag-SiO₂, MMIP, MNIP örnekleri hazırlanarak farklı büyütme oranları ile SEM görüntüleri çekilmiş, boy dağılımı ve yüzey morfolojileri hakkında bilgi edinilmiştir. Hazırlık aşamasında sulu mikroküre dispersiyonu, SEM cihazının (FEI, Quanta 200 FEG, A.B.D.) örnek diskine yapıştırılmış karbon bandına yayılarak konulmuş ve oda sıcaklığında kurumaması beklenmiştir. Daha sonra kuru mikroküre örneği, plazma ortamında fiziksel buhar biriktirme yöntemiyle (PECS, Gatan, 682) altın ile kaplanmıştır. Bu sayede örnekler iletken forma dönüştürülmüştür. Yaklaşık 80-100 mikrokürenin bulunduğu SEM fotoğraflarında ortalama çap, D_n (µm) ve boy dağılım katsayısı, CV(%) aşağıdaki ifadeler yardımıyla hesaplanmıştır.

$$D_n = \sum N_i D_i / \sum N_i \quad (3.7)$$

$$CV = [(\sum N_i (D_i - D_n)^2 / [N_T - 1])^{1/2} / D_n] \times 100 \quad (3.8)$$

Burada N_i , her fotoğrafta D_i (μm) çapındaki mikrokürelerin sayısıdır. N_T toplam mikroküre sayısıdır. Hesaplanan CV değeri, boy dağılımı değişim katsayısıdır ve mikrokürelerin monodispers özelliğini göstermektedir.



Şekil 3.4. Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

3.3.3. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM)

Tezin bu kısmında, mikrokürelerin üzerindeki polimerik katman incelenmiştir. SEM, bu polimerik katmanı incelemek için yeterli olmadığından TEM cihazı (FEI, Tecnai, A.B.D.) kullanılmıştır. Analiz için SiO_2 , MIP, NIP, Mag- SiO_2 , MMIP ve MNIP örnekleri distile su ile 1/1000 oranında seyreltilerek hazırlanmıştır. Örneklerden 10'ar μL alınıp, TEM gridleri üzerinde kurutulduktan sonra cihaza yerleştirilmiştir. Görüntüler alınmadan önce örnekler 4 dakika vakumlanarak sudan uzaklaştırılmışlardır. Vakumlama işleminden sonra görüntü alımı yapılmıştır. MIP ve MMIP üzerindeki polimer tabaka içeriğindeki atomların miktar tayini tespiti için ise enerji saçınımlı X-ışını spektroskopisi (EDX) kullanılmıştır.



Şekil 3.5. Geçirimli elektron mikroskobu (TEM)

3.3.4. Titreşimli Örnek Manyetometresi (VSM)

Manyetik silika mikrokürelerin doygunluk manyetizasyonu, titreşimli örnek manyetometresi (Vibrating Sample Magnetometer, VSM, Cryogenic Limited, PPM System, İngiltere) ile ölçülmektedir. Bu ölçümde öncelikle mikroküreler 24 saat boyunca 80°C’de kurutulmuştur, sonrasında MMIP için 3mg, MNIP için ise 9.2mg mikroküre örneği cihazdaki örnek haznesine konularak, süperiletken mıknatısın olduğu sistemde manyetik alana bırakılmıştır. Bunun sonucunda, manyetik alan şiddetine karşı manyetizasyonu gösteren eğriler oluşturularak değerlendirilmiştir.

3.3.5. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR-ATR)

Tezin bu aşamasında manyetik olmayan ve manyetik formdaki moleküler baskılanmış silika mikrokürelerin yapılarındaki fonksiyonel grupları tayin edebilmek için FTIR-ATR analizi yapılmıştır. Sulu ortamdaki mikrokürelerden yaklaşık 2mg örnekler alınarak, 24 saat boyunca 80°C’deki etüvde kurutulmuş ve analiz gerçekleştirilmiştir.

FTIR-ATR analizi, Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Merkez Laboratuvarı'nda bulunan FTIR spektroskopisinde (Thermo Fisher Scientific, Nicolet 6700, A.B.D.) “Attenuated Total Reflectance” formatında gerçekleştirilmiştir.



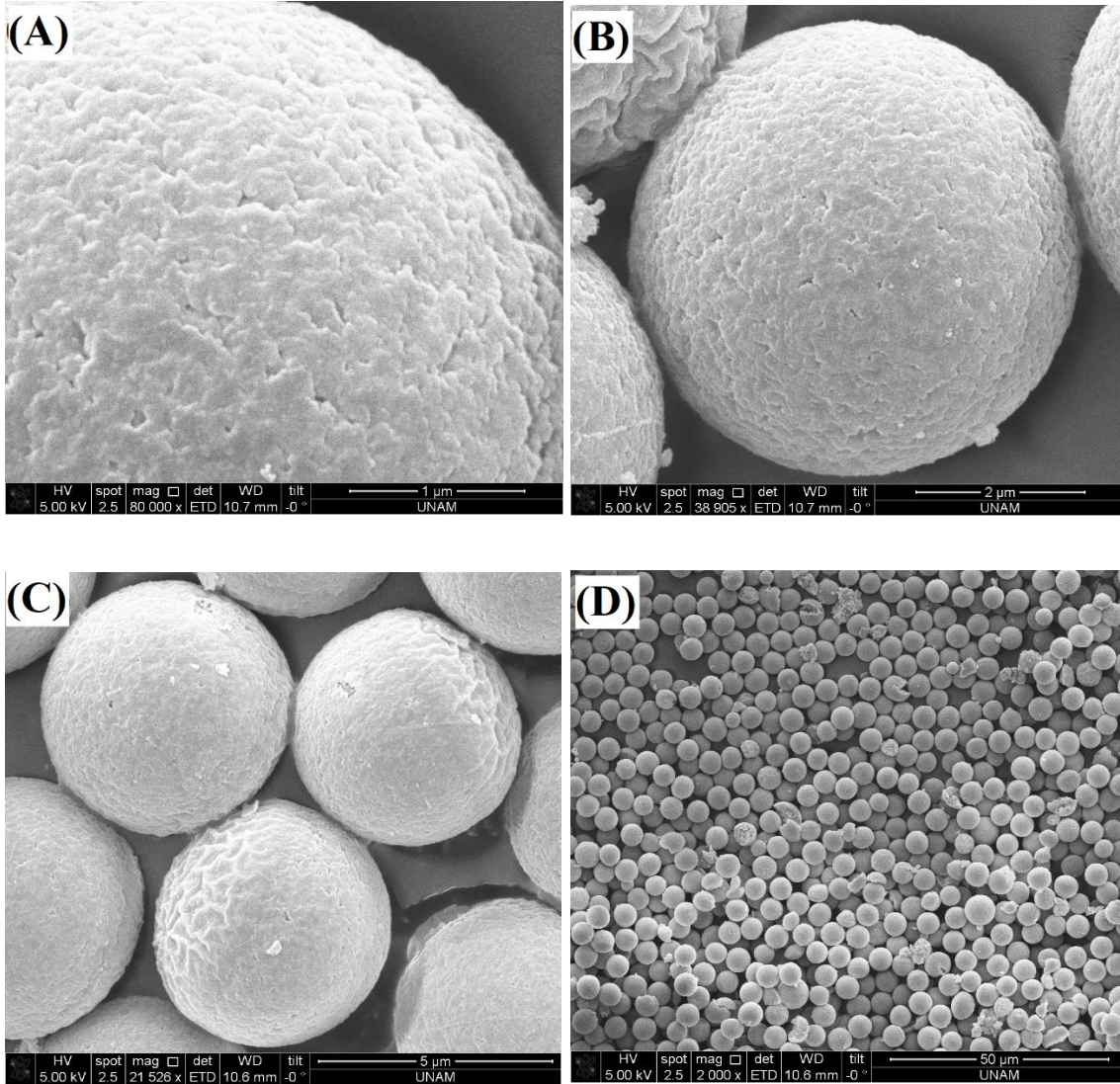
Şekil 3.5. Fourier Dönüştümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

4.SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Manyetik Olmayan ve Manyetik Formdaki Silika Mikroküreler ile Moleküler Baskılanmış Mikrokürelerin Karakterizasyonu

4.1.1. Silika Mikrokürelerin SEM Görüntüleri

Çok basamaklı hidroliz-kondenzasyon yöntemi ile sentezlenen monodispers gözenekli formdaki silika mikrokürelerin boy dağılımı ve yüzey morfolojisini gösteren SEM fotoğrafları farklı büyütme oranlarında alınarak Şekil 4.1’de verilmiştir.

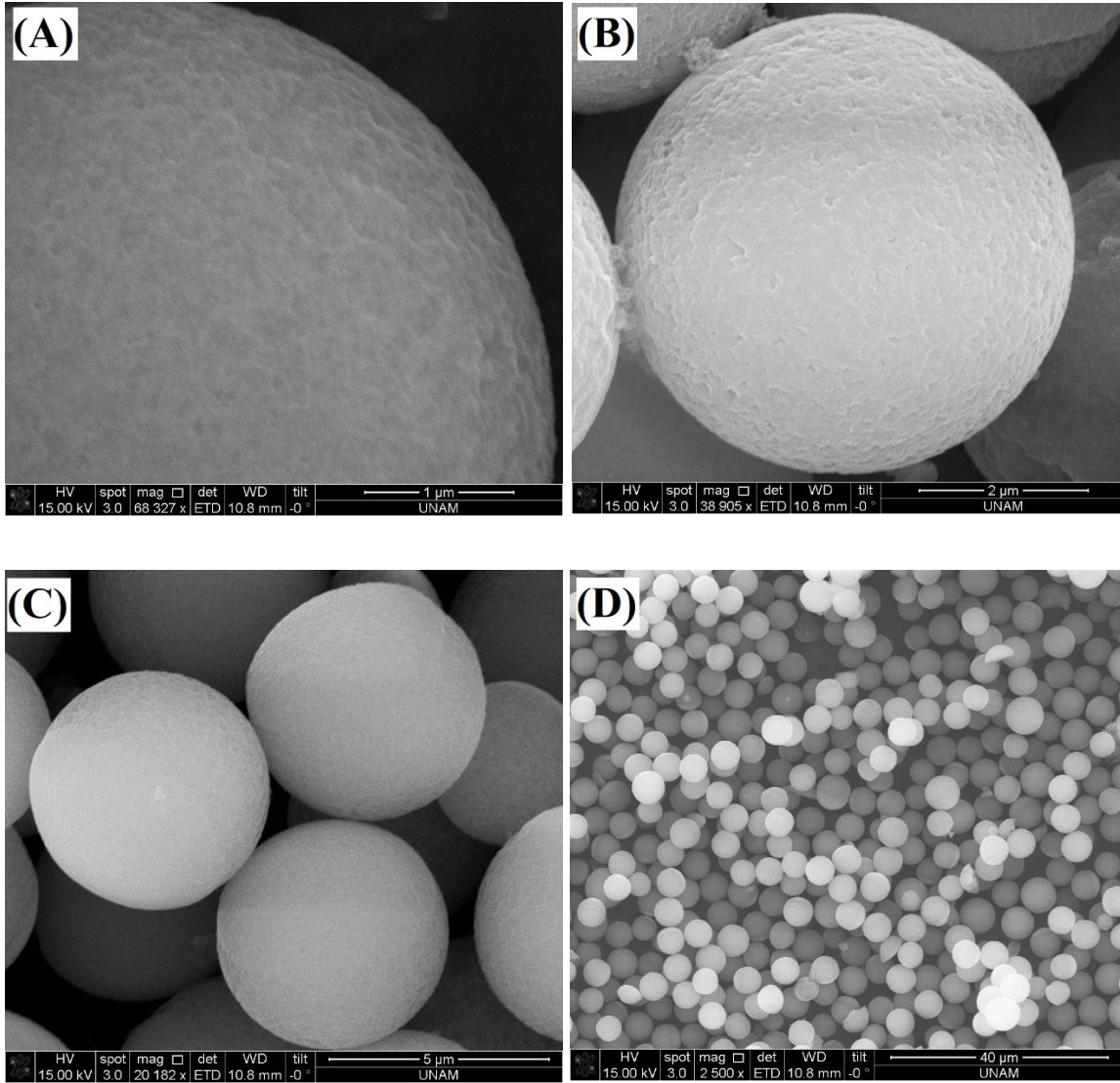


Şekil 4.2. Monodispers-gözenekli silika mikrokürelerin SEM görüntüleri. Büyütme oranı: (A) 80000X, (B) 38905X, (C) 21526X, (D) 2000X.

Görüldüğü gibi, silika mikroküreler küresel formdadır. Ayrıca yüzeylerinde gözenekli yapı varlığı dikkat çekmektedir. SEM fotoğrafları ile ortalama mikroküre boyutu $\pm 5.27 \mu\text{m}$ olarak hesaplanmıştır. Boy dağılımı değişim katsayısı (CV) silika mikroküreler için % 4.71 olarak hesaplanmıştır ve % 5'in altında olduğu takdirde eş boyutlu kabul edilmektedir [71]. Bu durumda mikrokürelerin eş-boyutlu olarak sentezlendiği görülmektedir.

4.1.2. Moleküler Baskılanmış Mikroküre (MIP)'lerin SEM Görüntüleri

Moleküler baskılama yöntemi uygulandıktan sonra elde ettiğimiz mikrokürelerin boy dağılımı ve yüzey morfolojisini gösteren farklı büyütme oranları ile alınan SEM görüntüleri Şekil 4.2'de verilmiştir.

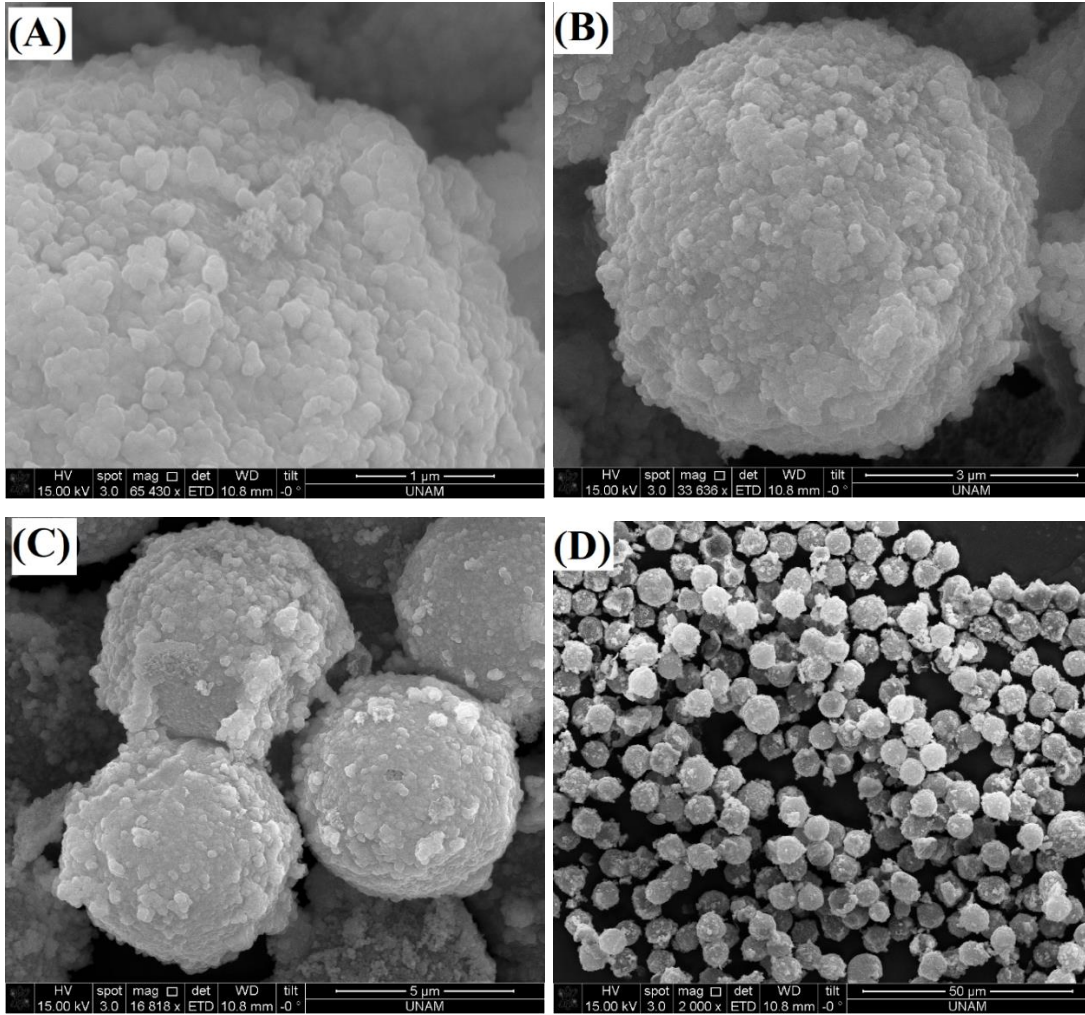


Şekil 4.3. Moleküler baskılanmış silika mikrokürelerin SEM görüntüleri. Büyütme oranı: (A) 68327X, (B) 38905X, (C) 20182X, (D) 2500X.

Şekil 4.2'den görüldüğü gibi silika mikroküreler kullanılarak uygulanan moleküler baskılama yöntemi sonucu elde edilen mikroküreler küresel formunu korumuş ve eş boyutlu olarak sentezlenmiştir. Yüzeyde oluşturulan polimerik katman nedeniyle moleküler baskılanmış mikroküreler yüzeyde daha az gözenekli bir yapıya sahip olmuştur. Ortalama mikroküre boyutu $\pm 5.45 \mu\text{m}$ olup, boy dağılımı değişim katsayısı değeri ise % 4.94'tür. Ortalama boyut değerinin silika mikrokürelerden yüksek olması, mikrokürelerin polimerik yapı ile kaplanmasından kaynaklanmaktadır.

4.1.3. Manyetik Silika Mikrokürelerin SEM Görüntüleri

Silika mikrokürelerin manyetik özellik kazanmasından sonraki yüzey morfolojisi ve boy dağılımı Şekil 4.3'de verilen SEM görüntüleri ile tanımlanmıştır.

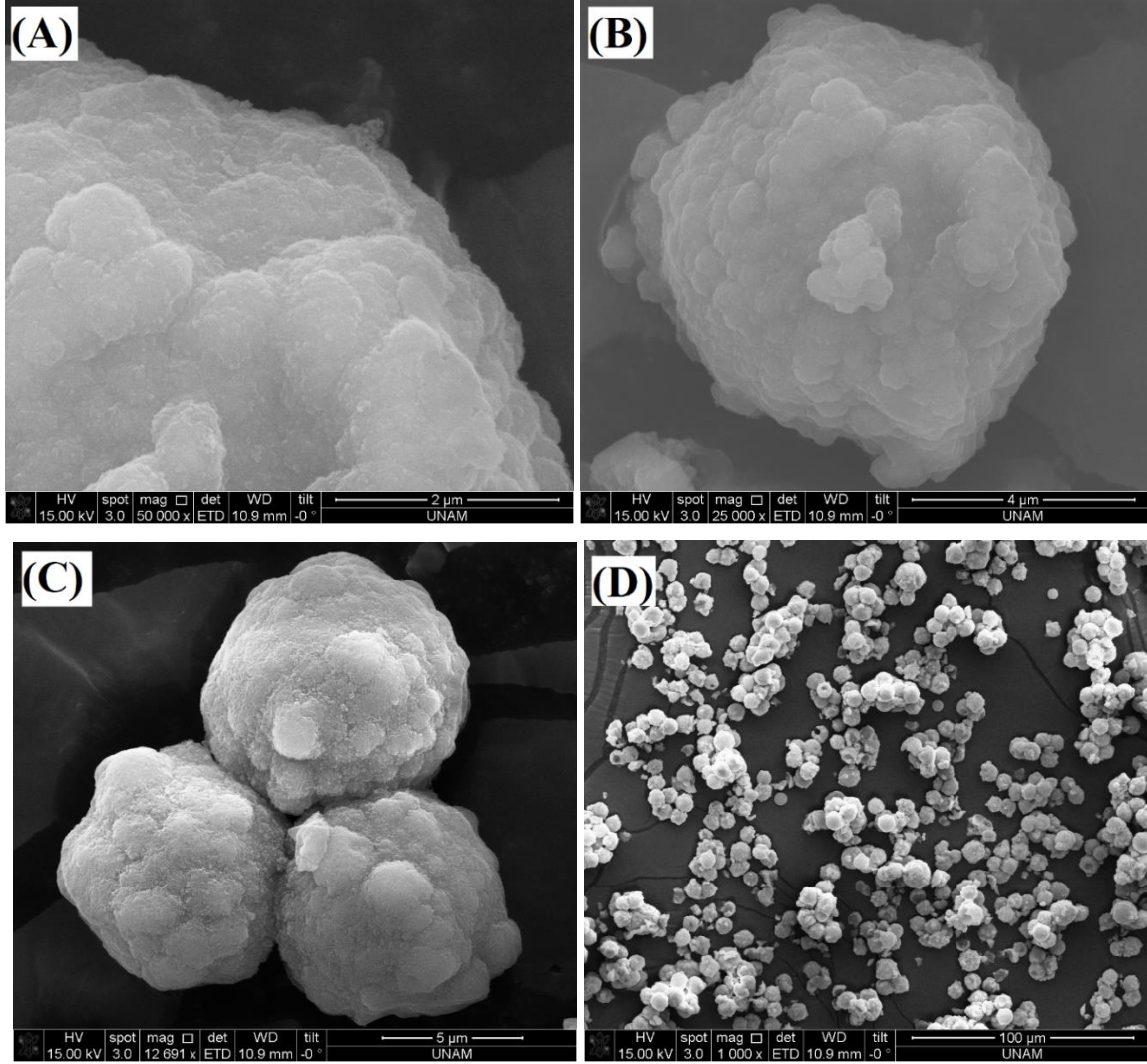


Şekil 4.4. Monodispers-gözenekli manyetik silika mikrokürelerin SEM görüntüleri. Büyütme oranı: (A) 65430X, (B) 33636X, (C) 16818X, (D) 2000X.

Mikroküreler dar boy dağılımına sahiptir. Ortalama boy değeri $\pm 6.33 \mu\text{m}$ 'dir ve boy dağılımı değişim katsayısı % 4.76 olarak hesaplanmıştır. Küresel form büyük ölçüde korunmuş olup yüzeyde gözenekli bir yapının varlığı dikkat çekmektedir.

4.1.4. Manyetik Formdaki Moleküler Baskılanmış Mikroküre (MMIP)'lerin SEM Görüntüleri

Manyetik formdaki silika mikrokürelerin kullanılmasıyla yapılan moleküler baskılama sonucu elde edilen mikrokürelerin boy dağılımı ve yüzey morfolojisi Şekil 4.4'de gösterilmiştir.

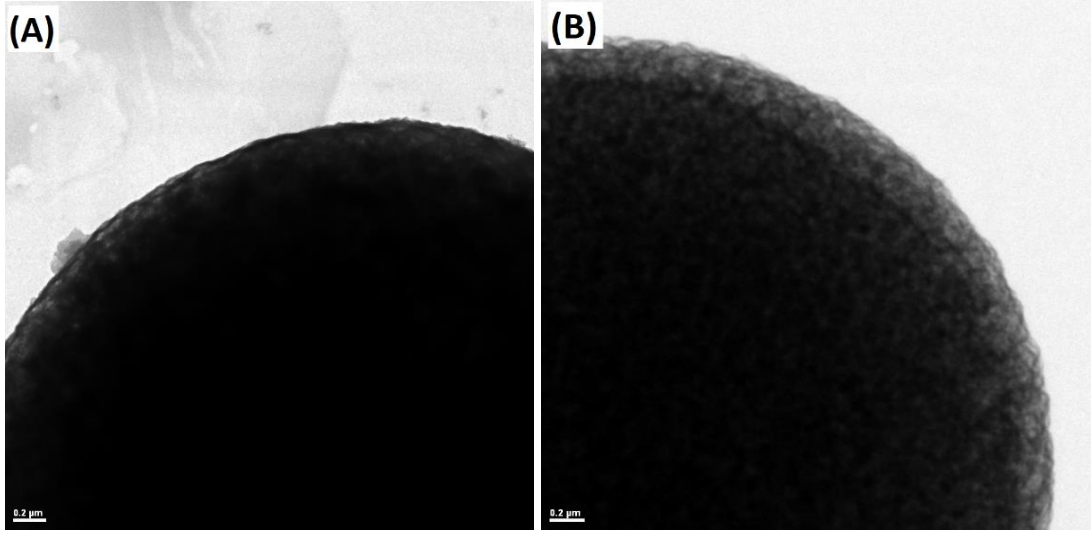


Şekil 4.5. Manyetik formdaki moleküler baskılanmış mikrokürelerin SEM görüntüleri. Büyütme oranı: (A) 50000X, (B) 25000X, (C) 12691X, (D) 1000X.

Moleküler baskılanmış manyetik silika mikroküreler de eş boyutlu bir dağılım göstermektedir ve küresel forma sahiptir. Moleküler baskılama sonucu yüzeylerindeki pürüzlülük ve gözeneklilik azalmıştır. Ortalama boyları $\pm 7.70 \mu\text{m}$ olup, manyetik silika mikrokürelerin ortalama boyutundan daha yüksektir. Bu durum oluşturulan polimerik kaplamadan ileri gelmektedir. Boy dağılımı değişim katsayısı değeri ise % 4.89 olarak hesaplanmıştır.

4.1.5. Silika Mikroküreler ile Moleküler Baskılanmış Mikroküre (MIP)'lerin TEM Görüntüleri

Moleküler baskılanmış mikrokürelerin yapısında oluşturulan polimerik katmanın incelenmesi amacıyla çekilen TEM görüntüleri Şekil 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4.6. Silika mikroküreler ile moleküler baskılanmış mikrokürelerin TEM görüntüleri. (A) Silika mikroküre (B) Moleküler baskılanmış mikroküre

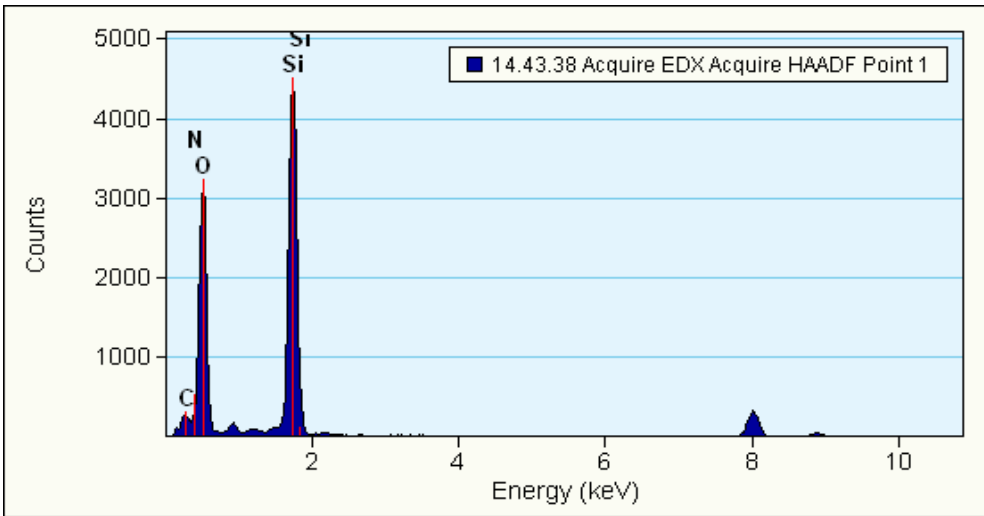
Şekil 4.5'te görüldüğü gibi, silika mikrokürenin yüzeyinde bir katman yoktur. Fakat moleküler baskılama sonucu elde ettiğimiz mikrokürelerde polimerik katman varlığı açıkça görünmüştür. TEM çekimi sırasında normal ve manyetik formda olan silika mikrokürelerin yüzey bileşimleri EDX ile incelenmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2'de verilmiştir. Moleküler baskılama sonrası elde ettiğimiz EDX spektrumları Şekil 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.1. Silika mikrokürelerin EDX ile saptanan yüzey bileşimi.

Element	Ağırlık %	Atomik %
Oksijen	46.88	60.77
Silisyum	53.11	39.22

Çizelge 4.2. Moleküler baskılanmış silika mikrokürelerin EDX ile saptanan yüzey bileşimi

Element	Ağırlık %	Atomik %
Oksijen	47.83	54.77
Silisyum	37.71	24.59
Karbon	7.98	12.17
Azot	6.46	8.45

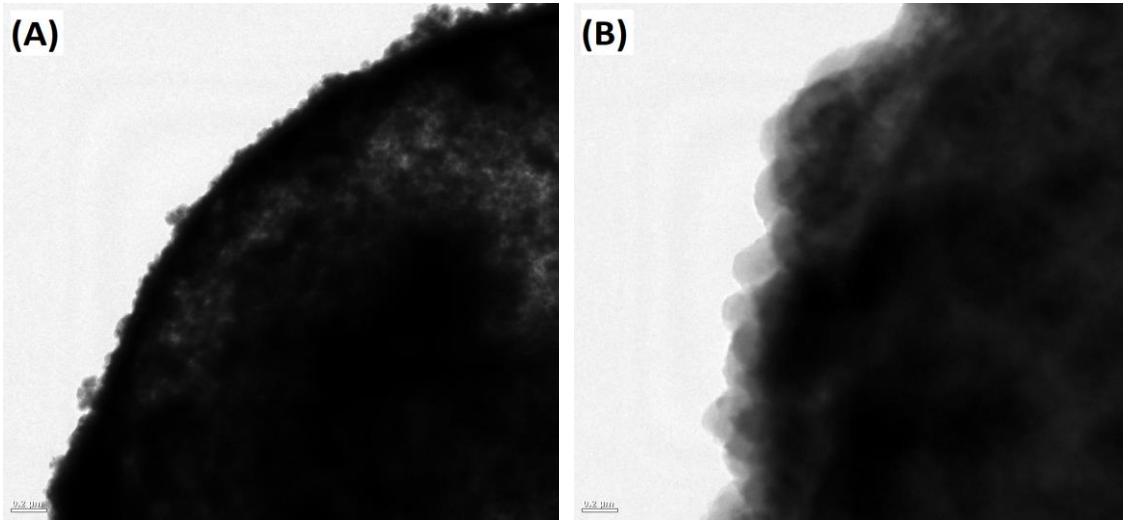


Şekil 4.7. Moleküler baskılanmış silika mikrokürelerin EDX spektrum görüntüsü

Bu sonuçlardan görüldüğü gibi moleküler baskılanmış silika mikrokürelerin yüzeyinde oluşturulan polimerik katman içerisinde bulunan 1-vinilimidazol birimlerinden gelen, azot ve tüm monomerlerden gelen karbon atomları EDX ile gösterilmiştir. Bu durum, mikroküre yüzeyinde polimer katmanının varlığını doğrulamaktadır.

4.1.6. Manyetik Silika Mikroküreler ile Manyetik Formdaki Moleküler Baskılanmış Mikroküre (MMIP)'lerin TEM Görüntüleri

Manyetik formdaki moleküler baskılanmış mikrokürelerin yapısında oluşturulan polimerik katmanın incelenmesi için çekilen TEM görüntüleri Şekil 4.7'de verilmiştir.



Şekil 4.7. Manyetik silika mikroküreler ile moleküler baskılanmış manyetik silika mikrokürelerin TEM görüntüleri. (A) Manyetik silika mikroküre (B) Moleküler baskılanmış manyetik silika mikroküre

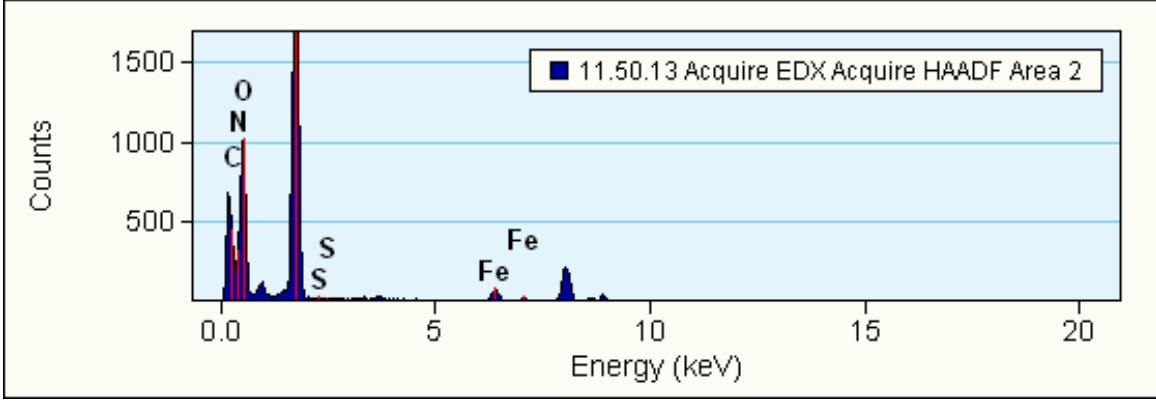
Şekil 4.7'ye bakıldığında, manyetik silika mikrokürenin yüzeyinde bir katman yoktur. Fakat moleküler baskılanmış manyetik silika mikroküreler üzerinde yüzeyde bir polimerik katman varlığı açıkça görülmektedir. TEM görüntüleme sırasında manyetik silika mikroküreler ve moleküler baskılanmış manyetik silika mikroküreler için EDX ile saptanan yüzey bileşimleri ise Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4'te verilmiştir. Moleküler baskılama sonrası elde ettiğimiz EDX spektrumları Şekil 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Manyetik silika mikrokürelerin EDX ile saptanan yüzey bileşimi.

Element	Ağırlık %	Atomik %
Oksijen	33.12	54.80
Silisyum	28.81	27.15
Demir	38.05	18.03

Çizelge 4.4. Moleküler baskılanmış manyetik silika mikrokürelerin EDX ile saptanan yüzey bileşimi.

Element	Ağırlık %	Atomik %
Oksijen	29.28	32.98
Silisyum	40.43	25.94
Demir	1.75	0.56
Karbon	17.78	26.68
Azot	10.73	13.81



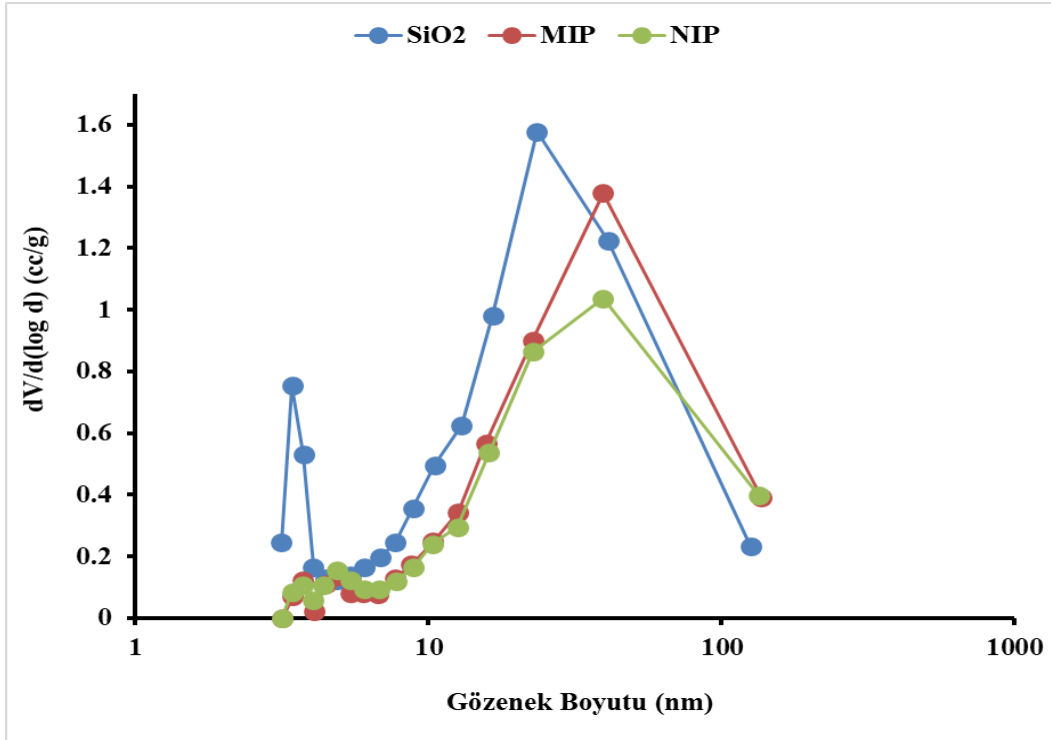
Şekil 4.8. Moleküler baskılanmış manyetik silika mikrokürelerin EDX spektrum görüntüsü

Buradan görüldüğü gibi atomik bileşen olarak manyetik formdaki silika mikrokürelerin yüzeyinde Si, O ve Fe yer almaktadır. Ancak, manyetik mikroküreler üzerine moleküler baskılama işleminin yapılmasıyla, oluşan polimerik tabakadan ötürü bu elementlere ek olarak tüm monomerlerden gelen C ve fonksiyonel monomerden gelen N atomları EDX ile saptanmaktadır.

4.1.7. Mikrokürelerin Gözeneklilik Özellikleri

Mikrokürelerin gözeneklilik özellikleri hakkında bilgi edinmek amacıyla BET (Brunauer-Emmett-Teller) cihazında azot adsorpsiyon/desorpsiyon yöntemi uygulanmış ve bunun sonucunda normal ve moleküler baskılanmış silika mikroküreler için özgül yüzey alanı, gözenek hacmi ve ortalama gözenek boyutu değerleri bulunmuştur. Mikrokürelerin gözenek boy dağılım eğrileri Şekil 4.9'da verilmiştir.

Şekil 4.9'da verilen gözenek boy dağılım eğrisi ve BET ile elde ettiğimiz sonuçlara dayanarak hesaplanan ortalama gözenek boyutu, özgül yüzey alanı ve gözenek hacmi değerleri Çizelge 4.5'te verilmektedir.



Şekil 4.9. Silika, moleküler baskılanmış silika ve moleküler baskılanmayan silika mikrokürelerin azot adsorpsiyon/desorpsiyon yöntemi ile elde edilen gözenek boy dağılım eğrileri.

Şekil 4.9 incelendiğinde, mikrokürelerin hem mezo-gözenekli, hem de makro-gözenekli bir yapıda olduğu görülmektedir.

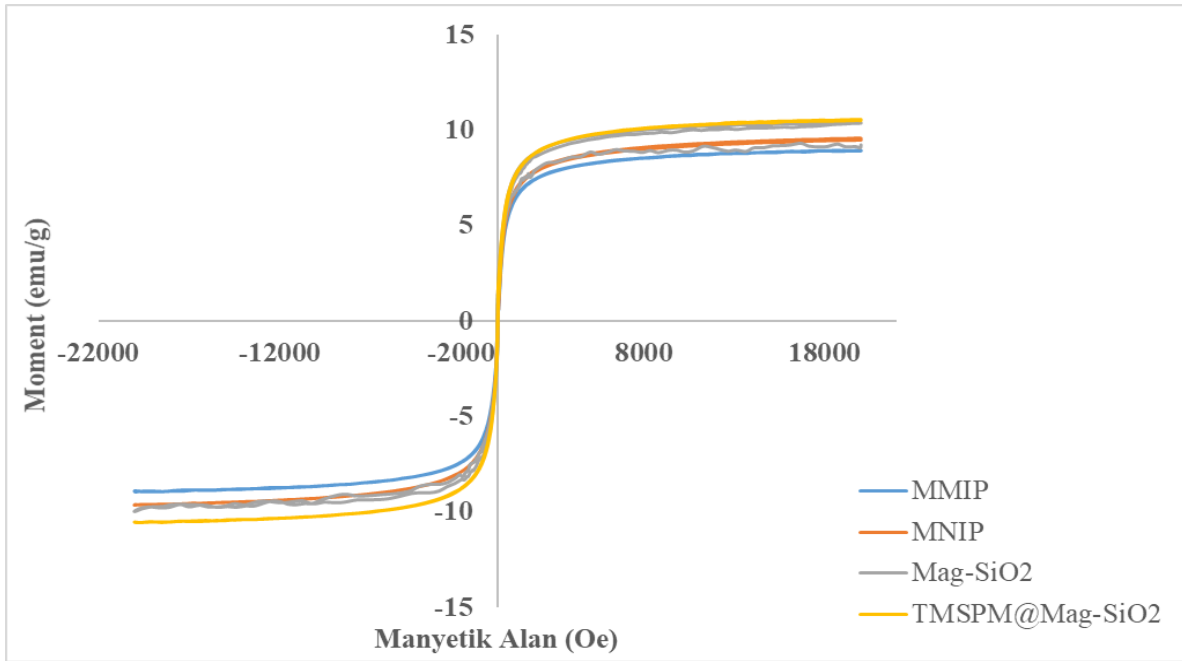
Çizelge 4.5. Silika, moleküler baskılanmış silika ve moleküler baskılanmayan silika mikrokürelerin gözenek boyutu, hacmi ve özgül yüzey alanı değerleri.

Mikroküre Türü	Özgül Yüzey Alanı(m ² /g)	Gözenek Hacmi(cc/g)	Ortalama Gözenek Boyutu(nm)
SiO ₂	373.9	1.163	12.44
MIP	182.9	0.937	20.49
NIP	158.0	0.840	21.25

Buradan görüldüğü gibi, silika mikrokürelere kıyasla moleküler baskılanmış ve moleküler baskılanmamış silika mikrokürelere, özgül yüzey alanı ve gözenek hacmi değerleri moleküler baskılama için kullanılan polimerik katman oluşmu nedeniyle fark edilir şekilde azalmıştır. Özgül yüzey alanında ortaya çıkan azalma özellikle küçük gözeneklerin polimerik katman ile dolduğunu göstermektedir. Ortalama gözenek boyutunda ise polimerik katman oluşumuyla bariz bir artış meydana gelmiştir. Bu durum, küçük gözeneklerin polimerik yapı ile dolduğunu destekleyen bir bulgudur. Manyetik mikrokürelere özgül yüzey alanı tayininde ise, moleküler baskılama öncesinde manyetik silika mikrokürelere 183 m²/g alana sahipken, moleküler baskılama sonrası mikrokürelere özgül yüzey alanı 5.70 m²/g'a düşmüştür. Bu durum, özellikle mezogözenek fraksiyonlarının polimerik katmanla iyi kaplandığını ve gözenekli yapının oldukça azaldığını vurgulamaktadır. Bu durum, manyetik mikrokürelere moleküler baskılama işleminin mikrokürelere yüzeyinde olduğunu göstermektedir.

4.1.8. Manyetik Mikrokürelere Manyetizasyonu

Manyetik mikrokürelere titreşimli örnek manyetometresi ile elde edilen manyetizasyon eğrileri Şekil 4.10'da verilmiştir.

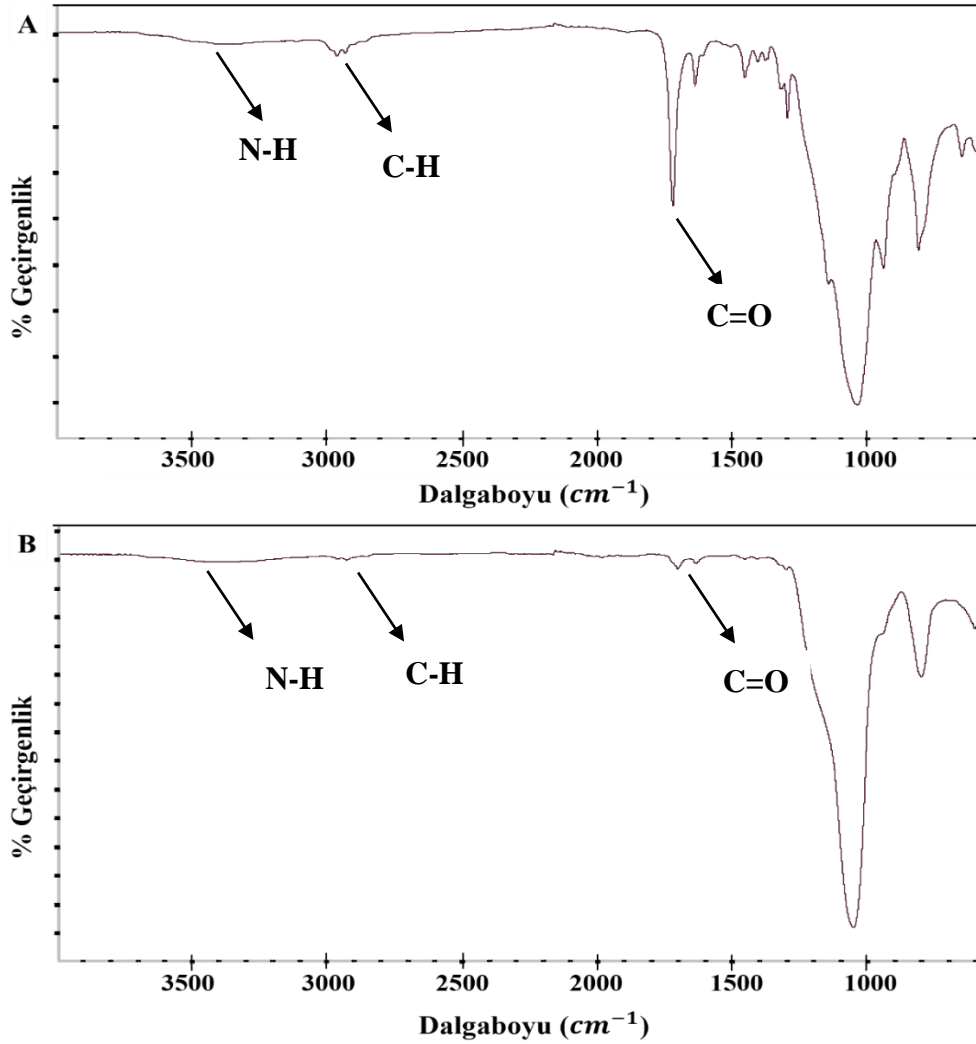


Şekil 4.10. Moleküler baskılanmış manyetik mikrokürelere (MMIP), moleküler baskılanmamış manyetik mikrokürelere (MNIP), manyetik silika (Mag-SiO₂) ve TMSPM bağlı manyetik silika (TMSPM@Mag-SiO₂) mikrokürelere titreşimli örnek manyetometresi ile elde edilen manyetizasyon eğrileri

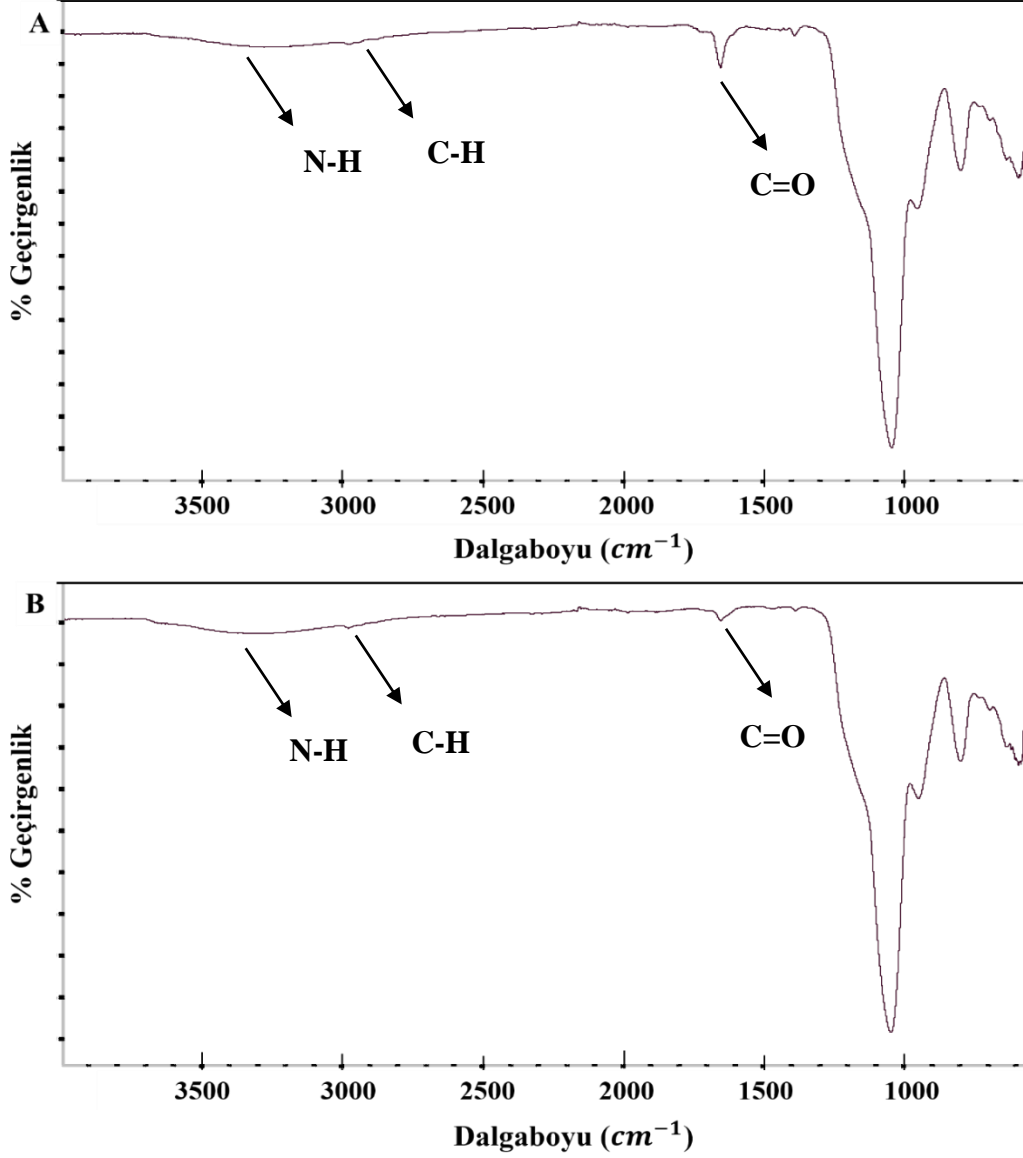
Şekil 4.10 incelendiğinde, manyetik silika mikrokürelerin doygunluk manyetizasyonu değeri yaklaşık 10 emu/g olarak bulunmuştur ve bu değerın moleküler baskılama sonucu yaklaşık % 5 oranında azaldığı görülmüştür. Bu durum polimerik katman oluşumuna bağlı kütle artışından kaynaklanmaktadır.

4.1.9. Manyetik Olmayan ve Manyetik Formdaki Moleküler Baskılanmış Silika Mikrokürelerin FTIR-ATR Spektrumları

FTIR-ATR analizi, manyetik olmayan ve manyetik formdaki moleküler baskılanmış silika mikroküreler ile yapılmıştır. Bu örneklerin 4000-500 cm^{-1} dalga boyundaki FTIR-ATR 4.11 ve Şekil 4.12’de verilmektedir.



Şekil 4.11. Moleküler baskılanmış silika mikrokürelerin FTIR-ATR spektrumları. (A) Moleküler baskılanmış, FA içeren silika mikroküreler (MIP-FA), (B) Moleküler baskılanmış, FA içermeyen silika mikroküreler (MIP).



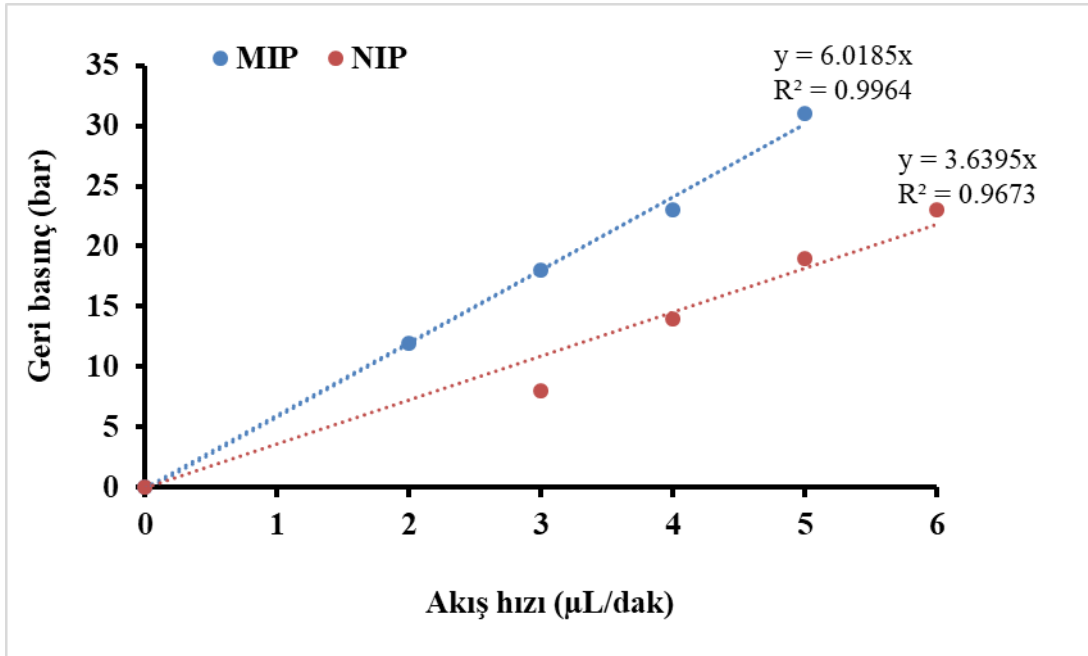
Şekil 4.12. Moleküler baskılanmış manyetik silika mikrokürelerin FTIR-ATR spektrumları. (A) Moleküler baskılanmış, FA içeren manyetik silika mikroküreler (MMIP-FA), (B) Moleküler baskılanmış, FA içermeyen manyetik silika mikroküreler (MMIP).

Her iki şekildeki spektrumlar incelendiğinde, moleküler baskılama işlemi sonucu, yaklaşık 3450 cm⁻¹ dalga boyunda ortaya çıkan amin grubu (N-H) bandı dikkat çekmektedir. Bu amin grubunun kaynağı sentezdeki fonksiyonel monomer kaynağı olan 1-vinilimidazol'dür. 3000-2840 cm⁻¹ dalga boyu aralığında ise yine moleküler baskılama sonrası ortaya çıkan alifatik C-H bağlarına ait bant görülmüştür.

Her iki şekilde de FA içeren ve içermeyen formlarda moleküler baskılama sonrası EDMA ve/veya FA'in yapıya katılması ile karbonil bandı 1600-1700 cm^{-1} dalga boyu aralığında gözlenmektedir. FA'in yıkanarak yapıdan uzaklaştırılması ile bant şiddetinde azalma oluşmakta ve yapıda sadece EDMA'dan gelen daha zayıf karbonil bandı görülmektedir.

4.1.10. Sürekli Sistemde Basınç Testi

Sürekli sistemde yapılan çalışmalarda kullanılan mikrokolonun geri basınç-hareketli faz akış hızı ilişkisini tanımlamak amacıyla, farklı akış hızlarındaki basınç değeri kaydedilerek basınç testi yapılmıştır. Bu test sonucunda elde edilen değerler Şekil 4.13'te verilmiştir.

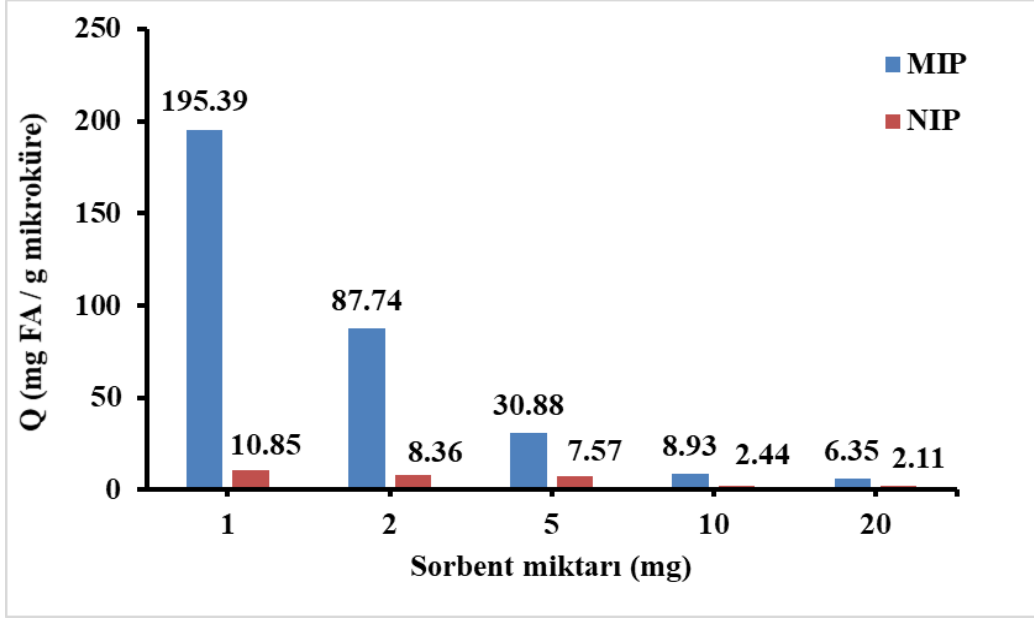


Şekil 4.13. Sürekli sistemde basınç testi. Kolon boyutları: 300 mm iç çap, Uzunluk: 500 mm. Hareketli faz: %10 asetik asit + %10 SDS + su.

Şekil 4.13'e göre, MIP ve NIP'in her ikisinde de akış hızına karşılık basınç değerlerinde doğrusal bir artış olduğu görülmüştür. Bu durum kolona doldurulan mikrokürelerin hareketli faz geçirgenliğinin artan basınç ile değişmediğini ve mikrokolonun kararlı bir akış davranışı sergilediğini ortaya koymuştur.

4.2. Kesikli Sistemde Moleküler Baskılanmış ve Baskılanmamış Silika Mikroküreler ile FA Adsorpsiyonu

Kesikli sistemde yapılan FA adsorpsiyonu sırasında sorbent miktarları 4 mL adsorpsiyon hacminde sırasıyla 1, 2, 5, 10 ve 20 mg olacak şekilde seçilmiştir. MIP ve NIP için FA denge adsorpsiyon kapasiteleri (Q) hesaplanarak Şekil 4.14'te gösterilmiştir. Q değerlerinin birbirlerine oranları sonucunda ise baskılama faktörü (IF) bulunarak, Çizelge 4.6'da verilmiştir.



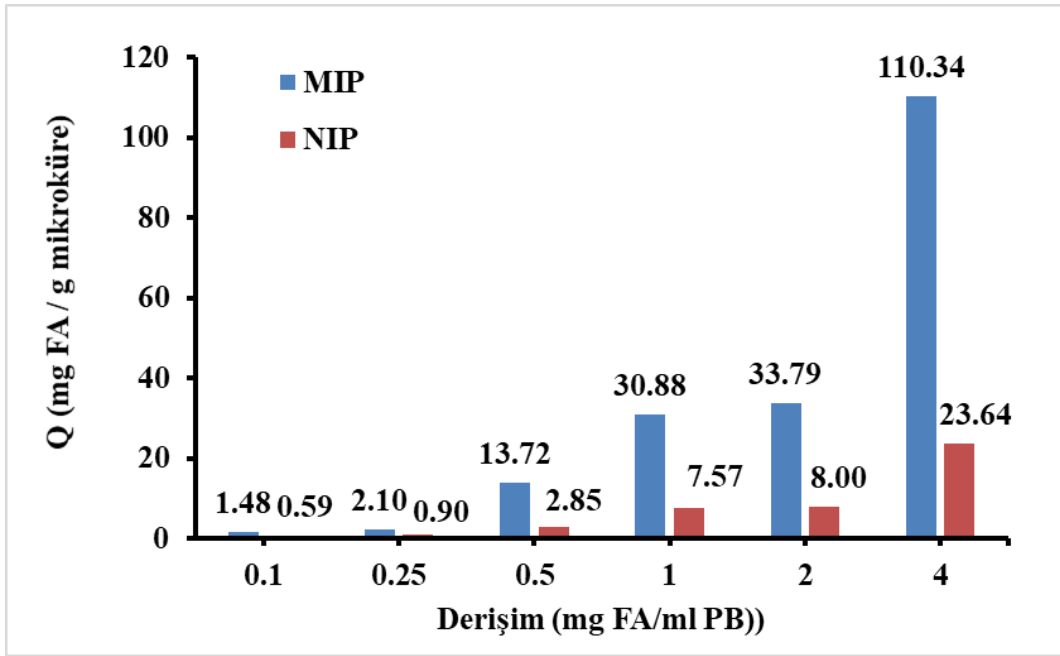
Şekil 4.14. Kesikli sistemde MIP ve NIP için sorbent taraması. Koşullar: Adsorpsiyon hacmi: 4 mL, FA derişimi: 1 mg/mL, Süre: 2 saat, Oda sıcaklığı, Karıştırma hızı: 100rpm.

Çizelge 4.6. Kesikli sistemde MIP ve NIP için yapılan sorbent taraması sonucu bulunan moleküler baskılama faktörü değerleri.

Sorbent Miktarı (mg)	Q, MIP (mg FA/ g mikroküre)	Q, NIP (mg FA/ g mikroküre)	IF
1	195.39	10.85	18.01
2	87.74	8.36	10.49
5	30.88	7.57	4.08
10	8.93	2.44	3.66
20	6.35	2.11	3.01

Çizelge 4.6 değerlendirildiğinde, sorbent miktarının artmasıyla beraber MIP ve NIP için de adsorpsiyon kapasitesi değerlerinin düştüğü ve buna bağlı olarak da baskılama faktörünün azaldığı görülmektedir. Ancak bulunan baskılama faktörü değerlerine bakıldığında silika mikroküreler üzerine FA'nın başarılı şekilde baskılandığı açıkça görülmektedir.

Sorbent taramasından sonra en güvenilir verinin 5mg sorbent için alındığı düşünülerek, 5 mg sorbent optimum değer olarak alınıp, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2 ve 4 mg FA/mL PB derişimlerinde kesikli sistemde adsorpsiyon deneyleri yapılmış ve FA denge adsorpsiyon kapasiteleri hesaplanmıştır. Hesaplanan değerler Şekil 4.15'te gösterilmiştir.



Şekil 4.15. Kesikli sistemde MIP ve NIP için FA başlangıç derişimi taraması. Koşullar: Adsorpsiyon hacmi: 4 mL, Sorbent miktarı: 5 mg, Süre: 2 saat, Oda sıcaklığı, Karıştırma hızı: 100 rpm.

Şekil 4.15'te görülen MIP ve NIP için denge adsorpsiyon kapasitelerinin birbirlerine oranlanması ile elde edilen moleküler baskılama faktörü değerleri karşılaştırmalı olarak Çizelge 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Kesikli sistemde MIP ve NIP için yapılan FA başlangıç derişimi taraması sonucu bulunan moleküler baskılama faktörü değerleri.

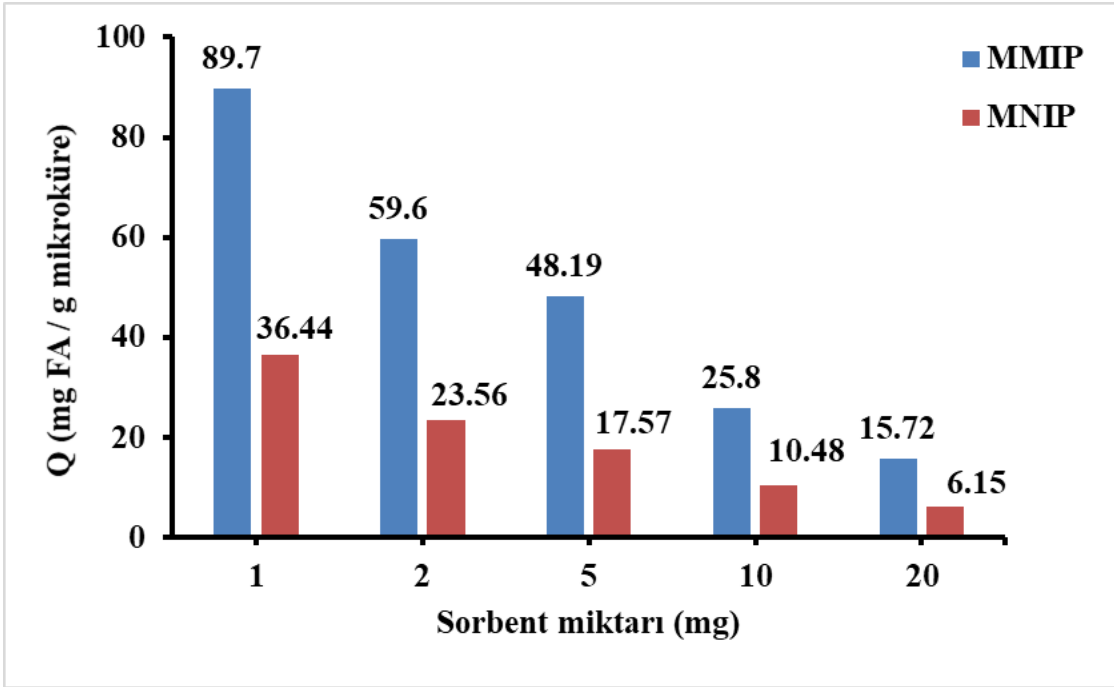
Derişim (mg FA/mL PB)	Q, MIP (mg FA/ g mikroküre)	Q, NIP (mg FA/ g mikroküre)	IF
0.1	1.48	0.59	2.51
0.25	2.10	0.90	2.33
0.5	13.72	2.85	4.81
1	30.88	7.57	4.08
2	33.79	8.00	4.22
4	110.34	23.64	4.67

Çizelge 4.7'ye göre, FA başlangıç derişimi arttırıldığında, özellikle MIP için denge adsorpsiyon değerinde bariz bir artış meydana gelmiştir. Buna bağılı olarak özellikle yüksek FA başlangıç derişimlerinde 4'ten büyük moleküler baskılama faktörü değerleri elde edilmiştir.

4.3. Kesikli Sistemde MMIP ve MNIP ile FA Adsorpsiyonu

Kesikli sistemde yapılan FA adsorpsiyon deneylerinde, MIP ve NIP için yapılan sorbent derişimi ve FA başlangıç derişimi taramaları, MMIP ve MNIP için de uygulanmıştır. MMIP ve MNIP için yapılan sorbent miktarının FA denge adsorpsiyonuna etkisi MMIP ve MNIP için karşılaştırmalı olarak Şekil 4.16'da verilmiştir.

Şekil 4.16 değerlendirildiğinde, MMIP ve MNIP için elde edilen FA denge adsorpsiyon kapasitesi değerlerinin birbirlerine oranı ile elde edilen IF değerleri hesaplanmış ve Çizelge 4.8'de gösterilmiştir.



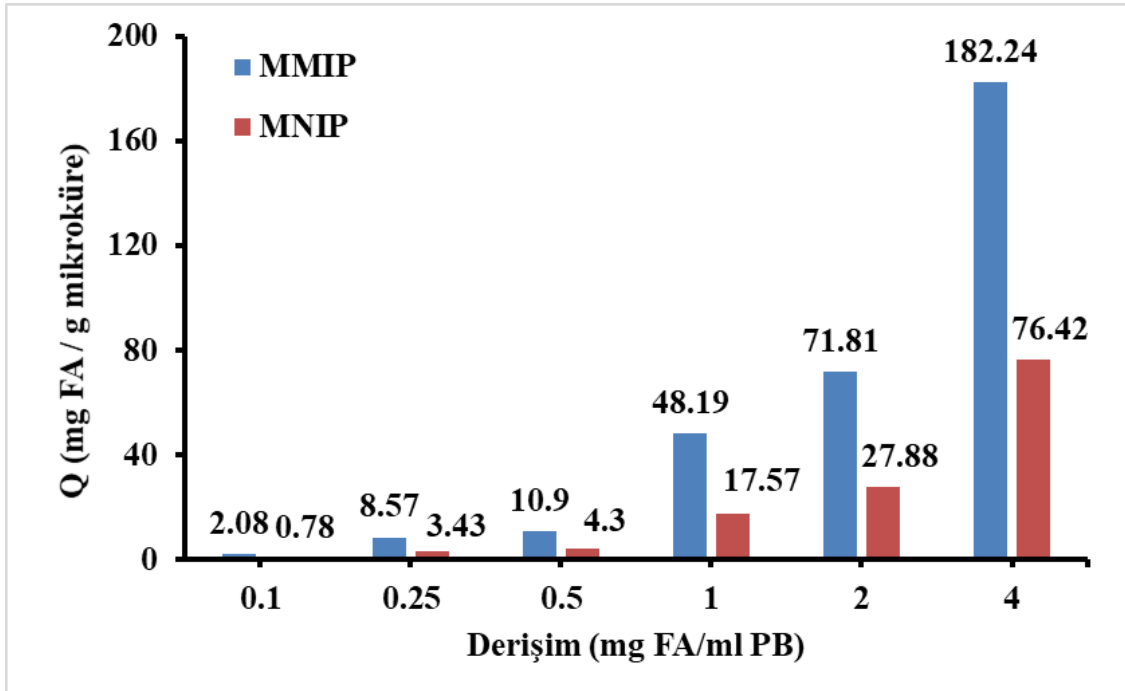
Şekil 4.16. Kesikli sistemde MMIP ve MNIP için sorbent miktarının değiştirilmesi ile FA denge adsorpsiyonunun değişimi. Koşullar: Adsorpsiyon hacmi: 4 mL, FA başlangıç derişimi: 1 mg/mL, Süre: 2 saat, Oda sıcaklığı, Karıştırma hızı: 100 rpm.

Çizelge 4.8. Kesikli sistemde MMIP ve MNIP için yapılan sorbent derişimi taraması sonucu bulunan moleküler baskılama faktörü değerleri.

Sorbent Miktarı (mg)	Q, MMIP (mg FA/ g mikroüre)	Q, MNIP (mg FA/ g mikroüre)	IF
1	89.70	36.44	2.46
2	59.60	23.56	2.53
5	48.19	17.57	2.74
10	25.80	10.48	2.46
20	15.72	6.15	2.57

MMIP ve MNIP'ler için elde edilen denge adsorpsiyon kapasitesi değerlerinin artan sorbent miktarı ile azalmasına karşın moleküler baskılama faktörünün sabit kaldığı görülmektedir. Bu durum, moleküler baskılama uygulaması sonrasında manyetik formdaki mikrokürelerin polimerik yapı ile kaplanmasından dolayı gözenekliliğinin büyük ölçüde azalması ve özgül yüzey alanının düşmesi sonucu baskılama işleminin mikrokürelerin yüzeyinde gerçekleştiğinin göstergesidir. Ayrıca bu sonuçlardan yola çıkarak, FA moleküler baskılanmasının başarılı bir şekilde yapıldığını gösteren bir diğer bulgudur.

MMIP ve MNIP'ler için yapılan FA başlangıç derişimi taraması sonuçları ise Şekil 4.17'de verilmektedir. Şekil 4.17 değerlendirildiğinde, MMIP ve MNIP için bulunan FA denge adsorpsiyon kapasitelerinin birbirlerine oranlanması ile elde edilen IF değerleri karşılaştırmalı olarak Çizelge 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.17. Kesikli sistemde MMIP ve MNIP için FA başlangıç derişimi taraması. Koşullar: Adsorpsiyon hacmi: 4 mL, Sorbent miktarı: 5 mg, Süre: 2 saat, Oda sıcaklığı, Karıştırma hızı: 100 rpm.

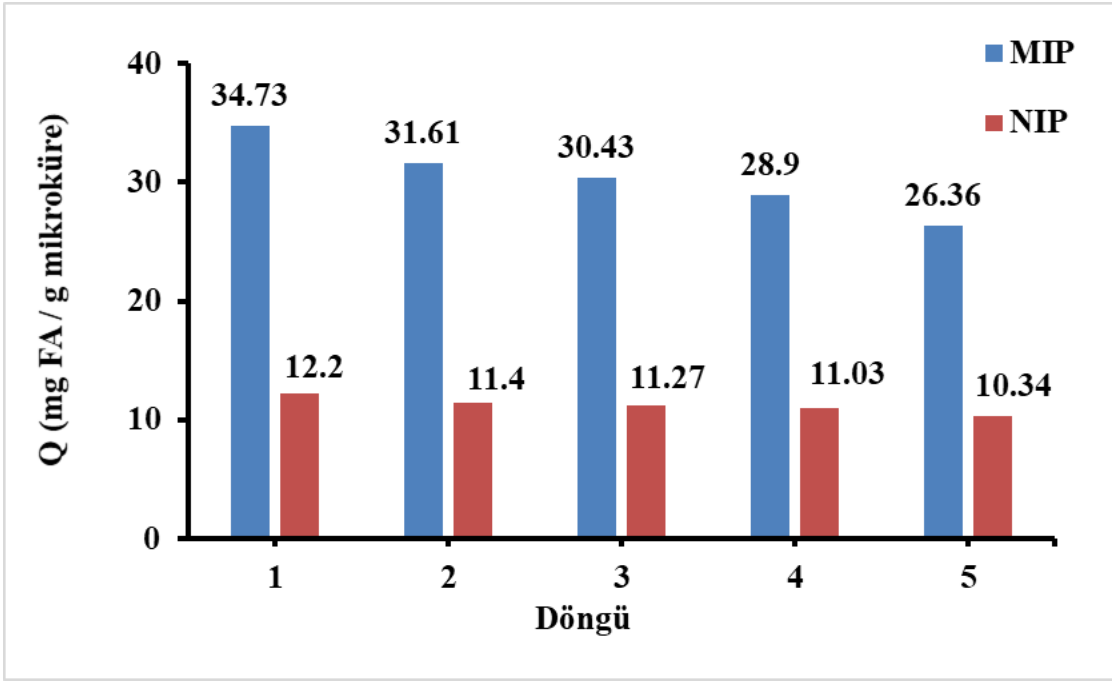
Çizelge 4.9. Kesikli sistemde MMIP ve MNIP için yapılan FA başlangıç derişimi taraması sonucu bulunan moleküler baskılama faktörü değerleri.

Derişim (mg FA/mL PB)	Q, MMIP (mg FA/ g mikroküre)	Q, MNIP (mg FA/ g mikroküre)	IF
0.1	2.08	0.78	2.67
0.25	8.57	3.43	2.50
0.5	10.90	4.30	2.53
1	48.19	17.57	2.74
2	71.81	27.88	2.58
4	182.24	76.42	2.38

Manyetik formdaki MIP ve NIP için yapılan FA Başlangıç derişimi taraması sonucunda FA derişiminin artışı ile manyetik olmayan sorbente benzer şekilde FA denge adsorpsiyonun arttığı gözlenmiştir. Buradaki bir diğer önemli bulgu derişimden bağımsız olarak sabit bir IF değerinin gözlenmiş olmasıdır.

4.4. Kesikli Sistemde Tekrar Kullanılabilirlik Testi

Kesikli sistemde moleküler baskılanmış sorbentin tekrar kullanılabilme potansiyelini ölçmek amacıyla, optimum değer olarak kabul edilen 5 mg sorbent için 5 kez peş peşe adsorpsiyon ve desorpsiyon deneyleri yapılarak MIP ve NIP için FA denge adsorpsiyon kapasitesi değerleri ve buna bağı olarak baskılama faktörleri hesaplanmıştır. Aynı işlem, MMIP ve MNIP için de tekrarlanmıştır. MIP ve NIP için yapılan tekrar kullanılabilirlik testi sonucu elde edilen veriler Şekil 4.18’de verilmiştir. Şekil 4.18’deki Q değerleri temelinde hesaplanan IF değerleri Çizelge 4.10’da verilmiştir.

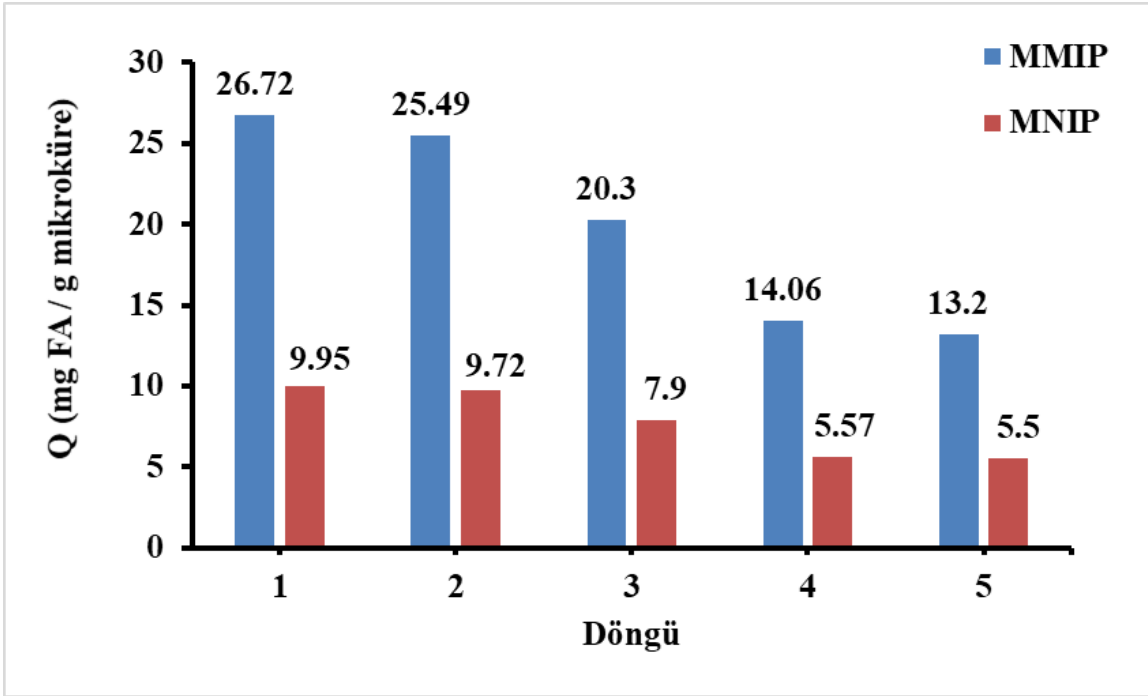


Şekil 4.18. Kesikli sistemde MIP ve NIP için tekrar kullanılabilirlik testi. Koşullar: Adsorpsiyon hacmi: 4 mL, FA başlangıç derişimi: 1 mg/mL, Sorbent miktarı: 5 mg, Süre: 2 saat, Oda sıcaklığı, Karıştırma hızı: 100rpm.

Çizelge 4.10. Kesikli sistemde MIP ve NIP için yapılan tekrar kullanılabilirlik testi sonucu hesaplanan baskılama faktörü değerleri

Döngü	Q, MIP (mg FA/ g mikroküre)	Q, NIP (mg FA/ g mikroküre)	IF
1	34.73	12.20	2.85
2	31.61	11.40	2.77
3	30.43	11.27	2.70
4	28.90	11.03	2.62
5	26.36	10.34	2.55

MMIP ve MNIP için yapılan tekrar kullanılabilirlik testi sonucu elde edilen FA denge adsorpsiyonu değerleri Şekil 4.19’da verilmiştir. Şekil 4.19’daki Q değerleri temelinde hesaplanan IF değerleri ise Çizelge 4.11’de verilmiştir.



Şekil 4.19. Kesikli sistemde MMIP ve MNIP için tekrar kullanılabilirlik testi. Koşullar: Adsorpsiyon hacmi: 4 mL, FA başlangıç derişimi: 1 mg/mL, Sorbent miktarı: 5 mg, Süre: 2 saat, Oda sıcaklığı, Karıştırma hızı: 100rpm.

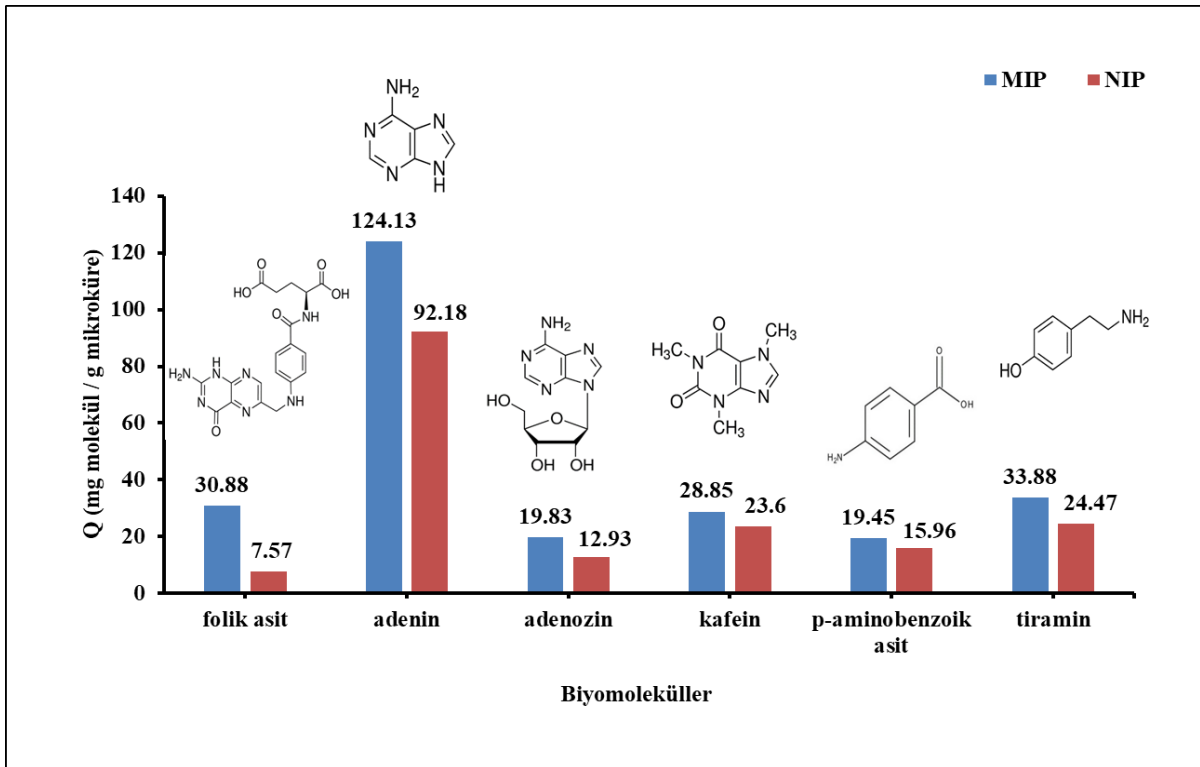
Çizelge 4.11. Kesikli sistemde MMIP ve MNIP için yapılan tekrar kullanılabilirlik testi sonucu hesaplanan baskılama faktörü değerleri.

Döngü	Q, MMIP (mg FA/ g mikroküre)	Q, MNIP (mg FA/ g mikroküre)	IF
1	26.72	9.95	2.69
2	25.49	9.72	2.62
3	20.30	7.90	2.57
4	14.06	5.57	2.52
5	13.20	5.50	2.40

Gerek normal, gerekse manyetik forma sahip moleküler baskılanmış sorbentler ile yapılan tekrar kullanılabilirlik testlerinde, FA denge adsorpsiyon değerinde, artan kullanım sayısı ile belirli bir düşüş gözlenmesine rağmen, moleküler baskılama faktörü değerinin bu durumdan etkilenmediği ve sabit kaldığı gözlenmiştir. Bu durum, her bir kullanım sonrası adsorplanan FA'nın kantitatif olarak desorpsiyon basamağında uzaklaştırılmaması ile açıklanabilir.

4.5. Kesikli Sistemde Seçicilik Testi

Seçicilik testinde, FA'in kimyasal yapısına benzer adenin, adenozin, kafein, p-aminobenzoik asit ve tiramin kullanılmıştır. Bu moleküller 5 mg sabit sorbent miktarı ile aynı adsorpsiyon koşullarına maruz bırakılmıştır. Bu test MIP&NIP ve MMIP&MNIP için yapılmıştır. Şekil 4.20'de MIP ve NIP için gösterilen FA denge adsorpsiyon kapasiteleri verilmektedir. Hesaplanan baskılama faktörleri ise Çizelge 4.12'de verilmektedir.



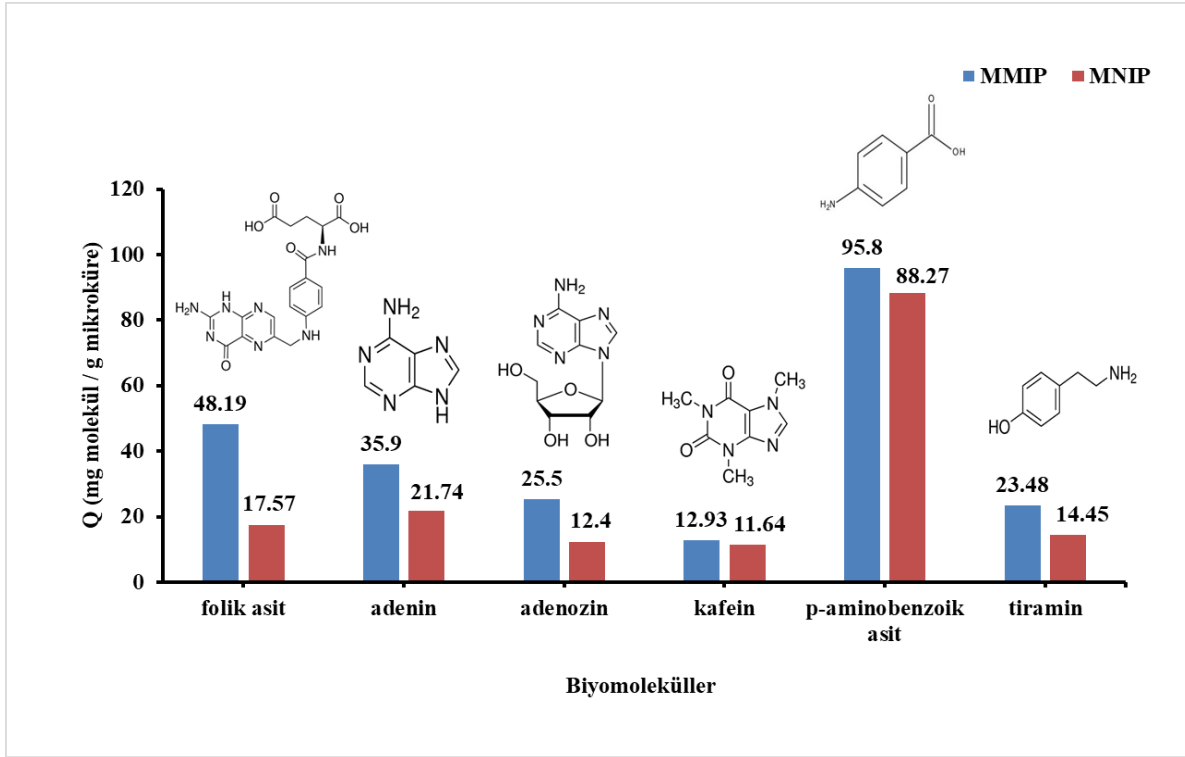
Şekil 4.20. Kesikli sistemde MIP ve NIP için seçicilik testi. Koşullar: Adsorpsiyon hacmi: 4 mL, Hedef molekül başlangıç derişimi: 1 mg/mL, Sorbent miktarı: 5 mg, Süre: 2 saat, Oda sıcaklığı, Karıştırma hızı: 100 rpm.

Çizelge 4.12. Kesikli sistemde MIP ve NIP için yapılan seçicilik testi sonucu hesaplanan baskılama faktörü değerleri.

Biyomoleküller	Q, MIP (mg FA/ g mikroküre)	Q, NIP (mg FA/ g mikroküre)	IF
Folik asit	30.88	7.57	4.08
Adenin	124.13	92.18	1.35
Adenozin	19.83	12.93	1.53
Kafein	28.85	23.60	1.22
P-aminobenzoik asit	19.45	15.96	1.21
Tiramin	33.88	24.47	1.38

MIP ve NIP için yapılan seçicilik testi sonucunda FA, diğer biyomoleküllere oranla gözle görülür bir farkla yüksek baskılama faktörüne sahiptir. Adsorpsiyon kapasitesinin yüksek olması avantajlı bir durumdur ancak IF değerinin her zaman yüksek olması tercih edilmektedir. Bu sonuçların literatürde FA ile yapılan diğer çalışmalarla karşılaştırılması sonucu, diğer çalışmalara oranla yüksek IF değerine sahip olduğu görülmüştür. Bu da FA izolasyonunun başarılı bir şekilde uygulandığını göstermektedir.

Şekil 4.21’de normal mikrokürelerde olduğu gibi manyetik formdaki MMIP ve MNIP için de yapılan seçicilik testi deneylerinde elde edilen denge adsorpsiyon kapasiteleri değerleri verilmiştir. Bu değerler doğrultusunda hesaplanan IF değerleri ise Çizelge 4.13’te karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.21. Kesikli sistemde MMIP ve MNIP için seçicilik testi. Koşullar: Adsorpsiyon hacmi: 4 mL, Hedef molekül başlangıç derişimi: 1 mg/mL, Sorbent miktarı: 5 mg, Süre: 2 saat, Oda sıcaklığı, Karıştırma hızı: 100 rpm.

Çizelge 4.13. Kesikli sistemde MMIP ve MNIP için yapılan seçicilik testi sonucu hesaplanan baskılama faktörü değerleri.

Biyomoleküller	Q, MMIP (mg FA/ g mikroküre)	Q, MNIP (mg FA/ g mikroküre)	IF
Folik asit	48.19	17.57	2.74
Adenin	35.90	21.74	1.65
Adenozin	25.50	12.40	2.05
Kafein	12.93	11.64	1,11
p-aminobenzoik asit	95.80	88.27	1.08
Tiramin	23.48	14.45	1.62

Çizelge 4.13 incelendiğinde, MMIP ve MNIP için yapılan seçicilik testi sonucunda FA'nın yine diğer biyomoleküllere oranla yüksek baskılama faktörüne sahip olduğu gösterilmiştir. Bu durum manyetik mikrokürelere FA'in literatürdeki diğer çalışmalarla karşılaştırılması sonucu, başarılı bir şekilde baskılandığını göstermektedir. Çizelge 4.14'te, yapılan çalışmaların IF değerleri karşılaştırılmıştır.

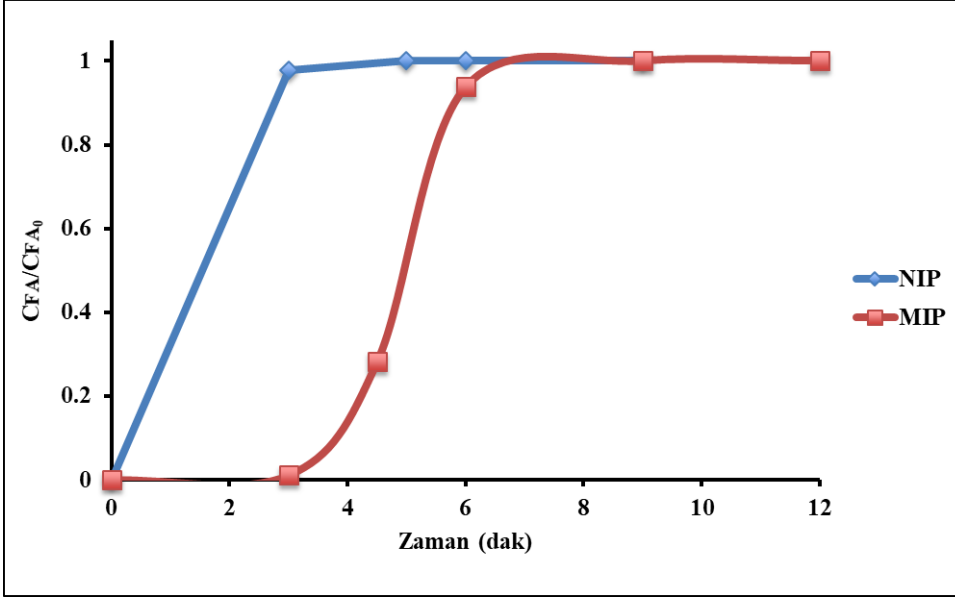
Çizelge 4.14. Literatürdeki folik asit baskılama çalışmalarının IF değerleri

Literatürdeki Folik Asit Baskılama Çalışmaları	IF
“A novel core@shell magnetic molecular imprinted nanoparticles for selective determination of folic acid in different food samples” [68]	1.47
“Core-shell SiO ₂ -coated Fe ₃ O ₄ with a surface molecularly imprinted polymer coating of folic acid and its applicable magnetic solid-phase extraction prior to determination of folates in tomatoes” [69]	1.79
“Hybrid molecularly imprinted poly (methacrylic acid-TRIM)-silica chemically modified with (3-glycidyoxypropyl) trimethoxysilane for the extraction of folic acid in aqueous medium” [70]	1.57
“Synthesis Of A Sorbent Via Molecular Imprinting Onto Magnetic-Monodisperse-Porous Silica Microspheres And Its Usage In Selective Biomolecule Isolation” (*)	4.08/2.74

(*) Tez çalışmasıdır.

4.6. Sürekli Sistemde FA Adsorpsiyonu

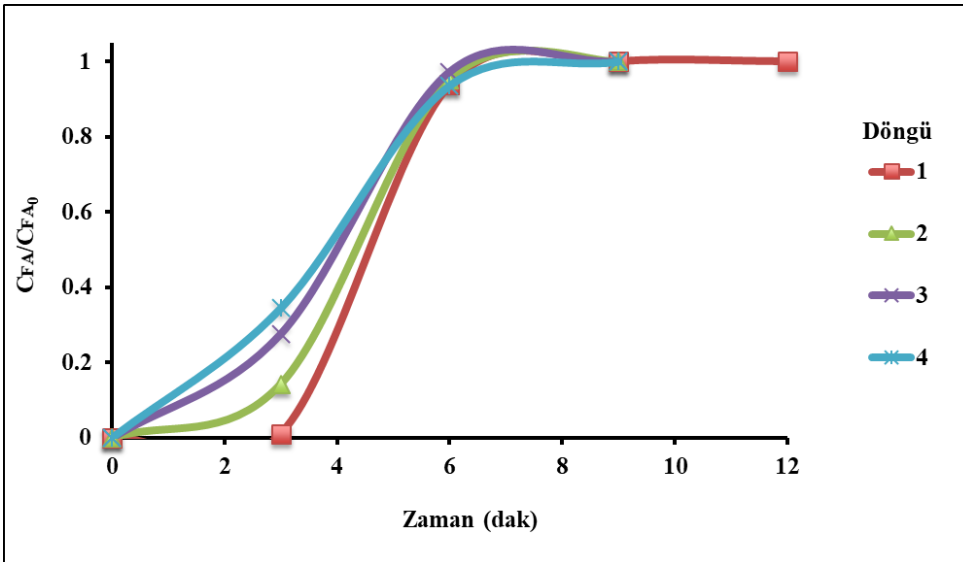
Şekil 4.22'de MIP ve NIP ile dolgulanmış mikrokolona ait doygunluk eğrileri (breakthrough curves) verilmektedir. Görüldüğü üzere NIP ile dolgularan kolonda 3 dakikada doygunluğa ulaşılmasına karşın, MIP ile dolgularan kolonda 6 dakikada aynı durumun elde edildiği görülmüştür. Bu durum MIP ile dolgularan mikrokolonun FA adsorpsiyon yeteneğinin daha iyi olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.22. Sürekli sistemde zamana karşı C_{FA}/C_{FA0} değişimi. Kolon uzunluğu: 10cm, Koşullar: Adsorpsiyon Ortamı: 20 mM PB tamponu, FA başlangıç derişimi: 0.05 mg/mL, Akış hızı: 0.002 mL/dak, Süre: 15 dak, Oda sıcaklığı.

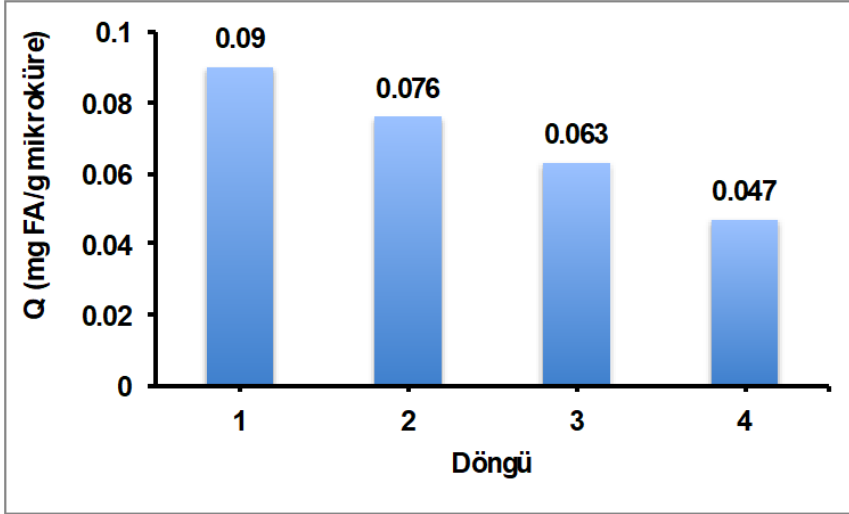
4.7. Sürekli Sistemde Tekrar Kullanılabilirlik

Sürekli sistemde tekrar kullanılabilirlik testi yapılmış ve zamana karşı değişen C_{FA}/C_{FA0} değerleri Şekil 4.23'te verilmiştir.



Şekil 4.23. Sürekli sistemde tekrar kullanılabilirlik testi. Kolon uzunluğu: 10 cm, Koşullar: Adsorpsiyon, Ortam: 20 mM PB tamponu, FA başlangıç derişimi: 0.05 mg/mL, Akış hızı: 0.002 mL/dak, Süre: 15 dak, Oda sıcaklığı. Desorpsiyon ortamı: Su (%10 asetik asit + %10 SDS)

Şekil 4.23'te görüldüğü gibi, sürekli sistemin tekrar kullanılabilirliğini ölçmek adına 4 kez üst üste adsorpsiyon işlemi uygulanmıştır. Bu test sonucunda her bir kullanım arasında adsorpsiyon kapasitesi yönünden önemli bir fark oluşmamıştır. Bu durum, sürekli sistemin tekrar kullanılabilir formda olduğunu göstermektedir. Şekil 4.23'teki FA çıkış derişimi değerleri temelinde mikrokolon adsorpsiyon kapasiteleri hesaplanmış ve Şekil 4.24'teki grafikte verilmiştir. Elde edilen sonuçlar mikrokolonun FA adsorpsiyon kapasitesinin 4 ardışık kullanım sonucunda yaklaşık % 40 oranında düşme gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu sonuç her bir adsorpsiyon işlemi sonucu bağlanan FA'in desorpsiyon basamağında kantitatif olarak uzaklaştırılamaması ve baskılama sırasında oluşan moleküler boşlukların bir kısmının artan kullanım sayısı ile kapanması ile açıklanabilir.



Şekil 4.24. Sürekli sistemde tekrar kullanılabilirlik testi sonuçları

5. GENEL SONUÇLAR

- Tez kapsamında FA, moleküler baskılama işleminde destek materyali olarak kullanılmak üzere manyetik olmayan ve manyetik formda, monodispers-gözenekli silika mikroküreler elde edilmiştir. Ardından moleküler baskılama yöntemi her iki formdaki silika mikrokürelere uygulanarak, mikroküreler üzerinde FA zenginleştirilmesi ile baskılanmış polimerik katman oluşturulmuştur. Silika mikroküreler ile moleküler baskılanmış ve baskılanmamış mikrokürelerin manyetik olmayan (MIP, NIP) ve manyetik formlarının (MMIP, MNIP) her ikisinde de küresel formda oldukları, eş boyutlu olarak dağıldıkları ve gözenekli bir yapıya sahip oldukları görülmüştür.
- BET analizi sonucunda, moleküler baskılama sonrası oluşan polimerik katman nedeniyle baskılanmış mikrokürelerin silika mikrokürelere kıyasla ortalama gözenek boyutunun arttığı görülürken, gözeneklerin polimerik yapı ile dolmasından dolayı, özgül yüzey alanlarının azaldığı görülmüştür.
- Manyetik silika mikrokürelerin doygunluk manyetizasyonu değeri moleküler baskılama ile yaklaşık % 5 oranında azalmıştır. Bu durum polimerik katman oluşumuna bağlı kütle artışından kaynaklanmıştır.
- FTIR-ATR analizi ile mikrokürelerin yapısında, belirli dalga boylarında ortaya çıkan pikler görülmüş ve bu piklerin kaynakları tespit edilmiştir.
- Kesikli sistemde MIP&NIP ve MMIP&MNIP için sorbent ve FA başlangıç derişimi taramaları yapılarak denge adsorpsiyon kapasitesi değerleri (Q) ve buna bağlı olarak baskılama faktörü (IF) bulunmuştur. Optimum değer manyetik olmayan ve manyetik formdaki mikrokürelerin her ikisinde de 5mg sorbent olarak alındığında, MIP'in Q değeri 30.88mg FA/g mikroküre iken NIP'in Q değeri 7.57 mg FA/g mikroküre bulunmuş, IF değeri 4.08 olarak hesaplanmıştır. Manyetik mikroküreler incelendiğinde ise, MMIP'in Q değeri 48.19mg FA/g mikroküre iken MNIP'in Q değeri 17.57 mg FA/g mikroküre bulunmuş, IF değeri 2.74 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar literatürdeki diğer çalışmalar ile karşılaştırıldığında yüksek IF değerinden dolayı başarılı olduğu kabul edilmiştir.

- Kesikli sistemde, hem manyetik olmayan hem de manyetik mikroküreler için yapılan seçicilik testinin her ikisinde de FA'in IF değerinin, FA ile aynı fonksiyonel gruplara sahip alt grupları olarak seçilen diğer moleküllerden oldukça yüksek olduğu görülmüş, baskılanmış mikroküreler FA'ya karşı yüksek seçicilik göstermiştir.
- Sürekli sistemde MIP ve NIP'in doygunluğa ulaşma sürelerine bakılarak adsorpsiyon davranışı incelenmiştir. Bunun sonucunda MIP, 6 dakikada doygunluğa ulaşırken NIP ise 3 dakikada adsorpsiyonunu tamamlamıştır. Bu durum MIP ile dolgulanan mikrokolonun FA adsorpsiyon yeteneğinin daha iyi olduğunu göstermiştir.
- Kesikli ve sürekli sistemin her ikisinde de tekrar kullanılabilirlik testi yapılmıştır. Bu testin sonucunda, her bir kullanım arasında denge adsorpsiyon kapasitesi yönünden önemli bir fark oluşmadığı ve mikrokürelerin tekrar kullanılabilir yapıda oldukları görülmüştür.
- Tüm bu sonuçlar doğrultusunda, sentezlenen moleküler baskılanmış mikroküreler hem kesikli hem de sürekli sistemde kullanılabilirliği açısından oldukça iyi sonuçlar vermiştir. Bu nedenle, folik asite karşı spesifik seçiciliğe sahip moleküler baskılanmış mikroküreler ile folik asit izolasyonunda IF değerleri de dikkate alınarak, başarı sağlandığı kabul edilmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Whitcombe, M. J., Kirsch, N., & Nicholls, I. A. Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years 2004–2011. *Journal of molecular recognition*, 27(6), 297-401, **2014**.
- [2] Lofgreen, J. E., & Ozin, G. A. Controlling morphology and porosity to improve performance of molecularly imprinted sol–gel silica. *Chemical Society Reviews*, 43(3), 911-933, **2014**.
- [3] Alexander, C., Andersson, H. S., Andersson, L. I., Ansell, R. J., Kirsch, N., Nicholls, I. A., ... & Whitcombe, M. J. Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003. *Journal of molecular recognition*, 19(2), 106-180, **2006**.
- [4] Chen, L., Wang, X., Lu, W., Wu, X., & Li, J. Molecular imprinting: perspectives and applications. *Chemical Society Reviews*, 45(8), 2137-2211, **2016**.
- [5] Chen, L., Xu, S., & Li, J. Recent advances in molecular imprinting technology: current status, challenges and highlighted applications. *Chemical Society Reviews*, 40(5), 2922-2942, **2011**.
- [6] Oliveira, F. M., Segatelli, M. G., & Tarley, C. R. T. Preparation of a new restricted access molecularly imprinted hybrid adsorbent for the extraction of folic acid from milk powder samples. *Analytical Methods*, 8(3), 656-665, **2016**.
- [7] Behpour, M., Attaran, A. M., Sadiany, M. M., & Khoobi, A. Adsorption effect of a cationic surfactant at carbon paste electrode as a sensitive sensor for study and detection of folic acid. *Measurement*, 77, 257-264, **2016**.
- [8] Yan, H., & Row, K. H. Characteristic and synthetic approach of molecularly imprinted polymer. *International journal of molecular Sciences*, 7(5), 155-178, **2006**.
- [9] Golker, K., Karlsson, B. C., Olsson, G. D., Rosengren, A. M., & Nicholls, I. A. Influence of composition and morphology on template recognition in molecularly imprinted polymers. *Macromolecules*, 46(4), 1408-1414, **2013**.
- [10] Ramström, O., & Mosbach, K. Synthesis and catalysis by molecularly imprinted materials. *Current Opinion in Chemical Biology*, 3(6), 759-764, **1999**.
- [11] Vasapollo, G., Sole, R. D., Mergola, L., Lazzoi, M. R., Scardino, A., Scorrano, S., & Mele, G. Molecularly imprinted polymers: present and future prospective. *International journal of molecular sciences*, 12(9), 5908-5945, **2011**.

- [12] Wulff, G., Vesper, W., Grobe-Einsler, R., & Sarhan, A. Enzyme-analogue built polymers, 4. On the synthesis of polymers containing chiral cavities and their use for the resolution of racemates. *Die Makromolekulare Chemie: Macromolecular Chemistry and Physics*, 178(10), 2799-2816, **1977**.
- [13] Shea, K. J., & Sasaki, D. Y. An analysis of small-molecule binding to functionalized synthetic polymers by ¹³C CP/MAS NMR and FT-IR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 113(11), 4109-4120, **1991**.
- [14] Schirhagl, R. Bioapplications for molecularly imprinted polymers. *Analytical chemistry*, 86(1), 250-261, **2013**.
- [15] Haginaka, J. Monodispersed, molecularly imprinted polymers as affinity-based chromatography media. *Journal of Chromatography B*, 866(1-2), 3-13, **2008**.
- [16] Piletsky, S. A., Turner, N. W., & Laitenberger, P. Molecularly imprinted polymers in clinical diagnostics—Future potential and existing problems. *Medical Engineering and Physics*, 28(10), 971-977, **2006**.
- [17] Wulff, G. Enzyme-like catalysis by molecularly imprinted polymers. *Chemical reviews*, 102(1), 1-28, **2002**.
- [18] Chen, C. Y., & Karube, I. Biosensors and flow injection analysis. *Current opinion in biotechnology*, 3(1), 31-39, **1992**.
- [19] Wang, J., Rivas, G., Cai, X., Palecek, E., Nielsen, P., Shiraishi, H., ... & Farias, P. A. M. DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring. A review. *Analytica Chimica Acta*, 347(1-2), 1-8, **1997**.
- [20] Wulff, G. Molecular imprinting in cross-linked materials with the aid of molecular templates—a way towards artificial antibodies. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 34(17), 1812-1832, **1995**.
- [21] Long, N. J. Organometallic Compounds for Nonlinear Optics—The Search for Enlightenment!. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 34(1), 21-38, **1995**.
- [22] Takeuchi, T., & Matsui, J. Molecular imprinting: An approach to “tailor-made” synthetic polymers with biomimetic functions. *Acta polymerica*, 47(11-12), 471-480, **1996**.
- [23] Sode, K., Takahashi, Y., Ohta, S., Tsugawa, W., & Yamazaki, T. A new concept for the construction of an artificial dehydrogenase for fructosylamine compounds and its application for an amperometric fructosylamine sensor. *Analytica chimica acta*, 435(1), 151-156, **2001**.

- [24] Kröger, S., Turner, A. P., Mosbach, K., & Haupt, K. Imprinted polymer-based sensor system for herbicides using differential-pulse voltammetry on screen-printed electrodes. *Analytical Chemistry*, 71(17), 3698-3702, **1999**.
- [25] Kriz, D., & Mosbach, K. Competitive amperometric morphine sensor based on an agarose immobilised molecularly imprinted polymer. *Analytica chimica acta*, 300(1-3), 71-75, **1995**.
- [26] Kriz, D., Kempe, M., & Mosbach, K. Introduction of molecularly imprinted polymers as recognition elements in conductometric chemical sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 33(1-3), 178-181, **1996**.
- [27] Piacham, T., Josell, Å., Arwin, H., Prachayasittikul, V., & Ye, L. Molecularly imprinted polymer thin films on quartz crystal microbalance using a surface bound photo-radical initiator. *Analytica chimica acta*, 536(1-2), 191-196, **2005**.
- [28] Weder, C. Molecular Recognition and Polymers—Control of Polymer Structure and Self-Assembly. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 210(16), 1349-1349, **2009**.
- [29] Jakusch, M., Janotta, M., Mizaikoff, B., Mosbach, K., & Haupt, K. Molecularly imprinted polymers and infrared evanescent wave spectroscopy. A chemical sensors approach. *Analytical chemistry*, 71(20), 4786-4791, **1999**.
- [30] Blanco-Lopez, M. C., Gutierrez-Fernandez, S., Lobo-Castanon, M. J., Miranda-Ordieres, A. J., & Tunon-Blanco, P. Electrochemical sensing with electrodes modified with molecularly imprinted polymer films. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 378(8), 1922-1928, **2004**.
- [31] Tan, Y., Yin, J., Liang, C., Peng, H., Nie, L., & Yao, S. A study of a new TSM bio-mimetic sensor using a molecularly imprinted polymer coating and its application for the determination of nicotine in human serum and urine. *Bioelectrochemistry*, 53(2), 141-148, **2001**.
- [32] Thakur, V. K., and Manju K. T. *Handbook of Polymers for Pharmaceutical Technologies, Structure and Chemistry*. Vol. 1. John Wiley & Sons, **2015**.
- [33] Jia, M., Qin, L., He, X. W., & Li, W. Y. Preparation and application of lysozyme imprinted monolithic column with dopamine as the functional monomer. *Journal of Materials Chemistry*, 22(2), 707-713, **2012**.
- [34] Zaidi, S. A. Dual-templates molecularly imprinted monolithic columns for the evaluation of serotonin and histamine in CEC. *Electrophoresis*, 34(9-10), 1375-1382, **2013**.

- [35] Han, H., Li, J., Wang, X., Liu, X., & Jiang, S. Synthesis of ionic liquid-bonded organic-silica hybrid monolithic column for capillary electrochromatography. *Journal of separation science*, 34(16-17), 2323-2328, **2011**.
- [36] Balamurugan, K., Gokulakrishnan, K., & Prakasam, T. Preparation and evaluation of molecularly imprinted polymer liquid chromatography column for the separation of Cathine enantiomers. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 20(1), 53-61, **2012**.
- [37] Watanabe, F., Kubo, T., Kaya, K., & Hosoya, K. Novel separation medium spongy monolith for high throughput analyses. *Journal of Chromatography A*, 1216(44), 7402-7408, **2009**.
- [38] Baggiani, C., Trotta, F., Giraudi, G., Moraglio, G., & Vanni, A. Chromatographic characterization of a molecularly imprinted polymer binding theophylline in aqueous buffers. *Journal of Chromatography A*, 786(1), 23-29, **1997**.
- [39] Snyder, L. R., Joseph J. K., and John W. D. *Introduction to modern liquid chromatography*. John Wiley & Sons, **2011**.
- [40] Hage, D. S. Affinity chromatography: a review of clinical applications. *Clinical chemistry*, 45(5), 593-615, **1999**.
- [41] Hermanson, G. T., Mallia, A. K., & Smith, P. K. *Immobilized affinity ligand techniques*. Academic Press, **1992**.
- [42] Schiel, J. E., Mallik, R., Soman, S., Joseph, K. S., & Hage, D. S. Applications of silica supports in affinity chromatography. *Journal of separation science*, 29(6), 719-737, **2006**.
- [43] He, C., Long, Y., Pan, J., Li, K., & Liu, F. Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of analytes from real samples. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 70(2), 133-150, **2007**.
- [44] Turiel, E., & Martín-Esteban, A. Molecularly imprinted polymers for sample preparation: a review. *Analytica Chimica Acta*, 668(2), 87-99, **2010**.
- [45] Masqué, N., Marcé, R. M., Borrull, F., Cormack, P. A., & Sherrington, D. C. Synthesis and evaluation of a molecularly imprinted polymer for selective on-line solid-phase extraction of 4-nitrophenol from environmental water. *Analytical chemistry*, 72(17), 4122-4126, **2000**.
- [46] Spivak, D., Gilmore, M. A., & Shea, K. J. Evaluation of binding and origins of specificity of 9-ethyladenine imprinted polymers. *Journal of the American Chemical Society*, 119(19), 4388-4393, **1997**.

- [47] Puoci, F., Iemma, F., & Picci, N. Stimuli-responsive molecularly imprinted polymers for drug delivery: a review. *Current drug delivery*, 5(2), 85-96, **2008**.
- [48] Sellergren, B., & Allender, C. J. Molecularly imprinted polymers: A bridge to advanced drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 57(12), 1733-1741, **2005**.
- [49] Cunliffe, D., Kirby, A., & Alexander, C. Molecularly imprinted drug delivery systems. *Advanced drug delivery reviews*, 57(12), 1836-1853, **2005**.
- [50] Alvarez-Lorenzo, C., & Concheiro, A. Molecularly imprinted polymers for drug delivery. *Journal of Chromatography B*, 804(1), 231-245, **2004**.
- [51] Kappe, C. O., Stadler, A., & Dallinger, D. *Microwaves in organic and medicinal chemistry*. John Wiley & Sons, **2012**.
- [52] Davidson, L., & Hayes, W. Molecular imprinting of biologically active steroidal systems. *Current Organic Chemistry*, 6(3), 265-281, **2002**.
- [53] Iler, R. K. The chemistry of silica: solubility, polymerization, colloid and surface properties, and biochemistry, *Canada: John Wiley & Sons Inc.*, **1979**.
- [54] Xia, Y., Gates, B., Yin, Y., & Lu, Y. Monodispersed colloidal spheres: old materials with new applications. *Advanced Materials*, 12(10), 693-713, **2000**.
- [55] Stöber, W., Fink, A., & Bohn, E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *Journal of colloid and interface science*, 26(1), 62-69, **1968**.
- [56] Kolbe, G. *Das komplexchemische Verhalten der Kieselsäure* (Doctoral dissertation), **1956**.
- [57] Kaiser, C., Hanson, M., Giesche, H., Kinkel, J., & Unger, K. K. Nonporous Silica Microspheres in the Micron and Submicron Size Range. In *Fine Particles Science and Technology* (pp. 71-84). Springer, Dordrecht, **1996**.
- [58] Caruso, F., Fiedler, H., & Haage, K. Assembly of β -glucosidase multilayers on spherical colloidal particles and their use as active catalysts. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 169(1-3), 287-293, **2000**.
- [59] Ugelstad, J., Söderberg, L., Berge, A., & Bergström, J. Monodisperse polymer particles—a step forward for chromatography. *Nature*, 303(5912), 95, **1983**.
- [60] Zhang, M., Itoh, T., & Abe, M. Ultrasonic visualization of still and flowing waters using contrast agents of magnetite-encapsulated porous silica microspheres. *Japanese journal of applied physics*, 36(1R), 243, **1997**.

- [61] Ramesh, S., Kolytyn, Y., Prozorov, R., & Gedanken, A. Sonochemical deposition and characterization of nanophasic amorphous nickel on silica microspheres. *Chemistry of materials*, 9(2), 546-551, **1997**.
- [62] Deng, Y., Wang, C., Shen, X., Yang, W., Jin, L., Gao, H., & Fu, S. Preparation, Characterization, and Application of Multistimuli-Responsive Microspheres with Fluorescence-Labeled Magnetic Cores and Thermoresponsive Shells. *Chemistry-A European Journal*, 11(20), 6006-6013, **2005**.
- [63] Lin, S., Yao, G., Qi, D., Li, Y., Deng, C., Yang, P., & Zhang, X. Fast and efficient proteolysis by microwave-assisted protein digestion using trypsin-immobilized magnetic silica microspheres. *Analytical chemistry*, 80(10), 3655-3665, **2008**.
- [64] Martín-Saavedra, F. M., Ruíz-Hernández, E., Boré, A., Arcos, D., Vallet-Regí, M., & Vilaboa, N. Magnetic mesoporous silica spheres for hyperthermia therapy. *Acta Biomaterialia*, 6(12), 4522-4531, **2010**.
- [65] Li, X., Zhang, B., Li, W., Lei, X., Fan, X., Tian, L., ... & Zhang, Q. Preparation and characterization of bovine serum albumin surface-imprinted thermosensitive magnetic polymer microsphere and its application for protein recognition. *Biosensors and Bioelectronics*, 51, 261-267, **2014**.
- [66] <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/folicacid441405930311?lang=en®ion=TR> (Son erişim tarihi: 14.06.2018).
- [67] Donato, L., Tasselli, F., & Drioli, E. Molecularly imprinted membranes with affinity properties for folic acid. *Separation Science and Technology*, 45(16), 2273-2279, **2010**.
- [68] Hussain, S., Khan, S., Gul, S., Pividori, M. I., & Sotomayor, M. D. P. T. A novel core@ shell magnetic molecular imprinted nanoparticles for selective determination of folic acid in different food samples. *Reactive and Functional Polymers*, 106, 51-56, **2016**.
- [69] Areerob, Y., Sricharoen, P., Limchoowong, N., & Chanthai, S. Core-shell SiO₂-coated Fe₃O₄ with a surface molecularly imprinted polymer coating of folic acid and its applicable magnetic solid-phase extraction prior to determination of folates in tomatoes. *Journal of separation science*, 39(15), 3037-3045, **2016**.

- [70] de Oliveira, F. M., Segatelli, M. G., & Tarley, C. R. T. Hybrid molecularly imprinted poly (methacrylic acid-TRIM)-silica chemically modified with (3-glycidyloxypropyl) trimethoxysilane for the extraction of folic acid in aqueous medium. *Materials Science and Engineering: C*, 59, 643-651, **2016**.
- [71] Gölğelioğlu, Ç., Bayraktar, A., Çelebi, B., Uğuzdoğan, E., & Tuncel, A. Aqueous size exclusion chromatography in semimicro and micro-columns by newly synthesized monodisperse macroporous hydrophilic beads as a stationary phase. *Journal of Chromatography A*, 1224, 43-50, **2012**.
- [72] Günel, G., Kip, Ç., Öğüt, S. E., Usta, D. D., Şenlik, E., Kibar, G., & Tuncel, A. Human genomic DNA isolation from whole blood using a simple microfluidic system with silica-and polymer-based stationary phases. *Materials Science and Engineering: C*, 74, 10-20, **2017**.
- [73] Salimi, K., Usta, D. D., Çelikhıçak, Ö., Pinar, A., Salih, B., & Tuncel, A. Ti (IV) carrying polydopamine-coated, monodisperse-porous SiO₂ microspheres with stable magnetic properties for highly selective enrichment of phosphopeptides. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 153, 280-290, **2017**.
- [74] Salimi, K., Usta, D. D., Koçer, İ., Çelik, E., & Tuncel, A. Highly selective magnetic affinity purification of histidine-tagged proteins by Ni²⁺ carrying monodisperse composite microspheres. *RSC Advances*, 7(14), 8718-8726, **2017**.
- [75] Günel, G., Kip, Ç., Eda Öğüt, S., İlhan, H., Kibar, G., & Tuncel, A. Comparative DNA isolation behaviours of silica and polymer based sorbents in batch fashion: monodisperse silica microspheres with bimodal pore size distribution as a new sorbent for DNA isolation. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 46(1), 178-184, **2018**.
- [76] Nantasenamat, C., Isarankura-Na-Ayudhya, C., Naenna, T., & Prachayasittikul, V. Quantitative structure-imprinting factor relationship of molecularly imprinted polymers. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(12), 3309-3317, **2007**.
- [77] <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/adenine135137324511?lang=en®ion=TR> (Son erişim tarihi: 14.06.2018).
- [78] <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/adenosine267245861711?lang=en®ion=TR> (Son erişim tarihi: 14.06.2018).
- [79] <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/caffeine194195808211?lang=en®ion=TR> (Son erişim tarihi: 14.06.2018).

[80]<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/4aminobenzoicacid1371415013011?lang=en®ion=TR>

(Son erişim tarihi: 14.06.2018).

[81] <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/tyramine137185167211?lang=en®ion=TR>

(Son erişim tarihi: 14.06.2018).



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 02/072018

Tez Başlığı / Konusu: Manyetik Özelliğe Sahip Monodispers-Gözenekli Silika Mikroküreler Üzerine Biyomolekül Baskılama Yoluyla Sorbent Sentezi ve Sorbentin Seçici Biyomolekül İzolasyonunda Kullanımı

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 68 sayfalık kısmına ilişkin, 02/07/2018 tarihinde ~~şahsım~~/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 2'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

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

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

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Adı Soyadı: Bensu ALAN
Öğrenci No: N16221048
Anabilim Dalı: Kimya Mühendisliği
Programı: Tezli Yüksek Lisans
Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

Tarih ve İmza
02.07.2018

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Prof. Dr. S. Ali TUNCEL

(Unvan, Ad Soyad, İmza)