

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**BİYOAKTİF MOLEKÜLLERİN MOLEKÜLER
BASKILAMA TEKNİĞİ KULLANILARAK
HAZIRLANAN POLİMERİK MATRİKSLER İLE
AYIRMA-SAFLAŞTIRMASI**

Melis ALTAŞ

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Gaye ÖNGEN

İkinci Danışman : Prof. Dr. Erdal BEDİR

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi : 24.06.2016

Bornova-İZMİR

2016

Melis Altaş tarafından doktora tezi olarak sunulan “Biyoaktif Moleküllerin Moleküler Baskılama Tekniği Kullanılarak Hazırlanan Polimerik Matrisler ile Ayırma-Saflaştırması” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 24.06.2016 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Gaye ÖNGEN

.....

**Raportör Üye : Yrd. Doç. Dr. Aylin
ŞENDEMİR ÜRKMEZ**

.....

**Üye : Prof. Dr. Menemşe
GÜMÜŞDERELİOĞLU**

.....

Üye : Prof. Dr. Volga BULMUŞ

.....

Üye : Doç. Dr. Cenk SELÇUKİ

.....



EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “Biyoaktif Moleküllerin Moleküler Baskılama Tekniğı Kullanılarak Hazırlanan Polimerik Matriksler ile Ayırma-Saflaştırması” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

20 / 05 / 2016

Melis ALTAŞ



ÖZET**BİYOAKTİF MOLEKÜLLERİN MOLEKÜLER BASKILAMA TEKNİĞİ
KULLANILARAK HAZIRLANAN POLİMERİK MATRİKSLER İLE
AYIRMA-SAFLAŞTIRMASI**

ALTAŞ, Melis

Doktora Tezi, Biyomühendislik Bölümü

I.Tez Danışmanı: Prof. Dr. Gaye ÖNGEN

II. Tez Danışmanı: Prof. Dr. Erdal BEDİR

Haziran 2016, 220 sayfa

Bu projenin amacı katma değeri yüksek, doğal kaynaklarında düşük miktarlarda bulunan ve/veya ayırma saflaştırma işlemleri güçlükler içeren biyoaktif moleküllerin seçici-ayırıcı moleküler baskılama yöntemi ile kısa zamanda, kolay ve de ekonomik bir yöntemle ayrılması ve saflaştırılmasıdır. Moleküler baskılama tekniği ile hazırlanan polimerlerin katı faz ekstraksiyonunda dolgu maddesi olarak kullanımı hedeflenmiştir. Proje kapsamında kalıp molekül olarak ise *Astragalus* köklerinden elde edilen sikloastragenol metaboliti seçilmiştir.

Farklı özelliklerde monomer ve çapraz bağlayıcılarla hazırlanan polimerlerin karakterizasyon işlemleri sonrasında kromatografik fonksiyonları test edilmiş ve seçici ayırıcı performansları değerlendirilmiştir. En yüksek izolasyon performansı elde edilen polimerler ile büyük ölçekte katı faz ekstraksiyonu denemeleri yürütülerek ham *Astragalus* ekstrelerinden sikloastragenolün saflaştırılması için çalışmalar yapılmıştır.

Çalışmalar sonucunda, sikloastragenol ile yapılan küçük ölçek çalışmalarda %97.41'lik bir geri kazanım sağlanırken, *Astragalus* hidroliz ekstresi ile yapılan büyük ölçek çalışmalarda, ekstredeki sikloastragenole yapıcı benzer moleküller ve polimerler arasındaki non-spesifik etkileşimler sebebiyle %86.78'lik bir geri kazanım oranı elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Moleküler Baskılama, Polimer, Sikloastragenol, Katı Faz Ekstraksiyonu.



ABSTRACT**THE ISOLATION AND PURIFICATION OF BIOACTIVE MOLECULES
USING MOLECULARLY IMPRINTED POLYMERS**

ALTAŞ, Melis

PhD Thesis, Bioengineering Department

1st Supervisor: Prof. Dr. Gaye ÖNGEN2nd Supervisor: Prof. Dr. Erdal BEDİR

June 2016, 220 pages

The purpose of this project is the isolation and purification of bioactive molecules that are either found in low quantities in their natural sources or that have very difficult purification procedures, using molecular imprinting techniques. The polymers synthesized using molecular imprinting techniques are aimed to be used as packing material in solid phase extraction. Cycloastragenol, obtained from the roots of *Astragalus* species, was chosen as the template molecule in this project.

After the characterization of the polymers synthesized using monomers and crosslinkers with different properties, their chromatographic functions and selective separation performances were evaluated. In order to purify cycloastragenol from crude *Astragalus* extracts, for the solid phase extraction scale-up studies were pursued using the polymers with the highest isolation performance.

As a result, while there was 97.41% recovery in the small scale studies with cycloastragenol, 86.78% recovery was obtained in the large scale studies with hydrolyzed *Astragalus* extracts due to the non-specific interactions between polymers and molecules analog to cycloastragenol present in the extract.

Keywords: Molecular Imprinting, Polymer, Cycloastragenol, Solid Phase Extraction.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın her aşamasında benden desteğini esirgemeyen çok değerli hocalarım Prof. Dr. Gaye ÖNGEN ve Prof. Dr. Erdal BEDİR'e ve proje aşamasında engelleri aşmamızı sağlayan Yrd. Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR ÜRKMEZ, Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU, Prof. Dr. Sinan AKGÖL ve Doç. Dr. Cenk SELÇUKİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Her türlü problemimde yanımda olan, benden yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Yrd. Doç. Dr. İsmail Hakkı AKGÜN, Özgür TAĞ, Emir ÖZÇALIŞKAN, Ersin GÜNDEĞER, Onur MUŞMULA, Özge AKYÜZ, Feyruz BOZOĞLAN, Güner EKİZ, Seda DUMAN, Özge ÖZÇINAR, Sinem YILMAZ, Melis KÜÇÜKSOLAK, Fadime AYDOĞAN ve Behnaz ASLANİPOUR'a çok teşekkür ederim.

Bu zorlu yolun her anında bana destek veren, yorgun düştüğümde elimden tutan eşim Emrah ALTAŞ, annem Zuhul BUBULAKİ ve kardeşim Doruk KUBAN'a teşekkür ederim. Benim için yaptıklarını asla unutmayacağım.

Son olarak, bu çalışmaya 12 MUH 005 ve 14 MÜH 062 numaralı BAP projeleri ile destek veren Ege Üniversitesi'ne teşekkürü bir borç bilirim.



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xxv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xxviii
1.0 GİRİŞ.....	1
2.0 LİTERATÜR ÖZETİ.....	4
2.1 Moleküler Baskılama.....	4
2.2 Moleküler Baskılamaya Etki Eden Faktörler	12
2.3 Adsorpsiyon Kinetiği – Adsorpsiyon İzotermi	16
2.4 Sikloastragenol	19
3.0 MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	21
3.1 Materyaller.....	21
3.1.1 Makine ve Teçhizatlar	22
3.2 Yöntemler	23
3.2.1 Polimerizasyon	24
3.2.1.1 Yığın polimerizasyonu ile NIP sentezi	25
3.2.1.2 Yığın polimerizasyonu ile MIP sentezi	26
3.2.1.3 Çöktürme Polimerizasyonu ile NIP Sentezi	27

3.2.1.4 Çöktürme Polimerizasyonu ile MIP Sentezi	27
3.2.2 Alt Akım İşlemleri	28
3.2.2.1 Boyut Küçültme	28
3.2.2.2 Ayırma	28
3.2.2.3 Yıkama	28
3.2.2.4 Kurutma-Saklama	29
3.2.3 Polimerlerin Karakterizasyonu	29
3.2.3.1 Kimyasal Karakterizasyon	30
3.2.3.2 Morfolojik Karakterizasyon	30
3.2.3.3 Moleküler Tanıma	32
3.2.4 Ölçek Büyütme	35
3.2.5 Analiz Yöntemleri	37
3.2.5.1 İnce Tabaka Kromatografisi	37
3.2.5.2 HPLC Analizleri	37
3.2.6 Moleküler Baskılamada Hesapsal İnceleme	37
4.0 BULGULAR VE TARTIŞMA	39
4.1 Polimerizasyon Sonuçları	39
4.2 Bağlanma Denemeleri	41
4.3 Katı Faz Ekstraksiyonu – Breakthrough Eğrisi - Seçimlilik Denemeleri	43
4.4 Alternatif Polimerler ile Seçimlilik Denemeleri	64
4.5 Ölçek Büyütme	69
4.6 Ticari Polimer Denemeleri	78
4.7 Adsorpsiyon İzotermi ve Adsorpsiyon Kinetiği	80
4.8 Tekrarlanabilirlik	88
4.9 Şişme Denemesi	88
4.10 FTIR Analizleri	90

4.11 Elementel Analiz Sonuçları.....	114
4.12 XPS – X-Işını Fotoelektron Spektroskopi Analizleri	114
4.13 BET Analizi ve Gözenek Boyutu Dağılımı Sonuçları.....	116
4.14 SEM Analizleri	119
4.15 Parçacık Boyutu Analizi	136
4.16 Basınç Düşmesi ve Ölçek Büyütme Verileri	140
4.17 Hesapsal İnceleme	140
5.0 SONUÇLAR.....	153
6.0 ÖNERİLER.....	159
EK AÇIKLAMALAR - A	160
A. CG Kalibrasyon Grafikleri	160
EK AÇIKLAMALAR - B	162
B. HPLC Analizleri	162
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	205
ÖZGEÇMİŞ	217

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 Moleküler baskılama yöntemi	5
Şekil 2.2 4-nitrofenil- α -D-mannopiranozit-2,3:4,6-di-O-(4-vinilfenilboronat) molekülünün baskılanması.....	9
Şekil 2.3 Bir dipeptidin metakrilik asit polimeriyle baskılanması.....	10
Şekil 2.4 Sık kullanılan fonksiyonel monomerler.....	14
Şekil 2.5 Sık kullanılan çapraz bağlayıcılar.....	14
Şekil 2.6 a. Sikloastragenol (CG) b. Astragalozit IV (AST-4) c. Astragalozit VII (AST-7) d. Siklokantogenol (SKG).....	20
Şekil 3.1 Polimerizasyonda kullanılan kimyasallar.	21
Şekil 3.2 Yığın polimerizasyonu ile NIP sentezi.	26
Şekil 3.3 Yığın polimerizasyonu ile MIP sentezi.	26
Şekil 3.4 Çöktürme polimerizasyonu ile NIP sentezi.	27
Şekil 3.5 Çöktürme polimerizasyonu ile MIP sentezi.....	28
Şekil 3.6 Polimerlerin yıkama prosedürü.....	29
Şekil 3.7 Kolon çeşitleri.....	36
Şekil 4.1 Hatalı polimerizasyon.	39
Şekil 4.2 Y4 MIP ve NIP	40
Şekil 4.3 D4 MIP – yıkama sonrası.	40
Şekil 4.4 Yıkama İTK'ları	41
Şekil 4.5 Y4, Y8, D4 ve D8 için bağlanma kapasitesi sonuçları	42
Şekil 4.6 Katı faz ekstraksiyonu – yıkama elüsyon miktarı denemesi.....	43
Şekil 4.7 Katı faz ekstraksiyonu sonuçları.....	44
Şekil 4.8 Yükleme denemesi.....	45

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil 4.9 D4 polimeri için sorpsiyon ve elüsyon eğrileri.	46
Şekil 4.10 D4 polimeri için breakthrough eğrileri a. NIP b. MIP	47
Şekil 4.11 D4 polimeri için Breakthrough eğrileri	48
Şekil 4.12 Breakthrough eğrisi çıkarılırken elde edilen geri kazanım ve baskı faktörü sonuçları.	49
Şekil 4.13 D4-MIP ve NIP ile AST-4/AST-7/CG karışımından CG izolasyonu ..	50
Şekil 4.14 D4-MIP ve NIP ile <i>Astragalus</i> ekstresinden CG izolasyonu.	51
Şekil 4.15 D4-MIP ve NIP ile <i>Astragalus</i> ekstresinden CG izolasyonu	51
Şekil 4.16 D4-MIP ve NIP ile <i>Astragalus</i> ekstresinden CG izolasyonu	52
Şekil 4.17 D4-MIP ve NIP ile <i>Astragalus</i> ekstresinden CG izolasyonu	53
Şekil 4.18 D4-MIP ve NIP ile <i>Astragalus</i> hidroliz ekstresinden CG izolasyonu ..	53
Şekil 4.19 D4-MIP ve NIP ile <i>Astragalus</i> hidroliz ekstresinden CG izolasyonu ..	54
Şekil 4.20 D4-MIP ve NIP ile <i>Astragalus</i> hidroliz ekstresinden CG izolasyonu ..	54
Şekil 4.21 D4-MIP ve NIP ile <i>Astragalus</i> hidroliz ekstresinden CG izolasyonu ..	55
Şekil 4.22 D4-MIP ve NIP ile <i>Astragalus</i> hidroliz ekstresinden CG izolasyonu ..	56
Şekil 4.23 D4-MIP ve NIP ile <i>Astragalus</i> hidroliz ekstresinden CG izolasyonu ..	56
Şekil 4.24 D4-MIP ve NIP ile <i>Astragalus</i> hidroliz ekstresinden CG izolasyonu ..	57
Şekil 4.25 D4-MIP ve NIP ile <i>Astragalus</i> hidroliz ekstresinden CG izolasyonu ..	58
Şekil 4.26 D4-MIP ve NIP ile <i>Astragalus</i> hidroliz ekstresinden CG izolasyonu ..	59
Şekil 4.27 D4-MIP ve NIP ile <i>Astragalus</i> hidroliz ekstresinden CG izolasyonu ..	59
Şekil 4.28 D4-MIP ve NIP ile <i>Astragalus</i> hidroliz ekstresinden CG izolasyonu ..	60
Şekil 4.29 D4-MIP ve NIP ile <i>Astragalus</i> hidroliz ekstresinden CG izolasyonu ..	62
Şekil 4.30 D4-MIP ve NIP ile <i>Astragalus</i> hidroliz ekstresinden CG izolasyonu ..	63
Şekil 4.31 D4-MIP ve NIP ile <i>Astragalus</i> hidroliz ekstresinden CG izolasyonu ..	63

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil 4.32 Stiren divinilbenzen polimerleriyle yapılan çalışma sonucu	65
Şekil 4.33 4-Vinilpiridin EGDMA polimerleriyle yapılan çalışma sonucu.....	65
Şekil 4.34 D3-MIP ve NIP ile <i>Astragalus</i> hidroliz ekstresinden CG izolasyonu ..	66
Şekil 4.35 D4-30-MIP ve NIP ile <i>Astragalus</i> hidroliz ekstresinden CG izolasyonu.	67
Şekil 4.36 D6-MIP ve NIP ile <i>Astragalus</i> hidroliz ekstresinden CG izolasyonu ..	67
Şekil 4.37 a. D6-NIP b. D6-MIP ile <i>Astragalus</i> hidroliz ekstresinden CG izolasyonu	68
Şekil 4.38 D4-MIP ve NIP ile <i>Astragalus</i> hidroliz ekstresinden CG izolasyonu ..	69
Şekil 4.39 D4-MIP ve NIP ile <i>Astragalus</i> hidroliz ekstresinden CG izolasyonu ..	70
Şekil 4.40 D4-MIP ve NIP ile <i>Astragalus</i> hidroliz ekstresinden CG izolasyonu ..	71
Şekil 4.41 D4-MIP ile <i>Astragalus</i> hidroliz ekstresinden CG izolasyonu	72
Şekil 4.42 D4-MIP ile <i>Astragalus</i> hidroliz ekstresinden CG izolasyonu	73
Şekil 4.43 D4-NIP ile <i>Astragalus</i> hidroliz ekstresinden CG izolasyonu	74
Şekil 4.44 D4-MIP ile <i>Astragalus</i> hidroliz ekstresinden CG izolasyonu	75
Şekil 4.45 D4-NIP ile <i>Astragalus</i> hidroliz ekstresinden CG izolasyonu	76
Şekil 4.46 D4-MIP ile <i>Astragalus</i> hidroliz ekstresinden CG izolasyonu.	77
Şekil 4.47 D4-NIP ile <i>Astragalus</i> hidroliz ekstresinden CG izolasyonu	77
Şekil 4.48 <i>Astragalus</i> ekstresinden CG izolasyonu için kullanılan D101 polimeri	79
Şekil 4.49 AST-4/AST-7/CG karışımından CG izolasyonu için kullanılan D101 polimeri.	79
Şekil 4.50 <i>Astragalus</i> hidroliz ekstresinden CG izolasyonu için kullanılan D101 polimeri	80
Şekil 4.51 D4 NIP ve MIP'in Freundlich izotermi ile değerlendirilmesi	81

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil 4.52 D4 NIP ve MIP'in Langmuir izotermi ile değerlendirilmesi.	82
Şekil 4.53 D4 NIP ve MIP'in Scatchard eğrisi ile değerlendirilmesi.....	84
Şekil 4.54 D4-NIP ve MIP'in zamana bağlı olarak adsorpsiyon kapasitesindeki değişim.....	85
Şekil 4.55 Pseudo 1. derece hız modeli a. NIP b. MIP.....	85
Şekil 4.56 Pseudo 2. derece hız modeli a. NIP b. MIP.....	86
Şekil 4.57 ISV ve UCM hız belirleyici adımlar a. NIP b. MIP.....	86
Şekil 4.58 Partikül içi difüzyon a. NIP b. MIP.....	87
Şekil 4.59 Y4NIP0.....	91
Şekil 4.60 Y4 NIP.....	92
Şekil 4.61 Y4MIP0.....	93
Şekil 4.62 Y4MIP.....	94
Şekil 4.63 Y8NIP0.....	95
Şekil 4.64 Y8NIP.....	96
Şekil 4.65 Y8MIP0.....	97
Şekil 4.66 Y8MIP.....	98
Şekil 4.67 D4NIP0.....	99
Şekil 4.68 D4NIP.....	100
Şekil 4.69 D4MIP0.....	101
Şekil 4.70 D4MIP.....	102
Şekil 4.71 D8NIP0.....	103
Şekil 4.72 D8NIP.....	104
Şekil 4.73 D8MIP0.....	105
Şekil 4.74 D8MIP.....	106

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil 4.75 D4YNIP	107
Şekil 4.76 D4YMIP.....	108
Şekil 4.77 D1-4-40-10NIP0	109
Şekil 4.78 D1-4-40-10NIP	110
Şekil 4.79 D1-4-40-10MIP0	111
Şekil 4.80 D1-4-40-10MIP	112
Şekil 4.81 CG.....	113
Şekil 4.82 D4-NIP'e ait XPS analizi sonucu.	115
Şekil 4.83 D4-MIP'e ait XPS analizi sonucu.....	115
Şekil 4.84 D4-NIP ve MIP için BET analizi sonuçları	116
Şekil 4.85 Hacime karşı P/P_0 grafiği.....	116
Şekil 4.86 Por çapına bağlı olarak değişim.	117
Şekil 4.87 T-grafiği.	118
Şekil 4.88 P/P_0 'a karşı istatistiksel kalınlık grafiği.	118
Şekil 4.89 Adsorpsiyon türleri.	118
Şekil 4.90 SEM görüntüleri a. D1-4-40-10 NIP b. D1-4-40-20 NIP c. D1-4-40-30 NIP	121
Şekil 4.91 SEM görüntüleri a. D1-4-20-30 (D4) NIP b. D1-4-30-30 NIP c. D1-4-40-30 NIP.....	122
Şekil 4.92 SEM görüntüleri a. D1-4-20-30 (D4) NIP b. D1-4-20-10 NIP	124
Şekil 4.93 SEM görüntüleri a. D1-4-20-30 (D4) MIP yıkama öncesi b. D1-4-20-30 (D4) MIP c. D1-4-20-30 (D4) NIP	125
Şekil 4.94 SEM görüntüleri a. D1-4-40-10 NIP b. D1-4-20-30 (D4) NIP	126
Şekil 4.95 SEM görüntüleri a. D1-4-20-30 (D4) MIP b. D1-4-20-30 (DY4) Y MIP c. D1-4-20-30 (D4) NIP d. D1-4-20-30 Y (DY4)NIP	128

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil 4.96 SEM görüntüleri a. D1-4-20-30 (D4) MIP b. D1-8-20-30 (D8) MIP c. D1-4-20-30 (D4) NIP d. D1-8-20-30 (D8) NIP	129
Şekil 4.97 SEM görüntüleri a. D1-8-20-30 (D8) MIP b. D1-8-20-30 (D8) MIP yıkama öncesi	130
Şekil 4.98 SEM görüntüleri a. D1-3-20-30 (D3) MIP b. D1-6-20-30 (D6) MIP c. D1-3-20-30 (D3) NIP d. D1-6-20-30 (D6) NIP	131
Şekil 4.99 SEM görüntüleri a. D1-3-20-30 (D3) MIP b. D1-4-20-30 (D4) MIP c. D1-6-20-30 (D6) MIP d. D1-8-20-30 (D8) MIP	132
Şekil 4.100 SEM görüntüleri a. D1-4-20-30 (D4) MIP b. D1-4-20-30 (D4) NIP c. D1-4-30-30 MIP d. D1-4-30-30 NIP e. D1-4-40-10 MIP f. D1-4- 40-10 NIP	133
Şekil 4.101 SEM görüntüleri a. Y4 MIP b. Y4 NIP c. Y8 NIP d. Y8 Y NIP	134
Şekil 4.102 SEM görüntüleri a. D1-4-20-30 (D4) MIP b. D1-8-20-30 (D8) MIP c. Y1-4-20 (Y4) MIP d. Y1-8-20 (Y8) MIP	135
Şekil 4.103 D4MIP	136
Şekil 4.104 D4NIP	137
Şekil 4.105 D8MIP	137
Şekil 4.106 D8NIP	137
Şekil 4.107 Y4MIP	137
Şekil 4.108 Y4NIP	138
Şekil 4.109 Y8NIP	138
Şekil 4.110. Y8MIP	138
Şekil 4.111. D1-4-40MIP	139
Şekil 4.112. D1-4-40NIP	139
Şekil 4.113 M0054 kodlu konformasyon.	141

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil 4.114 M0054_4'ün farklı kombinasyonları için DFT metodu ile elde edilen yapılar.....	143
Şekil 4.115 M0054_4_3 molekülünün DFT yöntemi ile yapılan frekans analizi sonucu elde edilen hesapsal IR spektrumu.	145
Şekil 4.116 1:4 oranında DFT metodu ile elde edilen en kararlı yapılar	148
Şekil 4.117 M0003* molekülünün hesapsal IR spektrumu.	149
Şekil 4.118 M0001* molekülünün hesapsal IR spektrumu.	150
Şekil 4.119 M0054* molekülünün hesapsal IR spektrumu.	151
Şekil A.1 CG'nin kalibrasyon grafiği-1.....	160
Şekil A.2 CG'nin kalibrasyon grafiği-2.....	161
Şekil B.1 CG500	162
Şekil B.2 D4M500_1	163
Şekil B.3 D4M500_2	164
Şekil B.4 D4M500_3	165
Şekil B.5 D4M500_4	166
Şekil B.6 D4M500_5	167
Şekil B.7 D4M500_M.....	168
Şekil B.8. D4N500_1	169
Şekil B.9 D4N500_2.....	170
Şekil B.10 D4N500_3.....	171
Şekil B.11 D4N500_4.....	172
Şekil B.12 D4N500_5.....	173
Şekil B.13 D4N500_M	174
Şekil B.14 D3-MIP - katı faz ekstraksiyonu – kloroform fraksiyonu.....	175
Şekil B.15 D3-MIP - katı faz ekstraksiyonu – metanol fraksiyonu.....	176

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil B.16 D3-NIP - katı faz ekstraksiyonu – kloroform fraksiyonu.	177
Şekil B.17 D3-NIP - katı faz ekstraksiyonu – metanol fraksiyonu.	178
Şekil B.18 D6-MIP - katı faz ekstraksiyonu – kloroform fraksiyonu.	179
Şekil B.19 D6-MIP - katı faz ekstraksiyonu – metanol fraksiyonu.....	180
Şekil B.20 D6-NIP - katı faz ekstraksiyonu – kloroform fraksiyonu.	181
Şekil B.21 D6-NIP - katı faz ekstraksiyonu – metanol fraksiyonu.	182
Şekil B.22 D4-30-MIP - katı faz ekstraksiyonu – kloroform fraksiyonu.	183
Şekil B.23 D4-30-MIP polimeri - katı faz ekstraksiyonu – metanol fraksiyonu.	184
Şekil B.24 D4-30-NIP - katı faz ekstraksiyonu - kloroform fraksiyonu.	185
Şekil B.25 D4-30-NIP polimeri - katı faz ekstraksiyonu – metanol fraksiyonu.	186
Şekil B.26 D101 polimeri 70:30 (su:AcN) fraksiyonu.....	187
Şekil B.27 D101 polimeri 60:40 (su:AcN) fraksiyonu.....	188
Şekil B.28 D101 polimeri 50:50 (su:AcN) fraksiyonu.....	189
Şekil B.29 D101 polimeri 40:60 (su:AcN) fraksiyonu.....	190
Şekil B.30 D101 polimeri 30:70 (su:AcN) fraksiyonu.....	191
Şekil B.31 D101 polimeri metanol fraksiyonu.	192
Şekil B.32 D6-MIP – <i>Astragalus</i> ekstresi – 40:60 (su:AcN) fraksiyonu.	193
Şekil B.33 D6-NIP – <i>Astragalus</i> ekstresi – 40:60 (su:AcN) fraksiyonu.	194
Şekil B.34 D4-MIP – 10g – 40:60(2) su:AcN fraksiyonu.....	195
Şekil B.35 D4-NIP – 10g – 40:60(1) su:AcN fraksiyonu.....	196
Şekil B.36 D4-NIP - 10g – 40:60(2) su:AcN fraksiyonu.	197
Şekil B.37 D4-MIP - 100g – 40:60(1) su:AcN fraksiyonu.....	198
Şekil B.38 D4-MIP - 100g – 40:60(2) su:AcN fraksiyonu.....	199
Şekil B.39 D4-NIP - 100g – 40:60(1) su:AcN fraksiyonu.	200

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil B.40 D4-NIP - 100g – 40:60(2) su:AcN fraksiyonu.....	201
Şekil B.41 D4-MIP - 100g – 40:60(2) su:AcN fraksiyonu.	202
Şekil B.42 D4-NIP – 100g - 40:60(2) su:AcN fraksiyonu.....	203
Şekil B.43 <i>Astragalus</i> hidroliz ekstresi.....	204



ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1 Moleküler baskılama ile hazırlanan polimerler ve kullanım alanları..	6
Çizelge 2.2 Bazı başlatıcıların yarılanma zamanları	15
Çizelge 2.3 ISV ve UCM Hız Belirleyici Adımlar için Denklemler.....	18
Çizelge 3.1 Projede kullanılan kimyasal malzemeler.....	21
Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan diğer malzemeler.	22
Çizelge 3.3 Kullanılan cihazlar.....	22
Çizelge 3.4 Projenin akış şeması.	23
Çizelge 3.5 Polimerlerin sentez oranlarını içeren protokoller.	24
Çizelge 3.6 Polimerizasyon tepkimelerinin bileşenleri.	25
Çizelge 3.7 Denemelerde kullanılan kolonların özellikleri.	36
Çizelge 4.1 Bağlanma denemeleri sonuçlarına göre hesaplanan baskı faktörleri.	42
Çizelge 4.2 Katı faz ekstraksiyonunda hesaplanan baskı faktörleri.	45
Çizelge 4.3 Breakthrough eğrisi sonuçları.....	48
Çizelge 4.4 0.5 g polimer çalışmaları.	61
Çizelge 4.5 1 g polimer ile yapılan çalışmalar.	64
Çizelge 4.6 2.5 g polimer çalışmaları.	71
Çizelge 4.7 10 g polimer ile yapılan çalışmalar.	74
Çizelge 4.8 100 g polimer ile yapılan iyileştirme çalışmaları.	78
Çizelge 4.9 Freundlich izotermi kullanılarak elde edilen sonuçlar.	81
Çizelge 4.10 Langmuir izotermine göre elde edilen sonuçlar.	82
Çizelge 4.11 Langmuir izotermine göre seçilen 10 konsantrasyon (C) için R_L (dağılma sabiti) hesabı.	83

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

Çizelge 4.12 Scatchard eğrisi ile yapılan hesaplamalar.	84
Çizelge 4.13 ISV ve UCM hız belirleyici adımlar için denklemler.....	87
Çizelge 4.14 D4-NIP hız denklemleri sonuçları.	87
Çizelge 4.15 D4-MIP hız denklemleri sonuçları	87
Çizelge 4.16 Farklı pH'larda %70 su:asetonitril çözeltisinde D4-NIP ve D4-MIP polimerlerinin şişme oranları.	89
Çizelge 4.17 Farklı pH'larda tampon çözeltide D4-NIP ve D4-MIP polimerlerinin şişme oranları	89
Çizelge 4.18 Polimerlerin metanol etkileşimi sonucunda ortaya çıkan şişme oranları.	89
Çizelge 4.19 Yeni protokol ile üretilen D4 polimerlerinin şişme oranları.....	89
Çizelge 4.20 1:3:20 ve 1:6:20 protokolleri ile üretilen polimerlerin %70 su:Asetonitril çözeltisinde şişme oranları.	90
Çizelge 4.21 D4 polimerleri için elementel analiz sonuçları.	114
Çizelge 4.22 BET analizi sonucunda D4-NIP ve MIP için elde edilen adsorpsiyon verileri	117
Çizelge 4.23 BET analizi sonucunda D4-NIP ve MIP için elde edilen desorpsiyon verileri.....	117
Çizelge 4.24. Örneklerde çap dağılımı.....	139
Çizelge 4.25. Ölçek büyütme hesaplarında elde edilen değerler ile çalışma koşulları.....	140
Çizelge 4.26 1:10 kalıp molekül:MAA oranı için PM6-DH2 hesaplamaları sonucuna göre en kararlı 10 yapı.	141
Çizelge 4.27 En kararlı dördü için PM6-DH2 hesaplamaları sonuçları.	142
Çizelge 4.28 En kararlı yapılardan M0054'ün DFT hesaplamalarının sonuçları.	142

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

Çizelge 4.29 1:4 kalıp molekül:MAA oranı için PM6-DH2 hesaplamaları sonucuna göre en kararlı 20 yapı.	146
Çizelge 4.30 1:4 kalıp molekül:monomer oranında elde edilen DFT sonuçları....	147



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
CHCl ₃ /KLO	Kloroform
q _e	Denge anında adsorblanan CG konsantrasyonu
q _t	t anında adsorblanan CG konsantrasyonu
C _e	Denge anında serbest CG konsantrasyonu
L	Kolon yüksekliği
D	Kolon çapı
μ	Viskozite
ρ	Yoğunluk
ε	porozite
v _s	lineer akış hızı
d _p	partikül çapı
<u>Kısaltmalar</u>	
AST-4	Astragalozit IV – AST-IV
AST-7	Astragalozit VII – AST-VII
CG	Sikloastragenol
SKG	Siklokantogenol
meoh/M	Metanol
EtOAc	Etil Asetat
MAA	Metakrilik Asit
EGDMA	Etilen glikol dimetakrilat
BPO	Benzoil peroksit
Sty	Stiren bazlı polimer
VP	Vinilpiridin bazlı polimer
DVB	Divinilbenzen

KısaltmalarAçıklama

4-VP

4-Vinilpiridin

ITA

İtakonik asit

HEMA

2-Hidroksimetakrilat

BIA

N-(4-Vinil)-benzil iminodiasetik asit

Si-Met.

Metakrilik asit türevli silika

VPCE

4-Vinilfenil karbonat ester

MMA

Metil metakrilat

Si

Silika

Pol.

Polimerizasyon

AcAc

Asetik asit

S

Su

AcN

Asetonitril

E

Ekstre

MIP

Molecularly Imprinted Polymer – Moleküler
Baskılanmış Polimer

MIP0

Yıkama öncesi MIP

NIP

Non-molecularly Imprinted Polymer –
Moleküler Baskılanmamış Polimer

NIP

Yıkama öncesi NIP

Y4 – Y1-4-20

1:4 kalıp molekül/monomer oranına sahip
yığın polimerizasyon ürünü

Y8 – Y1-8-20

1:8 kalıp molekül/monomer oranına sahip
yığın polimerizasyon ürünü

D3 - D-1-3-20-30

1:3:20 kalıp molekül/monomer/ çapraz
bağlayıcı oranına sahip çöktürme
polimerizasyon ürünü

KısaltmalarAçıklama

D4 – D1-4-20-30

1:4:20 kalıp molekül/monomer/ çapraz
bağlayıcı oranına sahip çöktürme
polimerizasyon ürünü

D4-10 – D1-4-20-10

1:4:20 kalıp molekül/monomer/ çapraz
bağlayıcı oranına sahip çöktürme
polimerizasyon ürünü – 10 mL porojen

D4-20 – D1-4-20-20

1:4:20 kalıp molekül/monomer/ çapraz
bağlayıcı oranına sahip çöktürme
polimerizasyon ürünü – 20 mL porojen

D6 – D1-6-20-30

1:6:20 kalıp molekül/monomer/ çapraz
bağlayıcı oranına sahip çöktürme
polimerizasyon ürünü

D8 – D1-8-20-30

1:8:20 kalıp molekül/monomer/ çapraz
bağlayıcı oranına sahip çöktürme
polimerizasyon ürünü

D4-30 – D1-4-30

1:4:30 kalıp molekül/monomer/çapraz
bağlayıcı oranına sahip çöktürme
polimerizasyonu ürünü

D4-30-10 – D1-4-30-10

1:4:30 kalıp molekül/monomer/ çapraz
bağlayıcı oranına sahip çöktürme
polimerizasyon ürünü – 10 mL porojen

D4-30-20 – D1-4-30-20

1:4:30 kalıp molekül/monomer/ çapraz
bağlayıcı oranına sahip çöktürme
polimerizasyon ürünü – 20 mL porojen

D4-40 – D1-4-40

1:4:40 kalıp molekül/monomer/çapraz
bağlayıcı oranına sahip çöktürme
polimerizasyonu ürünü

KısaltmalarAçıklama

D4Y - D1-4-20-30 Y

1:4:20 kalıp molekül/monomer/ çapraz
bağlayıcı oranına sahip çöktürme
polimerizasyon ürünü – farklı polimerizasyon
sırası

İTK

İnce Tabaka Kromatografisi

HPLC

High Performance Liquid Chromatography -
Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

FTIR

Fourier Transform Infrared Spectroscopy -
Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi

BET

Brunauer, Emmet ve Teller yöntemiyle azot
adsorpsiyonu

ABD

Amerika Birleşik Devletleri

NK

Non-kovalent baskılama

K

Kovalent baskılama

MK

Metal koordinasyon, Metal iyonu baskılama

Ref

Referans

s

saat

dk

dakika

t

süre

KH

Kolon hacmi

HF

Hartree-Fock yöntemi

ZPE

Sıfır noktası enerjisi - Zero-point energy

 E_{relatif}

Bağıl enerji

PCM

Polarizable continuum model – Sürekli
polarizasyon modeli

COSMO

Conductor-like screening model – Çözücü
modeli

KısaltmalarAçıklama

DFT

Density functional theory – Yoğunluk
fonksiyoneli teorisi

PM6-DH2

Parameterization method 6 - Dispersion and
hydrogen bond interaction corrections 2 –
Parametrizasyon yöntemi 6 – Dağılım ve
hidrojen bağı etkileşimleri için düzeltmeler 2



1.0 GİRİŞ

Moleküler baskılanmış polimerler, biyobenzetim malzemeleri yani biyolojik reseptörleri taklit eden yapılar olarak, katalitik aktiviteye sahip polimerler veya yapay enzim olarak, biyosensörlerde tanıma elemanı olarak, seçimli difüzyon sağlamak amacıyla taşıyıcı membran olarak veya zor ayırma/saflaştırma işlemlerinde kromatografik dolgu malzemesi olarak kullanılmaktadır (Ulbricht and Malaisamy, 2005). Literatür incelendiğinde baskılanmış polimerlerin en yaygın kullanım alanının kromatografi olduğu görülmektedir.

Doğal ürünlerin saflaştırılmasında baskılanmış polimer teknolojisini kullanan birçok çalışma mevcuttur. Bunlardan biri Ginkgo flavonol glikozitlerini ve terpen laktonları ayırmak üzere metil akrilat ve divinil benzenden hazırlanan polimer boncuklarının adsorban olarak kullanıldığı çalışmadır. Çalışma sonucunda saflaştırma veriminin %99'a kadar çıktığı görülmektedir (Ren et al., 2008).

Benzer bir çalışma *Catharantus roseus* ekstrelerinden indol alkaloitlerin seçimli olarak ekstraksiyonu için gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada metakrilik asit (MAA) ve etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) ile hazırlanan polimerler kullanılmıştır (Lopez et al., 2011). Meyan kökleriyle yapılan bir çalışmada ise triterpen asitlerin seçimli katı faz ekstraksiyonu araştırılmıştır. Çalışma sonucunda %97'lik verim elde edilmiştir (Claude et al., 2008). Aynı şekilde betulin baskılanmış polimerler ile katı faz ekstraksiyonu performansını arttırmaya yönelik iyileştirme çalışmaları yapılmıştır (Claude et al., 2010).

Bir diğer çalışma, katı faz ekstraksiyonunda moleküler baskılama yönteminin kullanıldığı doğal ürünleri özetlemiştir. Bu çalışma, günümüze kadar yapılan, ürede pentamidin, 7-hidroksikumarin, tamoksifen, triazin ve propanolol gibi, insan plazmasında darifenasin gibi sakızda nikotin gibi moleküllerin taranmasında moleküler baskılanmış polimerlerin kullanıldığı katı faz ekstraksiyonu çalışmaları Lorenzo ve Concheiro tarafından 2004 yılında derlenmiştir. Ayrıca Geleneksel Çin Tıbbındaki bazı önemli etken maddeler için de benzer çalışmalar yürütüldüğü görülmektedir (Lorenzo and Concheiro, 2004).

Bir başka çalışma moleküler baskılanmış polimerlerin vücutta taşıyıcı olarak kullanım alanı bulabileceğini vurgulamaktadır. Tuzak sistemi de denilen bu

sistemde polimer vücuda gönderilerek vücutta birikimi zarara yol açacak ürünlerin adsorplanmasını ve uzaklaştırılmasını sağlamaktadır. Bu çalışma şeker ve kolesterol için yürütülmüştür ve başarılı sonuçlar alınmıştır (Lorenzo and Concheiro, 2004).

Türkiye’de ise bu konuda çalışan birkaç araştırma grubu bulunmaktadır. Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümünden Prof. Dr. Adil Denizli araştırma grubunun insan serumundan cıva, kadmiyum giderimi, sıvılardan nikel, toryum, siyanür giderimi, insan plazmasından demir giderimi gibi iyon baskılanmış polimerler ile yaptıkları çalışmaların yanı sıra aynı grubun lizozom saflaştırması için protein baskılama çalışmaları, insan plazmasından bilirubin uzaklaştırması gibi çalışmaları da bulunmaktadır (Aşır vd., 2005; Say vd., 2004; Yavuz vd., 2006; Odabaşı vd., 2007; Baydemir vd., 2007). Ancak Türkiye’de doğal ürünlerin bitki ekstraktlarından moleküler baskılanmış polimerler ile izolasyon konusunda yapılmış bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Moleküler baskılanmış polimerlerin sentezi için pek çok yöntem bulunmaktadır. Genel olarak fonksiyonel monomer, saflaştırılması istenilen molekülle (kalıp molekül) kompleks oluşturmakta ve bu kompleks çapraz bağlayıcı ile bir başlatıcı molekül eşliğinde polimerizasyon tepkimesine girmektedir. Oluşan polimerden kalıp molekülün uzaklaştırılması ile moleküler baskılama işlemi gerçekleştirilmektedir (Mayes and Whitcombe, 2005; Alexander et al., 2003; Shahar et al., 2016). Daha farklı yöntemler ile de moleküler baskılama yapmak mümkündür. Polimerizasyon işlemi için önem arzeden bir etken de kullanılan monomerin ve çapraz bağlayıcının miktarıdır. Bileşimin içeriğinin değişmesi hazırlanan polimerin hidrofobikliğini ve elastikiyetini doğrudan etkilemektedir (Mayes and Whitcombe, 2005). Seçilen çözgen (porojen) de polimerin hazırlanmasında büyük öneme sahiptir. Porojen reaksiyona girecek bütün maddelerin tek fazda olmasını sağladığı gibi polimerdeki gözenek yapısının ve toplam gözenek hacminin de kontrolünü sağlamaktadır. Aynı zamanda kovalent olmayan yöntemde kalıp molekülün fonksiyonel molekülle daha iyi kompleks oluşturmasında görev almaktadır (Mayes and Whitcombe, 2005; Alexander et al., 2003; Shahar et al., 2016). Bu sebeple proje boyunca en uygun polimerin bulunabilmesi için iyileştirme çalışmalarına da yer verilmiştir.

Bu proje kapsamında kalıp molekül olarak ise katma değeri yüksek biyoaktif bir molekül olan 2007 yılında piyasaya sunulmuş ve yaşlanma karşıtı serumlarda etken madde olarak yer alan sikloastragenol tercih edilmiştir. Hazırlanacak polimerler için monomer ve çapraz bağlayıcı olarak farklı özellikte malzemeler seçilmiş ve sentezlenen polimerlerin katı faz ekstraksiyonu performansları karşılaştırılmıştır. Performansı en iyi olarak belirlenen polimer ile ölçek büyütme çalışmaları yürütülerek *Astragalus* ekstresinden sikloastragenol izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

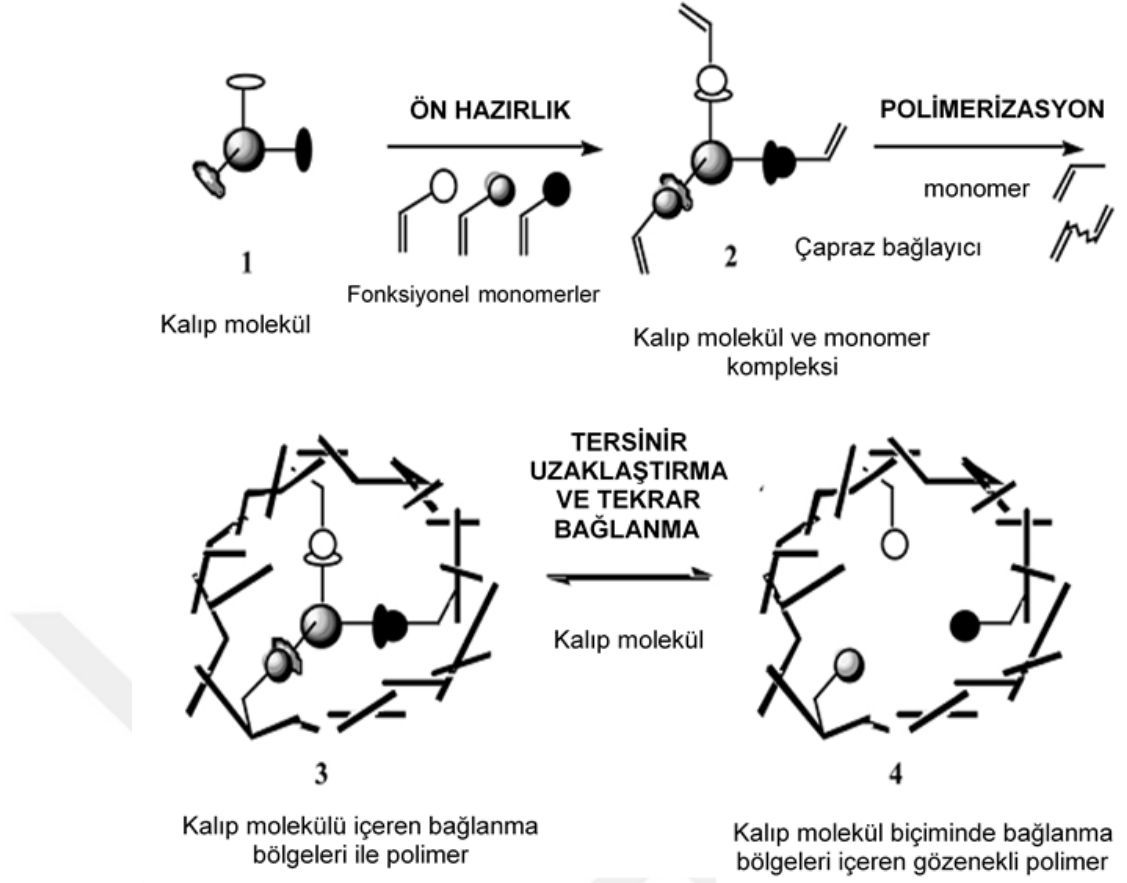


2.0 LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Moleküler Baskılama

Moleküler baskılama, sentetik bir polimere bağlanma alanları tasarlanarak belirli bir moleküle karşı yüksek seçicilik kazandırılması işlemidir (Alexander et al., 2003; Piletsky et al., 2001; Gönen, 2006). Moleküler baskılama teknolojisinde, kalıp molekül ile fonksiyonel monomerin ön hazırlık aşamasında etkileşmesinden sonra ortama çapraz bağlayıcı molekül eklenerek polimerizasyon işlemi başlatılmaktadır. Oluşan polimer kalıp molekülü de içeren bir yapıya sahiptir. Bu polimerden kalıp molekülün uzaklaştırılması ile kalıp molekül biçiminde bağlanma bölgelerine sahip olan, kalıp moleküle özgü moleküler baskılanmış polimerler (MIP) elde edilmektedir (Motherwell et al., 2004; Gönen, 2006).

Moleküler baskılama, Şekil 2.1’de kısaca özetlendiği gibi hedef moleküle özel bağlar içeren substrata seçimli malzemelerin eldesi için kullanılan bir yöntemdir (Mosbach and Ramstörn, 1996). Bu yöntemle sentezlenen polimerler, günümüzde biyosensör, membran, biyobenzetim malzemeleri, yapay enzim veya dolgu malzemesi olarak kromatografi alanı gibi pek çok alanda kullanılmaktadır. Moleküler baskılanmış polimerler doğal reseptörlere benzer olarak gösterdikleri, afinite, seçicilik ve kararlılık, kolay sentezlenmeleri, çeşitli uygulamalara kolay adapte olmaları, biyolojik yapılara göre daha dayanıklı ve ucuz olmaları gibi özellikleriyle araştırmaların hedefi olmuşlardır (Alexander et al., 2003; Piletsky et al., 2001; Saad et al., 2015).



Şekil 2.1 Moleküler baskılama yöntemi (Motherwell et al., 2004).

Çizelge 2.1’de baskılanmış polimerlerin örnekleri verilmiştir. Burada kalıp molekül türlerini, kullanılan monomer ve çapraz bağlayıcı çeşitlerini, sentez yöntemlerini ve uygulama alanlarını görmek mümkündür (Mosbach and Ramstörn, 1996). Moleküler baskılama her geçen gün kendine daha fazla uygulama alanı bulmaktadır. Çizelge 2.1 incelendiğinde moleküler baskılanmış polimerlerin yoğunlukla ayırma işlemleri için kullanıldığı dikkat çekmektedir.

Çizelge 2.1 Moleküler baskılama ile hazırlanan polimerler ve kullanım alanları.

Sınıf	Bileşik	Yöntem	Uygulama	Monomer	Çapraz Bağlayıcı	Ref.
İlaç	Timolol	NK	Kiral Ayırma	MAA/ITA	EGDMA	Fisher, 1991
	Teofilin	NK	İmmün deney	MAA	EGDMA	Vlatakis, 1993
	Diazepam	NK	İmmün deney	MAA	EGDMA	Vlatakis, 1993
	Morfin	NK	İmmün deney	MAA	EGDMA	Andersson, 1995
	Naproksen	NK	Kiral Ayırma	4-VP	EGDMA	Kempe, 1994
	Pentamidin	NK	Ayırma	MAA	EGDMA	Sellergren, 1994
Hormonlar	Enkefalin	NK	İmmün deney	MAA	EGDMA	Anderson, 1995
Böcek ilaçları	Atrazin	NK	İmmün deney Ayırma	MAA	EGDMA	Siemann, 1996
Proteinler	Transferin	K	Ayırma	Si-Silan türevleri		Glad, 1985
	RNase A	NK	Ayırma	BIA	Si-Met	Kempe, 1995
Aminoasitler	Aminoasit türevleri	NK	Kiral Ayırma	Vinil monomerler	EGDMA	Sellergren, 1985; Anderson, 1984
	Dansyl-Phe-OH	NK	Sensör	MAA	EGDMA	Kriz, 1995
Peptidler	Ac-Trp-Phe-OMe	NK	Kiral Ayırma	MAA	PETRA TRIM PETEA	Kempe, 1996
	Phe-Gly-Anilide					
	Boc-Phe-Gly-OEt					
	Cbz-Ala-Ala-OMe					
	Cbz-Ala-Gly-Phe-OMe					
Karbonhidratlar	Galaktoz Türevleri	NK	Ayırma İmmün deney	MAA	EGDMA	Mayes, 1994; Nilsson, 1995
		K	Kiral Ayırma			
	Glukoz Türevleri	NK	Ayırma İmmün deney			
	Fruktoz Türevleri	NK	Kiral Ayırma			
Koenzimler	Piridoksal Türevleri	NK	Katalizör	MAA/MMA	EGDMA	Andersson, 1989
Nükleotidler	NAD ⁺	K	Ayırma	Si-Silan Türevleri		Mansson, 1987
Steroidler	Kolesterol	K	Ayırma	VPCE	EGDMA	Withcombe, 1995
Boyalar	Safranin O	NK	Ayırma	Si-Silan türevleri		Glad, 1985
	Rodanil Mavisi	NK	Ayırma			
Metal iyonlar	Ca ²⁺	MK	Sensör	Sty	DVB	Rosatzin, 1991
	Cu ²⁺	MK	Ayırma	MAA/Sty	DVB	Tsukagoshi, 1993
Diğer	Bis-İmidazoller	MK	Ayırma	Cu-Vinil monomer	EGDMA	Dhal, 1991
	Mandelik Asit	NK	Kiral Ayırma	Vinil monomerler	DVB	Sarhan, 1987

MIP'lerin sentezi genellikle zincir polimerizasyonu ile gerçekleşmektedir. Bu yöntem serbest radikal polimerizasyonu olarak da adlandırılabilir (Haupt, 2012). Zincir polimerizasyonunda bir başlatıcı için içine girmektedir. Başlatıcı molekül reaktif merkezi olan R^* başlatıcı türler oluşturmak için kullanılmaktadır. Bu reaktif merkez bir serbest radikal, kasyon veya anyon olabilir. Polimerizasyon çok sayıda monomerin bu reaktif merkezlere bir zincir reaksiyonu ile eklenmesiyle gerçekleşmektedir (Oğian, 2004; Haupt, 2012). Kullanılan başlatıcıya göre termal veya ultraviyole (UV) ışınlar kullanılarak polimerizasyon sürdürülmektedir. Termal polimerizasyonda yüksek sıcaklıklar gerekirken, UV-polimerizasyonda yüksek sıcaklığa gerek duyulmamaktadır. Hatta eğer monomerler UV ışınlarını absorbe etme özelliğine sahip ise başlatıcı kullanımına bile gerek kalmamaktadır (Komiya et al., 2004; Andersson, 2000; Hillberg, 2008).

MIP'ler için birçok farklı zincir polimerizasyon yöntemi uygulanabilmektedir. Polimerizasyon homojen veya heterojen olarak gerçekleştirilebilmektedir. Yığın (bulk), süspansiyon, çöktürme, emülsiyon, çekirdek-kabuk, film sentezi, aerosol polimerizasyonu, iki basamaklı şişme ve silika parçaları üzerinde polimerizasyon gibi yöntemler kullanılabilmektedir (Andersson, 2000; Hillberg and Tabrizian, 2008). Her yöntem farklı parametrelerin kontrolünü gerektirdiğinden farklı özelliklerde polimerlerin oluşumuna sebep olmaktadır (Perez-Moral and Mayes, 2001; Perez-Moral and Mayes, 2004). Bu projede yığın polimerizasyonu ve çöktürme polimerizasyonu yöntemleri kullanılmıştır.

Kullanılan en eski homojen polimerizasyon yöntemi yığın polimerizasyonudur (Perez-Moral and Mayes, 2004). Porojen olarak genellikle organik çözgen kullanılmaktadır. Bütün bileşenler karıştırılıp polimerize edilmektedir. Sonuçta katı bir blok halinde bir polimer elde edilmektedir. Bu yöntem ile minimum oranda kirliliğe sahip ürün elde edilmektedir (Oğian, 2004). Ancak polimerizasyonun kontrolün zordur. Sıkı bir sıcaklık ve karıştırma kontrolü gerekmektedir. Özellikle düşük dönüşüm oranlarında reaksiyon sisteminin viskozitesi hemen artacağından karıştırma önemli bir parametre olarak yer almaktadır. Viskozite ve ekzotermik reaksiyon doğası bölgesel sıcak noktalara sebep olmaktadır. Bunun sonucunda da polimerde parçalanma veya renk değişimi

oluşabilmektedir (Perez-Moral and Mayes, 2004; Odian, 2004; Hillberg and Tabrizian, 2008; Saad et al., 2015).

Katı bir blok olarak elde edilen polimerin mekanik darbelerle öğütülmesi bu yöntemin en büyük dezavantajıdır. Uygulanan mekanik kuvvet polimerin bozulmasına sebep olmaktadır (Mosbach and Ramstörn, 1996; Hillberg and Tabrizian, 2008).

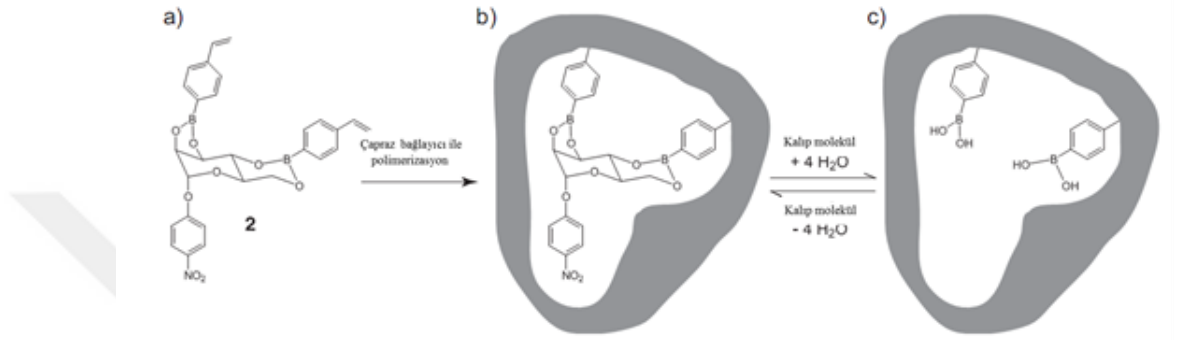
Çöktürme polimerizasyonu, mikron altı boyutunda partikül elde edilmesini sağlamaktadır. Bu yöntemde zincir büyümesi esnasında çözünürlükleri azalan partiküllerin çökmesi esas alınmaktadır. Çöktürme polimerizasyonu yığın polimerizasyonu gibi homojen bir karışım ile başlamaktadır. Ancak polimerizasyonun başladığı andan itibaren çöken polimerler heterojen bir yapının oluşmasına sebep olmaktadır (O dian, 2004; Hillberg and Tabrizian, 2008).

Moleküler baskılama teknolojisinin geçmişi 1940-50'li yıllarda Dickey'in deneylerine dayanmaktadır (Dickey, 1949, 1955). Linus Pauling'in antikor hazırlama yöntemini kullanarak Dickey boya moleküllerine seçimli silika jel sentezlemek istemiştir. Dickey'in elde ettiği silikalar ilk baskılanmış malzemeler olarak kabul edilebilmektedir. Moleküler baskılama, kovalent, yarı kovalent, non-kovalent veya metal-iyon etkileşimli olarak yürütülebilmektedir (Dickey, 1949, 1955; Motherwell et al., 2004). Organik moleküllerin baskılanması ise vinil polimerlerinin kovalent baskılanmasıyla 1970'lere dayanmaktadır. Non-kovalent baskılama ise 1980'lerde geliştirilmiştir (Mayes and Whitcombe, 2005; Arshady and Mosbach, 1981).

Kovalent baskılama ile MIP sentezi yönteminde, kalıp molekül-monomer ilişkisi polimerizasyon reaksiyonundan bağımsız olarak ön hazırlık aşamasında kovalent bağlarla sağlanmıştır. Dolayısıyla bu kalıp molekülün uzaklaştırılması ve de tekrar bağlanması kimyasal reaksiyonlarla mümkün olmaktadır. Klasik kovalent baskılama tekniği boronat esterleri, metal/asetal ve Schiff bazı oluşumu gibi tersinir reaksiyonları kapsamaktadır (Mayes and Whitcombe, 2005). Şekil 2.2'de kovalent baskılamanın nasıl gerçekleştiğini gösteren bir örnek bulunmaktadır.

Kovalent baskılama, monomer-kalıp molekül kompleksinin kararlı sitokiometrik oranda olması sebebiyle daha kesin bir moleküler baskılama süreci, polimer bağlanma merkezi eldesi ve de yüksek sıcaklık/düşük pH gibi ekstrem

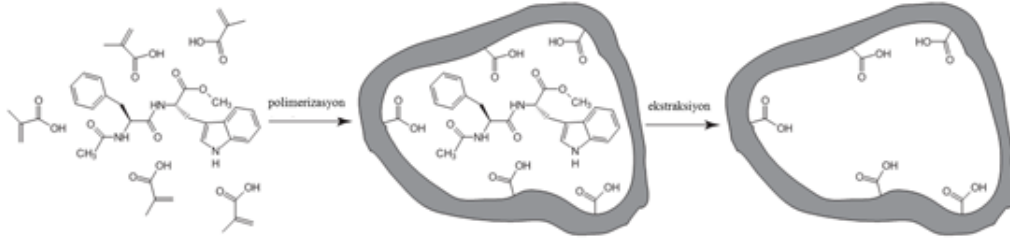
polimerizasyon şartlarına uygunluğu sebebiyle non-kovalent baskılamaya göre avantajlıdır (Mayes and Whitcombe, 2005). Ancak kovalent bağlarla monomer-kalıp molekül kompleksi oluşturmak zahmetlidir ve kullanılabilircek tersinir kovalent bağ çeşitleri sınırlıdır. Kalıp molekül uzaklaştırma sırasında uygulanan reaksiyon baskılamanın etkisini azaltabilir ve tekrar bağlanma reaksiyonu non-kovalent baskılamada karşılaşılanın aksine çok yavaştır (Mayes and Whitcombe, 2005; Gönen, 2006; Caro et al., 2006).



Şekil 2.2 4-nitrofenil-α-D-mannopiranozit-2,3:4,6-di-O-(4-vinilfenilboronat) molekülünün baskılanması a) çapraz bağlayıcı ile polimerizasyon b) hidroliz ile kalıp molekül giderimi c) kalıp molekülün tersinir reaksiyon ile bağlanıp kopması (Mayes and Whitcombe, 2005)

Yarı kovalent baskılama yönteminde, kalıp molekül ve monomer arasında kovalent bağlarla kurulmuş bir ilişki olmasına rağmen kalıp molekülün moleküler baskılanmış polimere tekrar bağlanması tamamen non-kovalent yöntemlerle gerçekleşmektedir (Mayes and Whitcombe, 2005; Gönen, 2006).

Non-kovalent baskılama yönteminde ise, kalıp molekül ve fonksiyonel monomer arasındaki etkileşim hidrojen bağları, iyon çiftleri, dipol-dipol etkileşimler ve van der Waals kuvvetleri ile gerçekleşmektedir (Claude et al., 2008; Claude et al., 2010; Lopez et al., 2011; Ji et al., 2015). Kovalent baskılamadakinin tersine bu etkileşimler kararsız ve sürekli yer değiştirmeye müsaittir (Mayes and Whitcombe, 2005). Dolayısıyla kalıp molekülün tekrar bağlanması ve polimerden ayrılması hızlı ve kolay bir şekilde gerçekleşmektedir. Şekil 2.3'te non-kovalent baskılamayla sentezlenen bir MIP örneği verilmiştir. Bu tür baskılamada bağlanma merkezleri kesin değildir ve sitokiometrik bir bağlanma gözlenmez. Dolayısıyla polimerizasyon koşullarının ve kullanılan monomer/çapraz bağlayıcı vb. miktarının baskılamada etkisi büyüktür (Mayes and Whitcombe, 2005; Gönen, 2006; Caro et al., 2006; Saad et al., 2015).



Şekil 2.3 Bir dipeptidin metakrilik asit polimeriyle baskılanması (Mayes and Whitcombe, 2005).

Günümüzde non-kovalent baskılama, kalıp molekülün seçiminin ve kimyasal reaksiyon gereksiniminin olmayışı bakımından daha kolay olduğu için tercih edilmektedir. Bu yöntemde monomer ve kalıp molekül arasında bir ön-kompleks oluşumunun olduğu düşünülmektedir. Ancak bu mekanizmanın nasıl işlediğini kanıtlayan kesin bir bulgu yoktur (Mayes and Whitcombe, 2005).

Metal iyonlarını baskılama yönteminde ise metal iyonları ya kalıp molekül olarak kullanılabilmekte ya da polimer-kalıp molekül etkileşiminin bir bileşeni olarak meydana gelen reaksiyonda görev alabilmektedirler (Mayes and Whitcombe, 2005; Gönen, 2006; Say, 2004). Çizelge 2.1 incelendiğinde kovalent, non-kovalent ve metal iyonları baskılama yöntemleriyle gerçekleştirilen baskılamalara örnekler görülmektedir.

Çizelge 2.1’de görüleceği gibi moleküler baskılama en çok ayırma saflaştırma işlemlerinde kendine kullanım alanı bulmuştur. Ayırma saflaştırma yöntemleri arasında sıvı kromatografi, kapiler elektroforez, kapiler elektrokromatografi ve katı faz ekstraksiyonu en yaygın kullanıma sahip olanlardır. Bu yöntemlerden katı faz ekstraksiyonu düşük derişimdeki analitlerin izolasyonunda çok sık kullanılan bir yöntemdir (Lopez et al., 2011; Claude et al., 2008; Claude et al., 2010; Xu, 2004; Ji et al., 2015).

Katı faz ekstraksiyonu, katı adsorban üzerinde mobil faz yardımıyla çözeltinin içindeki analitin hızlı bir şekilde izole edilmesi amacıyla kullanılan bir yöntemdir. Katı faz ekstraksiyonu genellikle küçük ölçekte bir çözeltideki safsızlıkları gidermek amaçlı kullanılmaktadır. Sınırlı sayıda da olsa büyük ölçek çalışmaları bulunmaktadır (Simpson, 2000; Shannon and Ensley, 1991). Genellikle analitik veya kromatografik bir işlem öncesinde ön-işlem basamağı olarak yer almaktadır. Ancak moleküler baskılama çalışmalarında katı faz ekstraksiyonu ile doğrudan istenilen analitin izolasyonu hedeflenmektedir (Lopez et al., 2011;

Claude et al., 2008; Claude et al., 2010; Xu, 2004; Simpson, 2000; Ji et al., 2015). Sıvı kromatografisinde olduğu gibi bir kolon içerisinde yer alan katı dolgu maddesi sabit faz olarak adlandırılmaktadır. Katı faz ekstraksiyonlarında en sık rastlanan alıkonma mekanizmaları; van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağları, dipol-dipol kuvvetleri ve katyon anyon etkileşmesidir. Adsorban olarak silika türevleri, karbon ve polimerik malzemeler kullanılmaktadır (Simpson, 2000; Haupt, 2012; Ferenc and Biziuk, 2006; Komiyama, 2004).

Kartujlarla gerçekleştirilen katı faz ekstraksiyonu çalışma prosedürünün kolaylığı sebebiyle tercih edilmektedir. Katı faz ekstraksiyonu prosedürü; şartlama, yükleme, yıkama ve elüsyon olmak üzere 4 basamaktan oluşmaktadır (Simpson, 2000; Haupt, 2012; Ferenc and Biziuk, 2006; Vasapollo, 2011; Zhu et al., 2016).

Katı faz ekstraksiyonlarında moleküler baskılanmış polimer kullanımı ilk kez 1994'te Sellergren ve grubu tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmada idrardan pentamidin ekstraksiyonu için moleküler baskılama ile polimer sentezlenerek katı faz ekstraksiyonu denemeleri yürütülmüştür (Sellergren, 1994).

Ölçek büyütme söz konusu olduğunda pek çok faktör devreye girmektedir. Partikül boyutu, por çapı, bağ yapısı, sıcaklık ve mobil faz gibi kinetik parametreler ile yatak yüksekliği, akış hızı, dolgu maddesinin yoğunluğu gibi dinamik parametreler hesaba katılarak ölçek büyütme çalışmaları gerçekleştirilmektedir. İdeal bir durumda kolon dolgusunun ve işletim koşullarının değişmediği düşünülürse ölçek büyütme basitçe aşağıda verilen denklem ile gerçekleştirilebilir (Rathore and Valeyuhdan, 2003; Shannon and Ensley, 1991).

$$\frac{L}{v} = C * N$$

L, yatak yüksekliği; v, lineer hız; N, teorik tabaka sayısı; C, sabit.

Katı faz ekstraksiyonu genellikle vakum altında gerçekleştirilen bir ayırma yöntemidir. Dolayısıyla akış hızı pek çok parametreden etkilenmektedir. Kolondaki dolgu maddesinin gözenek yapısı, granüler veya toz halinde oluşu, kolonda oluşabilecek hava kabarcıkları veya kanallaşma problemi akış hızına etki edecek parametreler arasındadır (Rathore and Valeyuhdan, 2003). Kolonlarda oluşan basınç farkı da akış hızına doğrudan etki ettiğinden ölçek büyütmede önemli

parametrelerdendir. Ergun Denklemi kolon boyunca oluşan basınç farklarını ölçmek için kullanılmaktadır (Treybal, 1980).

$$\Delta P = 150 * \mu * \frac{(1 - \varepsilon)^2 * L}{\varepsilon^3 * d_p^2} * v_s + 1,75 * \frac{(1 - \varepsilon) * L * \rho}{d_p * \varepsilon^3} * v_s^2$$

Kolondaki basınç farkı ve lineer akış hızı sabit tutularak Ergun denklemi ile kolon çap ve yükseklikleri hesaplanabilmektedir. Buradan hareketle de kolona yüklenecek polimer miktarına geçiş sağlanabilmektedir.

2.2 Moleküler Baskılamaya Etki Eden Faktörler

Moleküler baskılamaya pek çok faktörün etkisi bulunmaktadır. Kullanılan kimyasal malzemeler; kalıp molekül, monomer, çapraz bağlayıcı, porojen, başlatıcı, polimerizasyon koşulları, yıkama çözümleri, uygulanan mekanik yöntemler gibi pek çok dış faktörün moleküler baskılamaya etkisi tespit edilmiştir (Lorenzo and Concheiro, 2004; Komiyama et al., 2004). Moleküler baskılanmış polimerin kalıp molekül uzaklaştırılmasından sonra oluşan yapısal boşluğu koruyabilmesi için sert ve dayanıklı olması gerekmektedir. Ancak uzaklaştırılan kalıp moleküllerin tekrar bağlanabilmesi için yapılarının bir o kadar da esnek olması gerekmektedir. İşte bu sebeple moleküler baskılama tekniği uygulanırken kullanılan malzemelerin özelliklerinin bilinmesi önem teşkil etmektedir (Lorenzo and Concheiro, 2004; Komiyama et al., 2004; Vasapollo et al., 2011; Haupt, 2012; Kyzas et al., 2015; Shahar et al., 2016).

Moleküler baskılama yönteminde monomerin kalıp molekülün üzerindeki fonksiyonel gruplarla etkileşime girmesi beklenmektedir. Ancak kalıp moleküllerin aynı zamanda polimerizasyon reaksiyonu için inert maddeler olmaları gerekmektedir. Aksi bir durumda kalıp molekül farklı reaksiyonlara sebep olabilecek, dolayısıyla da oluşacak olan bağlanma merkezleri beklenilenden farklı yapılara sahip olabilecektir (Perez-Moral and Mayes, 2004; Haupt, 2012). Böyle bir durumla karşılaşılmasında için kalıp molekülün polimerize olabilecek gruplara sahip olması, polimerizasyon reaksiyonu için inert ve polimerizasyon koşullarında kararlı bir madde olması gerekmektedir. Aynı zamanda molekülün büyüklüğünün de baskılamaya etkisi bulunmaktadır. Molekül boyutu arttıkça hem baskılama hem

de yıkama işlemleri zorlaşacaktır (Lorenzo and Concheiro, 2004; Komiyama et al., 2004; Cormack and Eloraza, 2004; Perez-Moral and Mayes, 2004; Haupt, 2012).

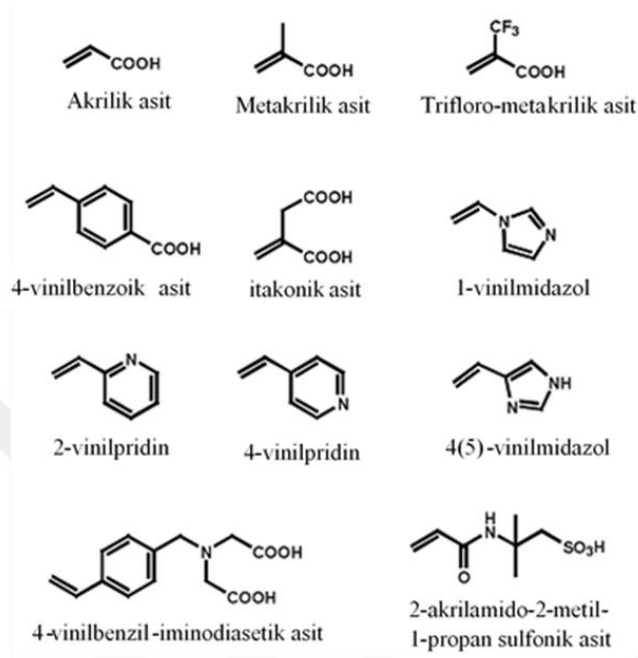
Çizelge 2.1’de verilmiş olduğu gibi kalıp molekül olarak iyonlar, farmasötik ilaçlar, pestisitler, nükleotitler, steroidler ve şekerler gibi küçük moleküller, peptidler ve proteinler seçilebilmektedir (Mosbach and Ramstörn, 1996; Gönen, 2006).

Fonksiyonel monomer seçimi moleküler baskılama için önemlidir. Özellikle non-kovalent baskılamada monomer ile kalıp molekülün etkileşimi önemli bir yer tutmaktadır (Monti et al., 2006; Vasapollo et al., 2011; Haupt, 2012). Monomerin, seçilen kalıp molekülün fonksiyonel gruplarıyla etkileşime girebilecek fonksiyonel gruplarının olması gerekmektedir. Bazı durumlarda fonksiyonel gruplar arası etkileşimi arttırmak için, kullanılan kalıp molekül/monomer oranı arttırılabilmektedir (Monti et al., 2006; Vasapollo et al., 2011). Günümüzde bu konuda sürekli aktif çalışan bilim insanları kolayca seçim yapabilseler de monomer seçimini sistematik hale getirebilmek için yöntem geliştirme çalışmaları da yapılmaktadır. Örneğin Mini-MIP kütüphaneleri oluşturulmuştur ancak bu kütüphanelerin içerdiği denemeler her koşulda olumlu sonuç vermemektedir (Monti et al., 2006; Vasapollo et al., 2011; Haupt, 2012).

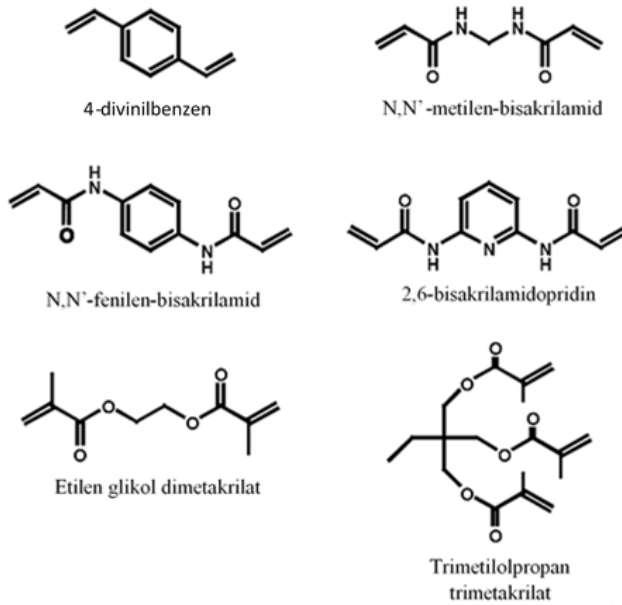
Şekil 2.4’te en sık kullanılan fonksiyonel monomerler verilmiştir. Asidik Monomerler: Metakrilik asit (MAA), p-vinilbenzoikasit, akrilikasit (AA), 2-(triflorometil)-akrilikasit (TFMAA); Bazik Monomerler: 4-vinilpiridin (4-VP), 2-vinilpiridin (2-VP), 4-(5)-vinilimidazol, allilamin; Nötral monomerler: Akrilamit, metakrilamit, 2-hidroksimetakrilat (HEMA), akrilonitril (AN), metilmetakrilat (MMA), stiren, etilstiren (Cormack and Eloraza, 2004).

Çapraz bağlayıcılar, polimerin örgü yapısını oluştururlar. Bu örgü yapının ve bağlanma merkezlerinin kararlılığı çapraz bağlayıcılara bağlıdır. Polimerin gözenek boyutu ve mekanik dayanıklılığı da çapraz bağlayıcılar ile artıp azalmaktadır. Bu nedenle genellikle %80’in üzerinde çapraz bağlayıcı kullanılmaktadır (Lorenzo and Concheiro, 2004; Komiyama et al., 2004; Cormack and Eloraza, 2004; Shahar et al., 2016). Çapraz bağlayıcının monomere olan oranı da moleküler baskılamada etkili bir parametredir. Oran çok küçükse bağlanma merkezleri birbirine çok yakındır. Eğer çok yüksekse çapraz bağlayıcı da kalıp

molekülle non-kovalent etkileşime girebilmekte ve moleküler baskılamanın etkisini azaltabilmektedir (Lorenzo and Concheiro, 2004; Komiyama et al., 2004; Cormack and Eloraza, 2004; Shahar et al., 2016). Şekil 2.5'te en sık kullanılan çapraz bağlayıcılar verilmektedir.



Şekil 2.4 Sık kullanılan fonksiyonel monomerler (Cormack and Eloraza, 2004).



Şekil 2.5 Sık kullanılan çapraz bağlayıcılar (Cormack and Eloraza, 2004).

Porojen, polimerizasyon reaksiyonu için önemli bir bileşendir. Tüm bileşenlerin tek fazda bir araya gelmesini sağlamaktadır (Komiyama et al., 2004; Cormack and Eloraza, 2004). Polimerizasyon sırasında çözgenin uzaklaşmasıyla

polimer yapısında gözenekler meydana gelmektedir. Bu sebeple kullanılan çözgene porojen adı verilmektedir. Bu açıdan bakıldığında porojen, polimerin morfolojisinde ve toplam gözenek hacminin kontrolünde önemli bir göreve sahiptir (Cormak and Eloraza, 2004; Haupt, 2012). Porojen seçiminde moleküler baskılama yönteminin de etkisi bulunmaktadır. Özellikle non-kovalent baskılamada porojenin monomer-kalıp molekül etkileşimini artırıcı etkisi olabilmektedir (Komiya et al., 2004; Cormak and Eloraza, 2004; Haupt, 2012; Shahar et al., 2016). En iyi porojenler tolüen ve diklorometan gibi dielektrik sabiti düşük olan çözgenlerdir. Polar çözgenler kullanıldığında ise daha makro gözenekli yapılar elde edilmektedir. Dolayısıyla yüzey alanı ve de moleküler bağlanma azalmaktadır (Komiya et al., 2004; Cormak and Eloraza, 2004; Haupt, 2012; Shahar et al., 2016).

Polimerizasyon reaksiyonunun son bileşeni ise başlatıcıdır. Polimerizasyon türüne göre başlatıcı seçilmelidir. Kullanılacak polimerizasyon yöntemine göre başlatıcının fotokimyasal ya da termal özelliği dikkate alınmalıdır (Komiya et al., 2004; Odian, 2004).

MIP'lerin sentezine etki eden kimyasal faktörlerin yanı sıra fiziksel faktörler de bulunmaktadır. Örneğin termal polimerizasyonlarda uygulanan sıcaklığın sentezlenen polimerler üzerindeki etkisi önemlidir (Komiya et al., 2004). Çizelge 2.2'de bazı başlatıcıların sıcaklığa bağlı yarılanma ömürleri gösterilmektedir. Dolayısıyla polimerizasyon sıcaklığına karar verilirken hem kullanılacak olan başlatıcı hem de seçilen kalıp molekülün o sıcaklıktaki kararlılığı dikkate alınmalıdır (Komiya et al., 2004; Odian, 2004).

Çizelge 2.2 Bazı başlatıcıların yarılanma zamanları (O dian, 2004).

Başlatıcı	Yarılanma Ömrü					
	50°C	70°C	85°C	100°C	130°C	175°C
Azobisisobutironitril	74s	4.8s	-	7.2dk	-	-
Benzoil peroksit	-	7.3s	1.4s	20dk	-	-
Asetil peroksit	158s	8.1s	1.1s	-	-	-
t-Butil perasetat	-	-	88s	13s	18dk	-
Kumil peroksit	-	-	-	-	1.7s	-
t-Butil peroksit	-	-	-	218s	6.4s	-
t-Butil hidroperoksit	-	-	-	338s	-	4.81s

Polimerizasyon için bir başka önemli faktör polimerizasyon işleminden önce ortamdaki oksijenin giderimidir. Oksijen, serbest radikalleri hapsetmektedir ve dolayısıyla da polimerizasyonun gecikmesine veya durmasına sebep olmaktadır (Komiya et al., 2004).

Polimerizasyondan çok sentezlenen polimerin yapısına etkisi olan bir parametre ise karıştırma hızıdır. Karıştırma hızına bağlı olarak polimerin boyutu değişiklik gösterebilmektedir (Gönen, 2006).

Parametrelerde yapılan değişikliklerin sentezlenen polimerler üzerindeki etkisinin görülebilmesi için polimerlerin karakterizasyonu büyük önem arz etmektedir. Sentezlenen polimerlerin üç farklı karakterizasyonu mümkündür: kimyasal karakterizasyon, morfolojik karakterizasyon, moleküler tanıma (Cormack and Eloraza, 2004; Odian, 2004).

Kimyasal karakterizasyon, elementel analiz ve FTIR ile yapılan polimerin yapısıyla ilgili bilgi alınmasını sağlayan karakterizasyon türü iken morfolojik karakterizasyon, şişme, azot sorpsiyonu ve mikroskop analizleri gibi polimerin morfolojisini ortaya koyan karakterizasyon türüdür. Moleküler tanıma ise polimerin hedeflenen alandaki başarısını ortaya koyan karakterizasyondur. Moleküler tanıma testleri, polimerlerin kalıp moleküle özgüllüğünü sınamak adına yapılmaktadır. (Cormack and Eloraza, 2004; Odian, 2004).

Sentezlenen polimerler hakkında bir diğer bilinmesi gereken özellik polimerlerin bağlanma kapasiteleri ve kinetikleridir. Moleküler baskılama bir adsorpsiyon mekanizması değilse de bağlanma noktalarının heterojenitesini ve de bağlanma kinetiğinin ne şekilde geliştiğini açıklamak için adsorpsiyon izotermi ve adsorpsiyon kinetiği denklemleri kullanılmaktadır (Karaboyacı, 2010; Qui et al., 2009; Yu et al., 2011).

2.3 Adsorpsiyon Kinetiği – Adsorpsiyon İzotermi

Moleküler baskılama mekanizmasının anlaşılması adına adsorpsiyon izotermi ve adsorpsiyon kinetiğinin araştırılması önem arz etmektedir. Adsorpsiyon, adsorban yüzeyine tutunan maddenin konsantrasyonu ve çözeltide kalan maddenin konsantrasyonu arasında bir denge oluşuncaya kadar devam eden bir süreçtir. Bu durum matematiksel olarak denge izotermiyle açıklanır. En çok

kullanılan izotermier Freundlich ve Langmuir izotermieridir (Baydemir, 2007; Yu, 2011).

Freundlich eşitliği $q_e = K_F * C_e^{1/n}$ şeklindeidir. Bu eşitlikte q_e adsorblanan CG'nin konsantrasyonunu, C_e serbest CG konsantrasyonunu ifade etmektedir. K_F ve n Freundlich sabitleridir. Bu durumda n , adsorpsiyon yoğunluğunu ifade etmektedir. $\log q_e$ 'ye karşı $\log C_e$ grafiği çizildiğinde bu sabitler hesaplanabilmektedir. $1/n$ değerinin 0 ile 1 arası olması gerekmektedir. Değer 1'e ne kadar yakınsa polimer o kadar heterojen bir yzey yapısına sahip olmaktadır (Baydemir, 2007; Karaboyacı, 2010).

Langmuir izotermi ise tek tabakalı homojen adsorpsiyonu açıklamak için kullanılmaktadır. $\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{K_L} + \left(\frac{a_L}{K_L}\right) * C_e$ eşitliğiyle ifade edilmektedir. Denklemdede, C_e , zeltideki madde konsantrasyonunu, q_e , adsorbe olan madde konsantrasyonunu, K_L adsorbanın kapasitesini, a_L adsorpsiyon enerjisini belirtir. C_e/q_e 'ye karşı C_e grafiği çizildiğinde bu sabitler hesaplanabilmektedir. Langmuir izoterminin elverişli olup olmadığı dağılma sabiti hesaplanarak tespit edilmektedir. R_L dağılma sabiti řu denklemlle açıklanmaktadır: $R_L = \frac{1}{a_L * C_0}$. Buna göre R_L 1'den büyük ise elverişsiz, 1'e eşit ise lineer, 0'a eşit ise tersinmez bir dağılım elde edilirken R_L 0 ile 1 arasındaysa elverişli bir dağılım elde edilmektedir. Bu denklemdede C_0 maddenin başlangıçtaki derişimini ifade etmektedir (Baydemir, 2007; Karaboyacı, 2010).

Bir başka önemli eğri ise Scatchard eğrisidir. Scatchard eğrisi genellikle proteinlerin liganda olan afinitesini hesaplamak için kullanılmaktadır. Eğri, $\frac{S_b}{F} = \frac{-S_b}{K_{diss}} + \frac{S_{bmax}}{K_{diss}}$ denklemlle ifade edilmektedir. F , zeltideki madde konsantrasyonunu, S_b , adsorbandaki madde konsantrasyonunu, K_{diss} adsorpsiyon sabitini ifade etmektedir. Langmuir izoterminde olduğu gibi S_b/F 'e karşı S_b grafiği çizilerek sabitler hesaplanmaktadır (Lopez et al., 2011, Zhu et al., 2016).

Adsorpsiyonu kontrol eden hız basamağı da önemli noktalardan biridir. Geleneksel kinetik modeller ile difüzyonel ve tepkimesel modeller kullanılarak zamana karşı çizilen adsorpsiyon grafikleri aracılığıyla hangi hız basamağının adsorpsiyon mekanizmasını kontrol ettiği açıklanmaktadır. Geleneksel kinetik

modeller Pseudo 1. derece ve Pseudo 2. derece olarak adlandırılmaktadır (Karaboyacı, 2010).

$$\text{Pseudo 1. Derece: } \log(q_e - q_t) = \log q_e - \frac{k_1}{2.303} t$$

Zamana karşı $\log(q_e - q_t)$ grafikleri ile bu model aydınlatılmaktadır.

$$\text{Pseudo 2. Derece: } \frac{1}{q_e - q_t} = \frac{1}{q_e} + k_2 t$$

Zamana karşı $\frac{1}{q_e - q_t}$ grafikleri ile de ikinci model ortaya konmaktadır.

Difüzyonel ve Tepkimesel modeller ise sonsuz çözelti hacmi (ISV) ve tepkimeye girmeyen çekirdek modeli (UCM) olarak iki kategoriden oluşmaktadır. Bu modeller iyon değiştiricilerde de sık karşılaşılan modellerdir. Çizelge 2.3'te bu modellerin ifade ettiği denklikler verilmiştir. Denkliklerde, $X = \frac{q_t}{q_e}$ 'yi ifade etmektedir. Denkliklerin sol tarafı aranan fonksiyonu göstermektedir. Bu fonksiyonların zamana karşı çizilen grafikleri ile modeller ortaya konmaktadır (Helfferich, 1962). Moleküler baskılama için de bu çalışmada bu denkliklerden faydalanılmıştır.

Çizelge 2.3 ISV ve UCM Hız Belirleyici Adımlar için Denklemler

Model	Denklem	Hız belirleyici adım
ISV	$-\ln(1-X)=kt \text{ -- } k=D\pi^2/r_0^2$	Film difüzyonu
ISV	$-\ln(1-X^2)=K_{lit} \text{ -- } K_{li}=3DC/r_0 \delta C_r$	Partikül difüzyonu
UCM	$X=(3C_{A0}KmA/ar_0Cs_0)t$	Sıvı film
UCM	$3-3(1-X)^{2/3}-2X=(6D_{eR}C_{A0}/ar_0^2Cs_0)t$	Tabaka
UCM	$1-(1-X)^{1/3}=(ksC_{A0}/ar_0Cs_0)t$	Kimyasal reaksiyon

Bir diğer adsorpsiyon mekanizması ise partikül içi difüzyondur. Weber-Morris modeline göre $q_t = k * t^{1/2}$ partikül içi difüzyonu ifade etmektedir (Qui et al., 2009). Denklikteki k, partikül içi difüzyon hız sabitini göstermektedir. q_t 'ye

karşı $t^{1/2}$ grafiğinin çizilmesi ile partikül içi difüzyonunu hız belirleyici adım olup olmadığı anlaşılmaktadır.

2.4 Sikloastragenol

Sikloastragenol (CG), *Astragalus* türlerinde bulunan minör metabolitlerden biridir (Şekil 2.6). Aynı şekilde köklerde yer alan Astragalozit IV ve Astragalozit VII gibi majör metabolitlerin de aglikonudur. *Astragalus* cinsi, Leguminosae familyasının bir üyesidir ve ülkemizde yaklaşık 478 tür ile temsil edilmektedir (Çeçen vd., 2016). *Astragalus*, Anadolu'nun hemen hemen her bölgesine dağılmıştır. Bitkilerin kökleri (özellikle *A. microcephalus*, *A. brachycalyx* ve *A. gummifer*), ülkemizde çok eski yıllardan beri elde edilen ve ihracatı da yapılan bir ürün olan kitre zamkı drogunu (emülsiyon ajanı ve kıvamlaştırıcı) vermesi nedeni ile ticari öneme sahiptir. Ancak toplanması çok zahmetli olduğundan ve ekonomik değeri düştüğünden günümüzde pek değerlendirilmeyen bir doğal kaynak haline gelmiştir.

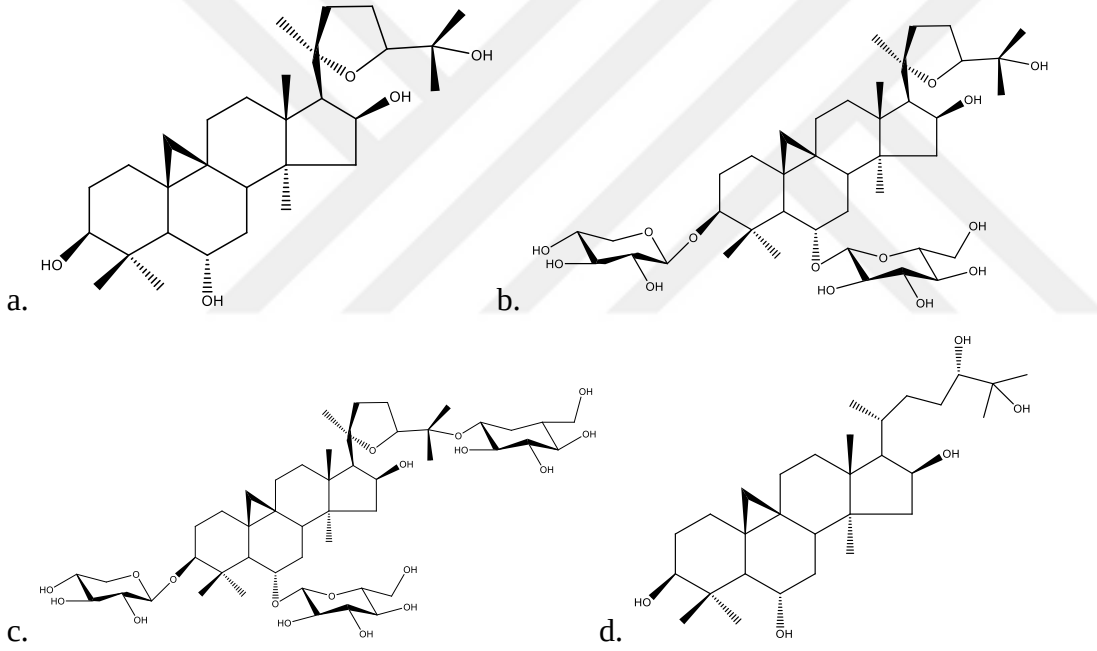
Astragalus bitkisi, geleneksel Çin tıbbında köklerinden hazırlanan polisakkarit ve saponinlerce zengin formülasyonlar, kanser ve immün sistem tedavilerinde en çok başvurulmuş doğal ilaçtır. Bağışıklık sistemini güçlendirici ve stresle mücadele özellikleri nedeniyle gıda destekleyici ürünler pazarında çok satan ürünler arasındadır (Akgün, 2006; Bedir, 1998; Bedir et al., 1998a; Bedir et al., 1998b). *Astragalus*'un karaciğerde hücre hasarına karşı koruma sağlayabildiğini kalp ve beyin dokularına oksijen taşınmasına yardımcı olduğunu, vücudun şevk ve direncini geliştirdiğini ve de kalbi güçlendirdiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Akgün, 2006). Aynı zamanda *Astragalus* preparatlarının diüretik, vazodilatör, antiperspirant olarak kullanıldığı, nefrit, diyabet, solunum yolları enfeksiyonları ve uterus kanserlerinde anti-tümör etkisinin bulunduğu bilinmektedir. Bu bitkilerin köklerinin Güneydoğu Anadolu'da yara iyi edici ve kan kanseri tedavisinde halk arasında kullanıldığı saptanmıştır (Akgün, 2006; Bedir, 1998; Bedir et al., 1998a; Bedir et al., 1998b; Bedir et al., 2000; Bedir et al., 2001).

Tüm dünyada *Astragalus* kök ticaretinde pazarın büyük çoğunluğunu Çin, Japonya ve A. B. D. oluşturmaktadır. Sadece Çin'deki *Astragalus* kök ticareti ise yaklaşık 6000 tonu bulmaktadır. Bu köklerden 1 kg sikloastragenol elde edebilmek için 1 ton kökün işlenmesi gerekmektedir. Etkin maddelerinin ekstre edilerek ilaç

ve gıda desteği ürünlerin yapımında hammadde olarak kullanıldığı bilenen bu bitkiden aktif metabolitlerin alternatif yollarla eldesi endüstri için çok önemlidir (Drug Information Online; Wu, 2005; Zhong and Yu, 2007).

Sikloastragenol telomeraz enziminin miktarını yükselterek T hücrelerinin çoğalmasını arttırdığı, potent antikanser aktivite gösterdiği ve immün sistemi kuvvetlendirdiği kanıtlanmıştır (Akgün, 2006; Bedir, 1998; Valenzuela et al., 2009). Hali hazırda yaşlanma karşıtı serumlara aktif madde olarak eklenen bu metabolitin eldesini hızlandırabilecek veya kolaylaştırabilecek inovatif yöntemler geliştirilmeye çalışılmaktadır.

Şekil 2.6'da proje boyunca adı geçen sikloartan türevlerinin yapıları verilmiştir.



Şekil 2.6 a. Sikloastragenol (CG) b. Astragalozit IV (AST-4) c. Astragalozit VII (AST-7) d. Siklokantogenol (SKG).

Proje boyunca, moleküler baskılama tekniği kullanılarak sikloastragenole seçimli polimerler sentezlenmiştir. Bu polimerlerin sikloastragenole olan seçimlilikleri, bağlanma ve katı faz ekstraksiyonu denemeleri ile karşılaştırılmıştır. Kimyasal, morfolojik karakterizasyonları ve moleküler tanıma özellikleri ortaya konan polimerlerden en yüksek geri kazanım oranına sahip olanı ile katı faz ekstraksiyonunda ölçek büyütme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. İlerleyen bölümlerde yapılan çalışmalar sonuçlarıyla beraber sunulmaktadır.

3.0 MATERYAL VE YÖNTEMLER

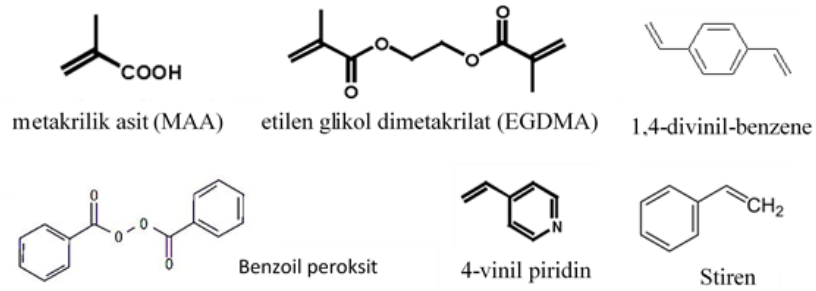
3.1 Materyaller

Projede kullanılan kimyasal malzemeler Çizelge 3.1’de verilmiştir. Şekil 3.1’de ise bu kimyasallardan polimerizasyon tepkimesinde yer alanların yapıları görülmektedir.

Çizelge 3.1 Projede kullanılan kimyasal malzemeler.

Adı	Markası/ Özellikleri
Metakrilik asit	Alfa Aesar - MAA - %99
Etilen glikol dimetakrilat	Alfa Aesar - EGDMA - %98
Benzoil peroksit	Aldrich – Luperox A75
4-vinilpiridin	Alfa Aesar - %96
Stiren	Alfa Aesar - %99.5
Divinilbenzen	Aldrich - %85
Sikloastragenol	Bionorm - %99
<i>Astragalus</i> ekstresi	Bionorm
D101	Anhui Sanxing Resin Technology
Aseton	Merck HPLC grade
Kloroform	Merck – HPLC grade
Metanol	Merck HPLC grade
Asetonitril	Merck HPLC grade
Su	Ultra saf
Asetik asit	Sigma

Sikloastragenol ve *Astragalus* ekstraktları, Bionorm Ltd. Şti. tarafından projede kullanılmak üzere hibe edilmiştir.



Şekil 3.1 Polimerizasyonda kullanılan kimyasallar.

Çizelge 3.2, çalışma süresince kullanılan diğer malzemeleri içermektedir.

Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan diğer malzemeler.

Adı	Özellikleri
Vidalı kapaklı cam tüp	8 mL
Vidalı kapaklı cam şişe	50 mL
Paslanmaz çelik filtre	45 mikron gözenek çapı
Cam havan	10 cm çap
Silika jel plaka	Merck, Kiesel gel 60 F ₂₅₄ , 0.2 mm
Eppendorf tüpler	1.5 mL
Falcon tüpleri	15, 50 mL
Şırınga filtre	0.2 µm teflon, 17 mm, Chromacol
HPLC kolonu	100*2.1 mm 5 µ Hypersil ODS Thermo
Katı faz ekstraksiyonu kolonları	Cam ve plastik
Nuche Erlenii	500, 1000 mL
Şırınga	Plastik, 5, 10 mL
Azot gazı	
Parafilm	

3.1.1 Makine ve Teçhizatlar

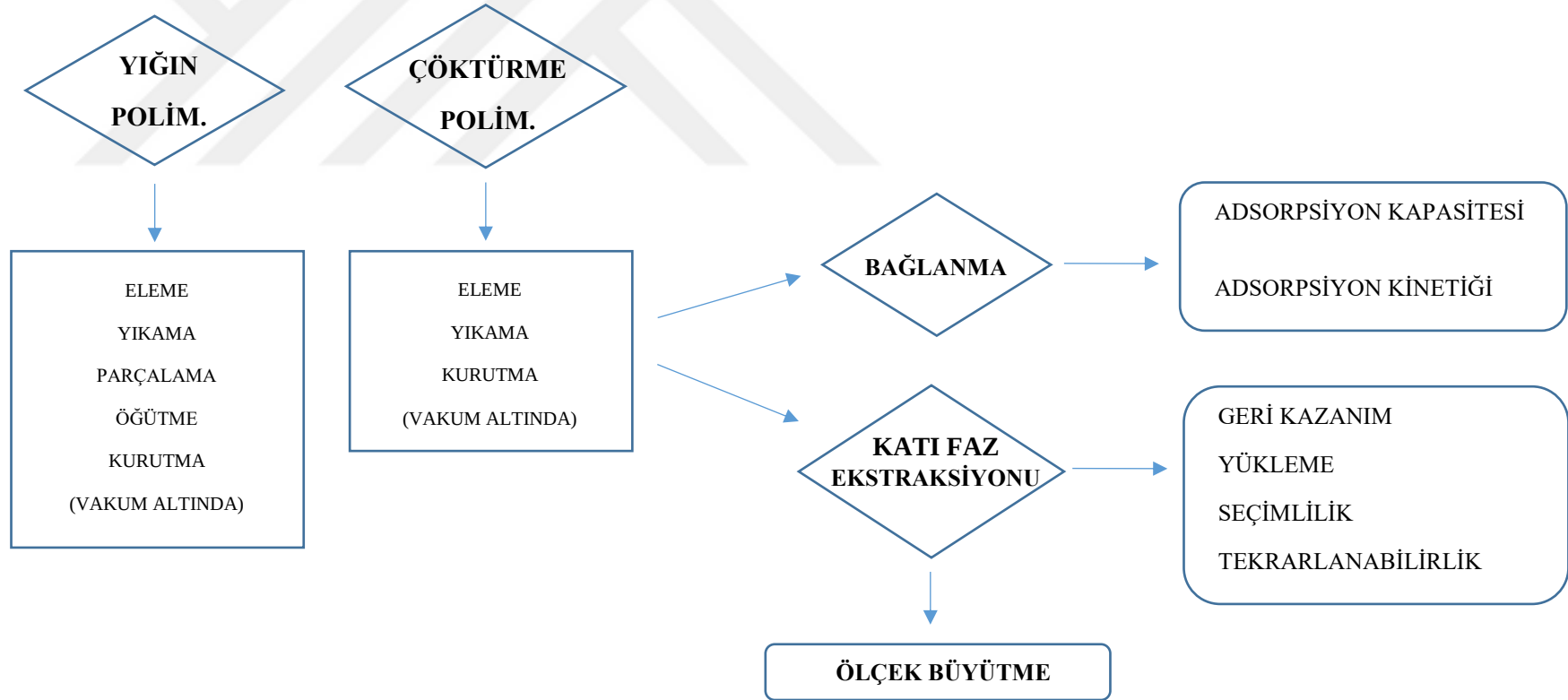
Çizelge 3.3'te proje süresince kullanılan cihazlar yer almaktadır.

Çizelge 3.3 Kullanılan cihazlar.

Adı/Modeli	Projede Kullanım Amacı
Hassas terazi; Precisa	Toz kimyasalların tartılmasında kullanılmıştır.
Çalkalamalı Su Banyosu; Wisebath	Polimerizasyon sırasında kullanılmıştır.
Ultrasonik banyo	Molekülleri çözmek, yıkamaları gerçekleştirmek amacıyla kullanılmıştır.
Santrifüj; Hettich Rotina 420K	Yıkama sonrası polimerleri çöktürmek için kullanılmıştır.
Etüv; Nüve FN500	Cam malzemelerin kurutulması için kullanılmıştır.
Evaporatör; Heidolph Instruments Laborota 4001-efficient	Hazırlanan örneklerin uçurulmasında kullanılmıştır.
UPLC; Thermo Scientific	Örneklerin analizinde kullanılmıştır.
SpeedVac; Thermo Scientific	Örneklerin çözümlerinin uzaklaştırılmasında kullanılmıştır.
Açılı karıştırıcı	Bağlanma denemelerinde kullanılmıştır.
Vakum manifoldu	Katı faz ekstraksiyonu denemelerinde kullanılmıştır.
Vakum pompası	Katı faz ekstraksiyonu denemelerinde kullanılmıştır.

3.2 Yöntemler

Çizelge 3.4'te projede izlenilen çalışma prosedürü özetlenmiştir.



Çizelge 3.4 Projenin akış şeması.

3.2.1 Polimerizasyon

Çizelge 3.5'te de görülebileceği gibi çalışmada belirlenen 2 farklı polimerizasyon türü (yığın ve çöktürme), 4 farklı monomer mol oranı, 3 farklı çapraz bağlayıcı mol oranı ve 3 farklı porojen miktarı (çöktürme polimerizasyonu için 10, 20, 30 mL) bulunmaktadır. Çizelge 3.6'da ise metakrilik asit polimerlerinin 1:4:20, vinil piridin polimerlerinin 1:4:20 ve stiren polimerlerinin 1:5:30 (kalıp molekül:monomer:çapraz bağlayıcı) oranındaki polimerizasyon protokollerine ait tepkime bileşenlerinin miktarları verilmiştir. Projede çalışılan diğer oranlara ait miktarlar Çizelge 3.6'dan faydalanılarak belirlenebilmektedir. Sentezlenen metakrilik asit polimerleri için 1:4:20, 1:4:30, 1:4:40, 1:3:20, 1:6:20 ve 1:8:20 (kalıp molekül/monomer/çapraz bağlayıcı) polimerizasyon oranları (mol olarak) uygulanmıştır (Lopez et al., 2011). Sıcaklık da polimerizasyona etki eden önemli bir parametredir. Uygun polimerizasyon sıcaklığının tespiti için 60 ve 70°C sıcaklıklarda polimerler sentezlenmiştir. Her bir parametrenin polimerlerin yapısı üzerindeki etkisi SEM görüntüleri ve geri kazanım çalışmalarıyla ortaya konulmuştur.

Çizelge 3.5 Polimerlerin sentez oranlarını (mol olarak) içeren protokoller.

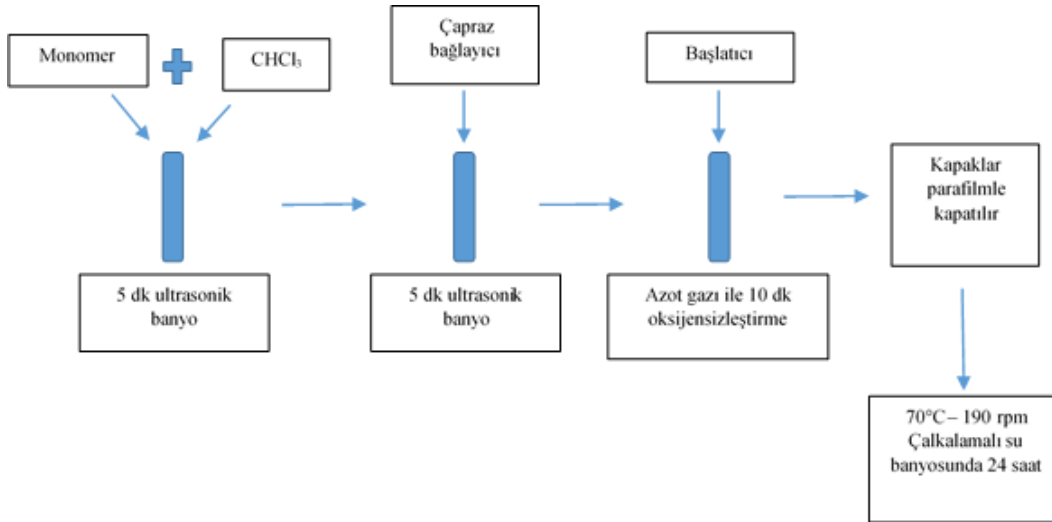
		Yığın Pol.		Çöktürme Polimerizasyonu											
		Y4	Y8	D4-10	D4-20	D4	D4-30-10	D4-30-20	D4-30-30	D4-40	D3	D6	D8	VP	Sty
Kalıp Molekül	CG	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Monomer	MAA	4	8	4	4	4	4	4	4	4	3	6	8	-	-
	Stiren	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
	4-VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-
Çapraz Bağlayıcı	EGDMA	20	20	20	20	20	30	30	30	40	20	20	20	20	-
	DVB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30
Porojen	CHCl ₃ (mL)	2.25	2.25	10	20	30	10	20	30	30	30	30	30	30	30

Çizelge 3.6 Polimerizasyon tepkimelerinin bileşenleri.

	Yığın Polimerizasyonu MAA - 1:4:20		Çöktürme Polimerizasyonu MAA - 1:4:20		Çöktürme Polimerizasyonu VP- 1:4:20		Çöktürme Polimerizasyonu Sty – 1:5:20	
	mmol		mmol		mmol		mmol	
CG	0.4	98 mg	0.4	196 mg	0.4	196 mg	0.2	105 mg
MAA	1.6	67.5 µl	1.6	135 µl	-	-	-	-
Stiren	-	-	-	-	-	-	1.075	123 µl
4-VP	-	-	-	-	1.6	168.4 mg	-	-
EGDMA	8	745 µl	8	1509 µl	8	1509 µl	-	-
DVB	-	-	-	-	-	-	6.45	970 µl
BPO	0.17	21 mg	0.34	42 mg	0.34	42 mg	0.34	42 mg
CHCl ₃ (mL)	-	2.25	-	10-20- 30	30	-	30	-

3.2.1.1 Yığın polimerizasyonu ile moleküler baskılanmamış polimer (NIP) sentezi

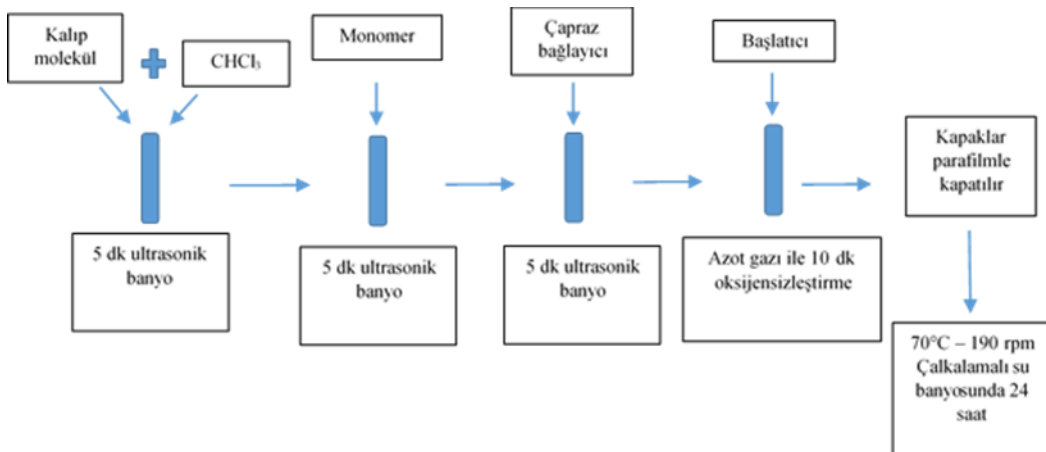
Yığın polimerizasyonu, 8 mL’lik vidalı kapaklı cam tüplerde gerçekleştirilmiştir. Çizelge 3.6’da 1:4:20 (kalıp molekül:monomer:çapraz bağlayıcı) protokolü için tepkimeye giren bileşenlerin miktarları verilmiştir. 1:8:20 protokolü için gerekli bileşen miktarları Çizelge 3.6’dan faydalanılarak oranlanabilmektedir. Baskılanmamış polimer sentezinde Şekil 3.2’de görüleceği gibi tepkimeye CG eklemesi yapılmamaktadır. Bütün çalışmalar iki tekrarlı gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.2 Yığın polimerizasyonu ile NIP sentezi.

3.2.1.2 Yığın polimerizasyonu ile moleküler baskılanmış polimer (MIP) sentezi

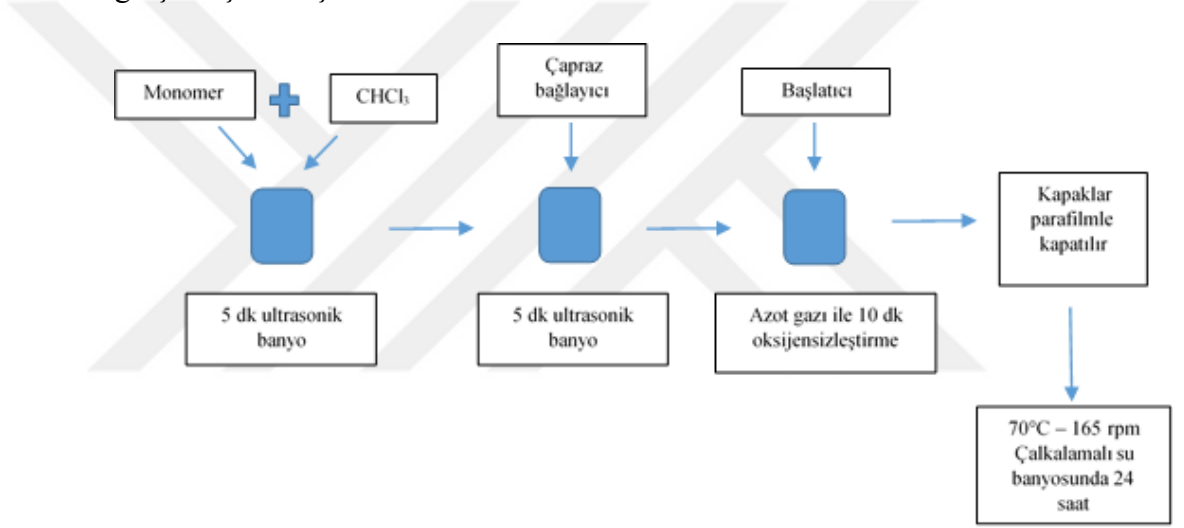
Yığın polimerizasyonu, 8 mL’lik vidalı kapaklı cam tüplerde gerçekleştirilmiştir. Çizelge 3.6’da 1:4:20 (kalıp molekül:monomer:çapraz bağlayıcı) protokolü için tepkimeye giren bileşenlerin miktarları verilmiştir. 1:8:20 protokolü için gerekli bileşen miktarları Çizelge 3.6’dan faydalanılarak oranlanabilmektedir. Baskılanmış polimer sentezinde Şekil 3.3’te de görüleceği gibi tepkimeye başlangıçta CG eklemesi yapılmaktadır. Bütün çalışmalar iki tekrarlı gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.3 Yığın polimerizasyonu ile MIP sentezi.

3.2.1.3 Çöktürme Polimerizasyonu ile Moleküler Baskılanmamış Polimer (NIP) Sentezi

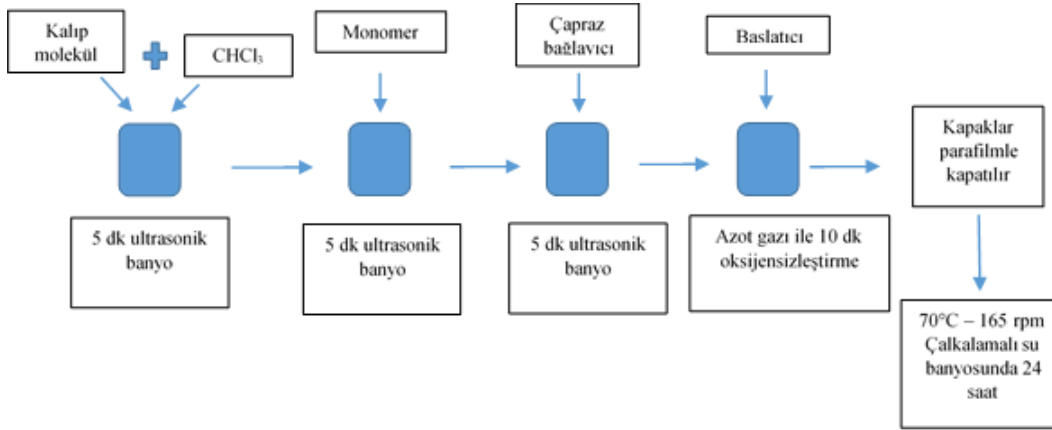
Çöktürme polimerizasyonu, 50 mL'lik cam şişelerde gerçekleştirilmiştir. Baskılanmamış polimer sentezinde Şekil 3.4'te görüleceği gibi tepkimeye CG eklemesi yapılmamaktadır. Çizelge 3.6'da 1:4:20 (kalıp molekül:monomer:çapraz bağlayıcı) protokolü için tepkimeye giren bileşenlerin miktarları verilmiştir. Diğer kalıp molekül:monomer:çapraz bağlayıcı protokolleri için gerekli bileşen miktarları Çizelge 3.6'dan faydalanılarak oranlanabilmektedir. D4Y olarak kodlanan 1:4:20 protokolünde ise çapraz bağlayıcı ile başlatıcının polimerizasyon tepkimesine eklenme basamakları yer değiştirmiştir. Bütün çalışmalar iki tekrarlı gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.4 Çöktürme polimerizasyonu ile NIP sentezi.

3.2.1.4 Çöktürme Polimerizasyonu ile Moleküler Baskılanmış Polimer (MIP) Sentezi

Çöktürme polimerizasyonu, 50 mL'lik cam şişelerde gerçekleştirilmiştir. Baskılanmış polimer sentezinde Şekil 3.5'te görüleceği gibi tepkimeye CG eklemesi yapılmaktadır. Çizelge 3.6'da 1:4:20 (kalıp molekül:monomer:çapraz bağlayıcı) protokolü için tepkimeye giren bileşenlerin miktarları verilmiştir. Diğer kalıp molekül:monomer:çapraz bağlayıcı protokolleri için gerekli bileşen miktarları Çizelge 3.6'dan faydalanılarak oranlanabilmektedir. D4Y olarak kodlanan 1:4:20 protokolünde ise çapraz bağlayıcı ile başlatıcının polimerizasyon tepkimesine eklenme basamakları yer değiştirmiştir. Bütün çalışmalar iki tekrarlı gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.5 Çöktürme polimerizasyonu ile MIP sentezi.

3.2.2 Alt Akım İşlemleri

Alt akım işlemleri boyut küçültme, ayırma, yıkama ve kurutma basamaklarından oluşmaktadır. Çizelge 3.4'teki akış şeması incelendiğinde polimerizasyon yöntemine göre alt akım işlemlerinin değişiklik gösterdiği görülmektedir. Sentezlenen polimerlerin hepsinin aynı muameleyi görebilmesi için eş üretimler birleştirilmeden, her bir üretim kendi başına olacak şekilde, alt akım işlemlerine tabii tutulmuştur. Bütün işlemler hem NIP hem de MIP'ler üzerinde uygulanmıştır.

3.2.2.1 Boyut Küçültme

Yığın polimerizasyonu ile elde edilen polimer cam havanda dövülerek küçük partiküller haline getirilmiştir. Çöktürme polimerizasyonu ile sentezlenen polimerler için bu basamağa gerek görülmemiştir.

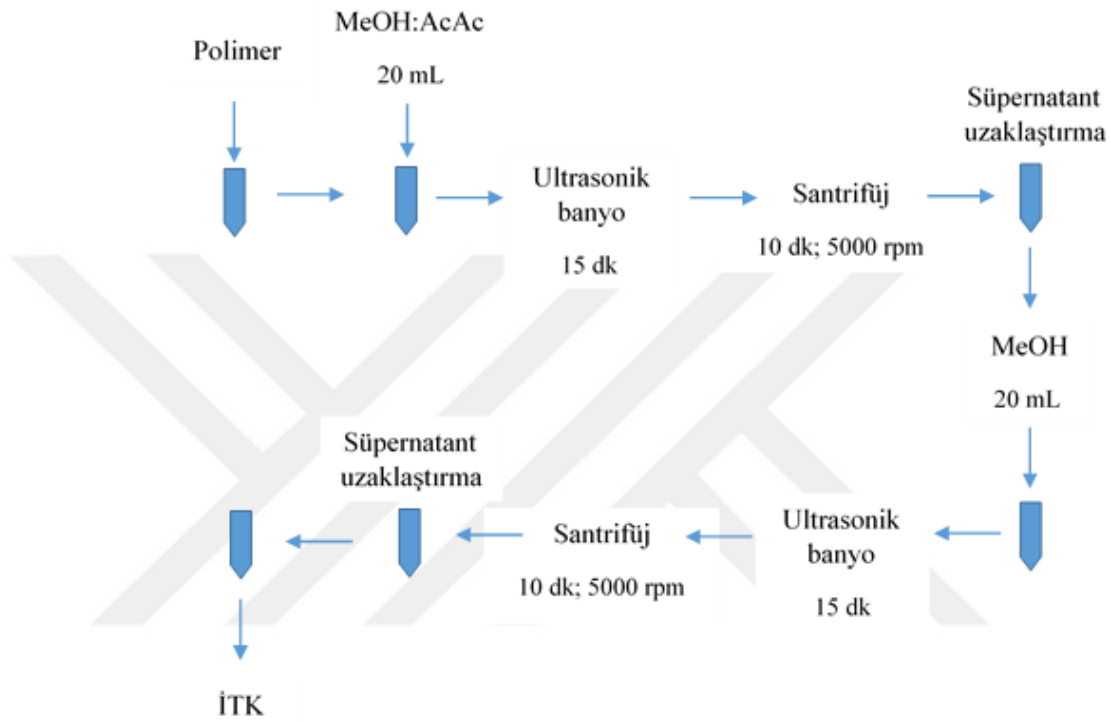
3.2.2.2 Ayırma

Hem yığın polimerizasyonu ile hem de çöktürme polimerizasyonu ile sentezlenen polimerler 50 mL aseton ile yıkanarak 45 mikronluk paslanmaz çelik elekten geçirilmiştir. Bu sayede katı faz ekstraksiyonunda kullanılamayacak kadar küçük partikül boyutuna sahip olan polimerler uzaklaştırılmıştır.

3.2.2.3 Yıkama

Elekten geçirilerek partikül boyutu sınırlanan her bir üretim 50 mL'lik santrifüj tüplerine alınarak sırasıyla; meoh:Asetik asit (80:20) ve meoh ile yıkanmıştır. Polimerlerin tam anlamıyla kalıp molekülden temizlenebilmesi için bir yıkama prosedürü geliştirilmiştir. Önce 15 dk ultrasonik banyo daha sonra da 10 dk

5000 rpm’de santrifüj yapılarak kalıp molekül süpernatanta geçirilerek polimerlerden uzaklaştırılmıştır (Şekil 3.6). Toplamda 50 dk’lık her setin sonunda santrifüj tüpünde kalan polimere 2 mL metanol eklenerek Bölüm 3.2.5.1’de açıklanan ince tabaka kromatografisi (İTK) yöntemi ile polimerlerde kalıp molekül kalıntısı olup olmadığı test edilmiştir. Yıkama işlemleri polimer içerisinde kalıp molekül kalmayınca kadar sürdürülmüştür.



Şekil 3.6 Polimerlerin yıkama prosedürü.

3.2.2.4 Kurutma-Saklama

Yıkama işleminden sonra polimerler önce vakumlu santrifügal konsantratör, SpeedVac’te, vakum altında kurutulmuştur. Kullanıma hazır hale gelen polimerler oda sıcaklığında kapaklı cam şişelerde saklanmıştır.

3.2.3 Polimerlerin Karakterizasyonu

Literatür özetinde de ifade edildiği gibi sentezlenen polimerlerin 3 farklı karakterizasyonu mümkündür: kimyasal karakterizasyon, morfolojik karakterizasyon ve moleküler tanıma.

3.2.3.1 Kimyasal Karakterizasyon

3.2.3.1.1 FTIR Analizleri

Sentezlenen her NIP ve MIP için yıkama öncesi ve sonrası FTIR analizi yaptırılmıştır. Analizler ODTÜ Merkez Laboratuvarı'nda Bruker Hyperion 1000 cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.1.2 Elementel Analizler

Polimerlerin yapısındaki karbon ve hidrojen atomlarının tayini için elementel analiz yaptırılmıştır. Analiz ODTÜ Merkez Laboratuvarı'nda LECO, CHNS-932 cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.1.3 XPS – X-Işını Fotoelektron Spektroskopi Analizleri

Polimerlerin yüzeyindeki karbon ve oksijen atomlarının tayini için XPS analizi yaptırılmıştır. Analiz ODTÜ Merkez Laboratuvarı'nda PHI-5000 VersaProbe cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.2 Morfolojik Karakterizasyon

3.2.3.2.1 Adsorpsiyon İzotermi ve Adsorpsiyon Kinetiği

Çalışmada, 150 mg polimer, 2'şer mL kloroform ile hazırlanan 10 farklı konsantrasyonda (0.1-0.2-0.3-0.4-0.5-0.6-0.7-0.8-0.9-1 mg/mL) kalıp molekül çözeltisi ile 3 saat boyunca 50 rpm'de açılı karıştırıcıda muamele edilmiştir. Süre sonunda kloroform fazı bir şırınga yardımıyla ortamdan çekilerek vakumlu santrifüjal konsantratörde kurutulmuş, sonrasında ise 1 mL metanol ile çözülerek HPLC'de analiz edilmiştir.

Çalışmada Langmuir, Freundlich ve Scatchard izotermine uyum araştırılmıştır. Bölüm 2.3'te bu eğrilere ait denklemler verilmiştir. Bu denklemler kullanılarak Freundlich için $\log q_e$ 'ye karşı $\log C_e$ grafiği, Langmuir için C_e/q_e 'ye karşı C_e grafiği, Scatchard eğrisi için ise Sb/F 'ye karşı Sb grafiği çizilerek denklemlerdeki sabitler hesaplanmıştır.

Adsorpsiyon kinetiği çalışması için ise 500 mg polimer ve 20 mL 5mg CG/50mL ile açılı karıştırıcıda 3 saat boyunca 50 rpm'de bağlanma denemesi sürdürülürken 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 90, 120, 150 ve 180. dakikalarda örnek

alınarak zamana karşı adsorpsiyon profili elde edilmiştir. Bütün çalışmalar paralel olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.2.2 Şişme Denemeleri

Polimerlerin şişme denemeleri, metanol, su:asetonitril ve sitrat-fosfat tampon çözeltilerinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar, 5 mL'lik viallere konulan 100 mg polimerin üzerine 2 mL çözgen ilavesi ile yapılmıştır. Polimerin kuru ve yaş haldeki yükseklikleri ölçülerek aşağıdaki formül aracılığıyla şişme yüzdeleri hesaplanmıştır.

$$\%Şişme = \frac{L_{yaş} - L_{kuru}}{L_{kuru}} * 100$$

(L: Kolon yüksekliği)

Şişme denemelerinde önce polimerlerin metanol içindeki yüzde şişmeleri sonraki aşamada ise %70 su:asetonitril çözeltisindeki yüzde şişmeleri araştırılmıştır. Ölçek büyütme için seçilen polimer için ise tampon çözeltisinde (pH 3-9) ve %70 su:asetonitril çözeltisinde (pH 3-9) farklı pH'larda da şişme denemeleri yürütülmüştür.

3.2.3.2.3 BET Analizi ve Gözenek Boyutu Dağılımı Ölçümü

Ölçek büyütme için seçilen polimerin morfolojik karakterizasyonu için çok noktalı BET ve gözenek boyutu dağılımı analizleri yaptırılmıştır. Analiz ODTÜ Merkez Laboratuvarı'nda Quantachrome Corporation, Autosorb-6B cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Analizde mikro ve mezo gözenek boyutu dağılımı da ölçülmüştür.

$$\frac{1}{v[(p_0/p) - 1]} = \frac{c - 1}{v_m c} \left(\frac{p}{p_0} \right) + \frac{1}{v_m c}$$

denklemini BET izotermi ifade etmektedir. P/P_0 'a karşı $1/v[(p_0/p) - 1]$ grafiği çizilerek BET grafiği elde edilmektedir (Brunauer, S. et al, 1938). Doğrusallık yalnızca $0.05 < P/P_0 < 0.35$ arasında elde edilebilmektedir. P , P_0 denge ve doygunluk basıncı ifade ederken, v adsorplanan gaz miktarını, v_m ise tekli tabaka adsorpsiyonunu göstermektedir. Aşağıdaki denklemler kullanılarak BET izotermi ile yüzey alanı hesabı yapmak mümkündür (Brunauer et al, 1938).

$$v_m = \frac{1}{A + I} \quad c = 1 + \frac{A}{I} \quad S_{\text{total}} = \frac{(v_m N s)}{V}$$

$$S_{\text{BET}} = \frac{S_{\text{total}}}{a}$$

(A: eğim, I: kesim noktası, N: Avagadro sayısı, s: kesit alan, a: adsorbanın kütlesi)
Son olarak da elde edilen veriler ile t-grafigi çizilerek BET analizi sonuçları ortaya konmuştur (Scherdel et al, 2010).

$$t = \left[\frac{13.99}{\log(p / p_0) + 0.034} \right]^{\frac{1}{2}} \text{ \AA}$$

3.2.3.2.4 SEM Analizi

SEM, taramalı elektron mikroskobu, ile görüntüleme gerçekleştirilmiştir. Analizler İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Malzeme Araştırma Merkezi'nde Philips XL 30S FEG cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.2.5 Parçacık Boyutu Analizi

Polimerlere parçacık boyutu analizi yaptırılmıştır. Analiz ODTÜ Merkez Laboratuvarı'nda Malvern Mastersizer 2000 cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.3 Moleküler Tanıma

Moleküler tanıma ise polimerin hedeflenen alandaki başarısını ortaya koyan karakterizasyondur (Cormack and Eloraza, 2004). Moleküler tanıma testleri, polimerlerin kalıp moleküle özgüllüğünü sınamak adına yapılmaktadır. Bunun için bu çalışma kapsamında iki uygulama gerçekleştirilmektedir: bağlanma denemeleri ve katı faz ekstraksiyonu.

Bütün denemelerde, baskılanmış ve baskılanmamış polimerler arası karşılaştırmalar yüzde geri kazanım miktarları ve baskı faktörleri (IP) hesaplanarak yapılmıştır. Baskı faktörü baskılanmış polimere ve baskılanmamış polimere adsorbe olan kalıp molekül oranıdır. Bu oran hesaplanarak sentezlenen MIP'in kalıp moleküle olan özgüllüğü ortaya konmuştur.

$$IP = \frac{MIP - NIP}{NIP}$$

Yüzde geri kazanım miktarları ise katı faz ekstraksiyonu denemelerinde, yıkama ve elüsyon fraksiyonlarındaki kalıp molekül konsantrasyonunun başlangıçta kolona yüklenen kalıp molekül konsantrasyonuna oranını ifade etmektedir. Bu hesaplama kolondaki geri kazanım başarısı ortaya konmuştur.

3.2.3.3.1 Bağlanma Denemeleri

Bağlanma denemelerinde amaç, belli konsantrasyonda hazırlanan kalıp molekülün hem NIP hem de MIP üzerindeki adsorpsiyon farkının değerlendirilmesi ve polimer miktarının adsorpsiyona olan etkisinin ölçülmesidir.

Yığın polimerizasyonu ile elde edilen polimerler için stoktan (5mg CG/10mL) seyreltilerek 0.1 mg/mL CG hazırlanmıştır (CHCl₃ içerisinde). 1 mL CG ve 25, 50, 100, 150 mg polimer ile adsorpsiyon denemesi, açılı karıştırıcıda 50 rpm’de 3 saat boyunca oda sıcaklığında sürdürülmüştür. 3 saat sonunda kloroform fazı 0.2 µm filtreden geçirilmiştir. Kloroform buharlaştırıldıktan sonra kalan kısım 0.5 mL metanolde çözülerek HPLC’ye verilmiştir.

Çöktürme polimerizasyonu ile elde edilen polimerler ise kloroform içerisinde daha fazla şişme göstermektedir. Bu sebepten dolayı da çöktürme polimerizasyonu ile elde edilen polimerler ile 0.1 mg/mL CG konsantrasyonunda 3 mL çözelti alınarak 25, 50, 100, 150 mg polimer ile adsorpsiyon denemesi yapılmıştır. 50 rpm’de açılı karıştırıcıda yürütülen 3 saatlik işlem sonunda kloroform fazından 1 mL örnek çekilerek 0.2 µm filtreden geçirilmiştir. Kloroform buharlaştırıldıktan sonra kalan kısım 0.5 mL metanolde çözülerek HPLC’ye verilmiştir.

HPLC sonuçları kullanılarak 3 saat sonunda polimere bağlanan kalıp molekül miktarının başlangıçta polimere yüklenen kalıp molekül miktarına olan oranı hesaplanarak kullanılan polimer miktarına karşı bir grafik elde edilmiştir. Grafiklerin yanı sıra denemelerdeki baskı faktörleri de hesaplanarak polimerlerin bağlanma kapasiteleri karşılaştırılmıştır.

3.2.3.3.2 Katı Faz Ekstraksiyonu

Katı faz ekstraksiyonunda amaç, hazırlanan dolgu maddesinin kolonda performans değerlendirmesidir. Kolon yüksekliği, dolgu maddesi miktarı ve yıkama ve elüsyon çözümlerinin miktarları göz önünde bulundurularak sentezlenen polimerlerin moleküler tanıma özellikleri karşılaştırılmış ve moleküler tanıma performanslarını arttırmaya yönelik iyileştirme çalışmaları yürütülmüştür.

Katı faz ekstraksiyonu Bölüm 2’de belirtildiği gibi 4 aşamadan oluşmaktadır. Katı faz ekstraksiyonunda kolon önce bir kolon hacmi metanol sonra da 2 kolon hacmi kloroform ile şartlanır. Kolona belirlenen konsantrasyonda yükleme yapıldıktan sonra yıkama ve elüsyon gerçekleştirilir. Yıkama ve elüsyon basamaklarında kullanılan çözümler iyileştirme çalışmaları doğrultusunda belirlenmiştir. Toplanan örnekler vakum altında Speed Vac’te kurutulduktan sonra metanolde çözülerek HPLC’de analiz edilmiştir.

Çalışma boyunca kolon çapı olarak, 0.6 cm, 1 cm, 1.4, 1.6 cm, 1.8 cm, 2.7 cm, 4 cm ve 12 cm; dolgu maddesi miktarı olarak, 60 mg, 120 mg, 150 mg, 300 mg, 500 mg, 1 g, 2.5 g, 10 g ve 100 g polimer değerlendirilmiştir. Saf kalıp molekül ile yapılan çalışmalarda, yıkama çözümleri olarak kloroform, elüsyon çözümleri olarak metanol seçilmiştir.

Katı faz ekstraksiyonu ile yapılan bir diğer çalışma breakthrough eğrisinin belirlenmesidir. Hacime veya zamana bağlı konsantrasyondaki değişimi gösteren breakthrough eğrisini çizebilmek için kolona belirlenen konsantrasyonda kalıp molekül yüklendikten sonra 2’şer mL’lik hacimler halinde önce 10 mL kloroform ile yıkama sonra 10 mL metanol ile elüsyon gerçekleştirilmiştir. Breakthrough eğrisi ile baskılanmamış ve baskılanmış polimerler arasındaki farkın ortaya konulması hedeflenmektedir. Beraberinde geri kazanım ve baskı faktörleri de hesaplanmıştır.

Seçimlilik çalışmalarında ise *Astragalus* ekstresi ve *Astragalus* hidroliz ekstresi kullanılmıştır. Seçimlilik çalışmalarında kloroform:metanol sistemleri, asetonitril:su sistemleri ve metanol:su sistemleri gibi farklı yıkama ve elüsyon çözümleri ile denemeler yapılmıştır. *Astragalus* hidroliz ekstresinin HPLC profili Şekil B.43’te verilmiştir.

Son olarak, sentezlenen polimerler arasında CG'ye en yüksek seçicilik gösterdiği çalışmalarla belirlenen polimer ile organik moleküllerin ayırma saflaştırılmasında kullanılan ticari polimer, D101, ile karşılaştırma yapılmıştır (Zhang et al., 2012). D101 polistiren yapıda; granül çapı 0.3-1.25 mm aralığında, ortalama por çapı 9 – 10 nm aralığında ve yüzey alanı yaklaşık 500-550 m²/g olan bir polimerdir. Çalışmaların sonuçları, Bulgular bölümünde yer almaktadır.

3.2.4 Ölçek Büyütme

Projenin temel amacı sentezlenen polimerlerin katı faz ekstraksiyonunda kullanımıdır. Çalışmada baskılanmış polimerlerin bu amaçla kullanımı için ölçek büyütme çalışmaları yapılarak yöntem optimizasyonuna gidilmiştir. Bölüm 2.1'de dolgu kolonlarda ölçek büyütme hakkında bilgi verilmiştir. Bu çalışmada sentezlenen polimerler organik çözümler ile temas anında şişerek jelleşmektedir. Katı faz ekstraksiyonu vakum altında çalışılan bir yöntemdir. Polimerlerin jelleşmesi vakumla sağlanan hacimsel debinin sabit tutulmasını engellemektedir. Bunun yerine bu çalışmada kolondaki basınç düşmesi ve lineer akış hızı sabit tutularak kolon yüksekliği ve çapı belirlenmiştir. Ölçek büyütme çalışmaları 1.8 cm çap ve 1.8 cm yükseklik'teki kolonlarda 1 g polimer ile yapılan çalışmalar baz alınarak gerçekleştirilmiştir.

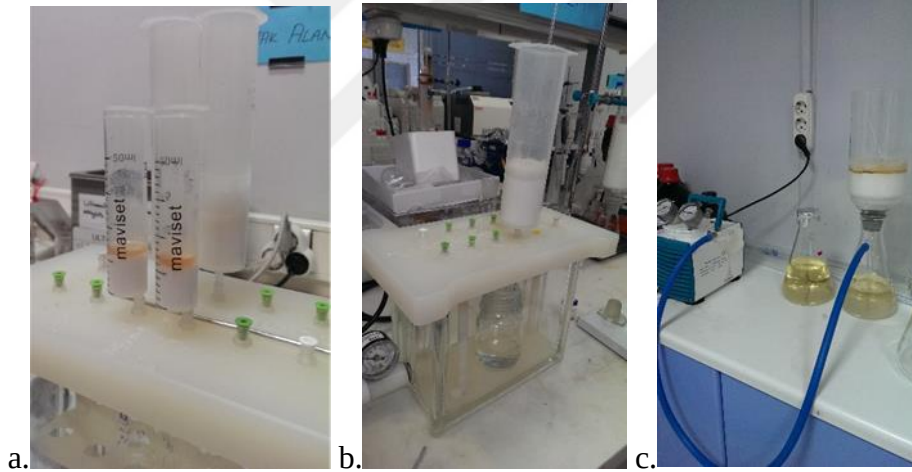
$$\Delta P = 150 * \mu * \frac{(1 - \varepsilon)^2 * L}{\varepsilon^3 * d_p^2} * v_s + 1.75 * \frac{(1 - \varepsilon) * L * \rho}{d_p * \varepsilon^3} * v_s^2$$

Yukarıda verilen Ergun denkliğindeki vizkozite ve yoğunluk parametreleri büyük ölçek kolonlar %70 su ile şartlandığı için suyun değerleri olarak kabul edilmiştir ($\mu = 0.001 \mu Pa s$; $\rho = 1 g/m^3$). Gözenek hacmi ve partikül çapı için gerekli yüzey alanı bilgisi BET çalışmalarından BJH metoduna göre elde edilen sonuçlardan temin edilmiştir ($d_p = \left(\frac{6 * S}{\pi}\right)^{1/2}$) (Pabst and Gregorova, 2007). Excel programında durum çözümlemesi fonksiyonu kullanılarak lineer akış hızı ve basınç düşmesi sabitlenen kolonlarda ölçek büyütmesi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen yükseklik ölçüleri şişkin haldeki polimerler için uygun sonuçlardır. Hesaplanan kolon çaplarında kolonlar temin edildikten sonra hesaplanan yüksekliklere denk gelen polimer miktarı deneme yapılarak tespit edilmiştir. Ancak yapılan denemelerde akış hızları değişiklik gösterdiğinden hesaplamalarda kullanılan lineer akış hızına ve basınç farkına ulaşamamıştır. Sonuç olarak kolon boyunca basınç farkı

0.40±0.01 olacak şekilde kolonlar tekrar yüklenmiş ve kullanılması gereken polimer miktarları tespit edilmiştir. Çizelge 3.7’de ölçek büyütme denemelerinde kullanılan kolonların özelliklerine yer verilmiştir. Şekil 3.7’de ise kullanılan kolonlara yer verilmiştir.

Çizelge 3.7 Denemelerde kullanılan kolonların özellikleri.

Polimer Miktarı (g)	Kolon Çapı (cm)	Kolon Yüksekliği – Yaş (cm)	Kolon Yüksekliği – Kuru (cm)
1	1.8	1.8	1.2
2.5	2.7	3	1.4
10	4	4.4	2
100	12	6.5	3



Şekil 3.7 Kolon çeşitleri a. Ön 1.8 cm, arka D=2.7 cm b. D=4 cm c. D=12 cm.

Ölçek büyütme çalışmalarında da diğer katı faz ekstraksiyonu çalışmalarında olduğu gibi iyileştirme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar, Bölüm 3.2.5.1’de belirtildiği gibi kolonlardan alınan fraksiyonların İTK sonuçlarıyla değerlendirilmiştir. Çalışmalarda en iyi sonuç veren denemelerin fraksiyonlarından alınan örnekler HPLC’de analiz edilmiştir. Fraksiyonlar kurutulup 1 mL metanolde çözündükten sonra HPLC’de analizleri gerçekleştirilmiştir. Ancak yükleme konsantrasyon arttığı için 10 g çalışmalarında kurutulan fraksiyonlar 4 mL, 100 g çalışmalarında ise fraksiyonlar 32 mL metanolde çözündükten sonra analiz edilmişlerdir.

3.2.5 Analiz Yöntemleri

3.2.5.1 İnce Tabaka Kromatografisi

Sentezlenen polimerlerin yıkanarak kalıp molekülden temizlenme işlemlerinde kontrol için ince tabaka kromatografisi kullanılmaktadır. Bölüm 3.2.2.3'te belirtildiği gibi santrifüj sonrasında süpernatantı alınan polimerin üzerine 2 mL metanol eklenmiştir. Örnekten Si plaka üzerine 30 tatbik uygulanarak yıkama işlemlerinin kontrolü gerçekleştirilmiştir. Yüklenen plakalar 100:17.5:13.5 (etil asetat:metanol:su) çözgen sisteminde yürütüldükten sonra %30 sülfürik asit çözeltisi püskürtülerek 105-110°C sıcaklıkta ısıtılmıştır.

İnce tabaka kromatografisi katı faz ekstraksiyonu çalışmalarında fraksiyonların içerdiği kalıp molekül miktarını görebilmek amacıyla da kullanılmıştır. Katı faz ekstraksiyonu denemelerinde alınan fraksiyonlar kurutularak 2 mL metanolde çözündükten sonra 1 tatbik ile İTK'ları gerçekleştirilmiştir. Konsantrasyon arttığı için 10 g çalışmalarında kurutulan fraksiyonlar 4 mL, 100 g çalışmalarında ise fraksiyonlar 8 mL metanolde çözündükten sonra 1 tatbik ile İTK'ları yapılmıştır.

3.2.5.2 HPLC Analizleri

Çalışmalar sonucunda alınan örneklerin analizi için Thermo Scientific UPLC kullanılmıştır. Analizler için C-18 Thermo Hypersil kolonda, 60:40 su:asetonitril çözgen sistemi ile 12 dakika süren bir yöntem geliştirilmiştir. Sonuçlar 205, 210 ve 220 nm dalga boyunda izlenmiştir. Kalibrasyon grafikleri 8 noktadan oluşturulmuştur (Şekil A.1 ve A.2). Metanol içerisinde 500 mg CG/L olarak hazırlanan stok çözeltinin 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 ve 1/128 seyreltmeleri alınarak, grafik üç tekrarlı şekilde çizdirilmiştir. Hesaplamalar, en iyi sonucu veren 205 nm'de elde edilen kromatogramlar üzerinden yapılmıştır. Çalışmalar süresince metanol içerisinde çözünen kalıp molekül analizleri çift tekrarlı olarak yürütülmüştür. Kromatogramlar Ekler bölümündedir.

3.2.6 Moleküler Baskılamada Hesapsal İnceleme

Çalışmanın bu basamağında, katı faz ekstraksiyonu işlemleri sonrasında en yüksek geri kazanım oranı elde edilen polimerlerin sentezinde kullanılan monomer ile kalıp molekül arasındaki etkileşimler incelenmiştir. Moleküler modelleme

yöntemleri ile kalıp molekül ve monomerlerin etkileşim noktalarının teorik olarak tespit edilmesi hedeflenmiştir. Olası etkileşimleri tespit etmek amacı ile Spartan programında (Spartan'08, 2006) moleküler mekanik yöntem kullanılarak 10 monomer molekülü ile seçilen kalıp molekül arasındaki konformasyonlar elde edilmiştir. Daha sonra MOPAC programı (Stewart, 2012) kullanılarak yarı-ampirik bir yöntem olan PM6-DH2 (Rezac et al., 2009; Korth et al., 2010) ile bu konformasyonların enerjileri hesaplanmıştır. Enerji seviyesi en düşük yapılar en kararlı yapıları işaret etmektedir.

Çalışmada katı faz ekstraksiyonu denemeleri sonucunda ölçek büyütme için belirlenen, en yüksek geri kazanım oranına sahip kalıp molekül:monomer oranına uygun olarak yerleştirilen fazla monomerler çıkartılıp yeniden bir yarı-ampirik çalışma yürütülmüştür. Yarı-ampirik çalışma sonucu elde edilen en kararlı yapıların yoğunluk fonksiyoneli teorisi (DFT) yöntemi ile ω B97xD fonksiyonu ve 6-31g(d,p) baz seti (Chai and Head-Gordon, 2008) birlikte kullanılarak optimizasyon ve frekans analizi gerçekleştirilmiştir. Yarı-ampirik yöntemde COSMO çözücü (solvent) modeli (Klamt and Schüüman, 1993), DFT de ise PCM çözücü modeli (Tomasi and Persico, 1994; Miertus et al., 1981; Miertus and Tomasi, 1982) kullanılarak polimerizasyonda porojen olarak seçilen kloroformun dielektrik alanı içerisinde hesaplamalar ortaya konmuştur. GaussView programı (Frisch et al., 2009) ile frekans analizi sonucunda hesapsal IR spektrumu oluşturulmuştur.

Bir sonraki başka bir çalışmada direkt olarak çalışma süresince belirlenen en iyi kalıp molekül:monomer oranı ile Spartan programında başlangıç konformasyonları elde edilmiştir. Aynı prosedür izlenerek en kararlı yapılar belirlenmiş ve bu yapıların hesapsal IR spektrumları ortaya konmuştur. Elde edilen hesapsal veriler ile deneysel veriler karşılaştırılarak etkileşim noktalarının olasılıkları tartışılmıştır.

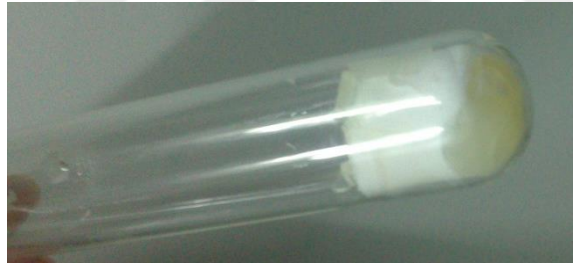
Çalışmalar süresince kullanılan materyaller ve izlenen yöntemler bu bölümde verilmiştir. Katı faz ekstraksiyonunda kullanılmak üzere sentezlenen moleküler baskılanmış polimerlerin karakterizasyonlarını sağlayan analiz sonuçları, farklı ölçeklerde polimerlerin seçimliliğini gösteren denemeler, yapılan iyileştirme çalışmalarıyla beraber Bulgular ve Tartışma bölümünde sunulmaktadır.

4.0 BULGULAR VE TARTIŞMA

Bölüm 3’te açıklanan yöntemler izlenerek yapılan çalışmaların sonuçları bu kısımda ele alınmıştır. Sentezlenen polimerlerin moleküler tanıma özelliklerini arttırmak üzere yürütülen iyileştirme ve elde edilen bulgular ışığında, seçilen polimer ile ölçek büyütme çalışmaları gerçekleştirilmiş ve tüm sonuçlar aşağıda sunulmuştur.

4.1 Polimerizasyon Sonuçları

Bölüm 3.2.1’de açıklanan polimerizasyon yöntemleri kullanılarak farklı polimerler sentezlenmiştir. İlk olarak polimerizasyon sıcaklığı değiştirilerek denemeler yapılmıştır. 60 °C sıcaklıkta sentezlenen polimerlerin renklerinde sararma meydana gelmiştir (Şekil 4.1). Bu da polimerizasyonun tam olarak gerçekleşmediğinin bir göstergesidir (Oadian, 2004). Çizelge 2.2 incelendiğinde çalışmada başlatıcı olarak seçilen BPO için 50 °C’de bir yarılanma süresi belirlenemezken, 70 °C’de yarılanma süresinin 7.3 saat olduğu görülmektedir.



Şekil 4.1 Hatalı polimerizasyon.

Kalıp molekül olarak seçilen CG’nin de yüksek sıcaklıklarda kararlı bir molekül olması sebebiyle çalışmalar 70 °C’de sürdürülmüştür. Şekil 4.2’de 70 °C’de 1:4:20 yığın polimerizasyonu protokolü ile sentezlenen polimerler verilmiştir. Şekil 4.2a polimerizasyon tepkimesi sonrasında elde edilen polimeri gösterirken 4.2b havanda dövülerek boyutu küçültülmüş ve yıkama işlemlerinden geçmiş kullanıma hazır polimerleri göstermektedir. Şekil 4.3’te ise çöktürme polimerizasyonu ile elde edilen D4-MIP’e ait bir fotoğrafı verilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda polimerizasyon reaksiyonunun 70 °C’de gerçekleştirilmesi kararlaştırılmıştır.

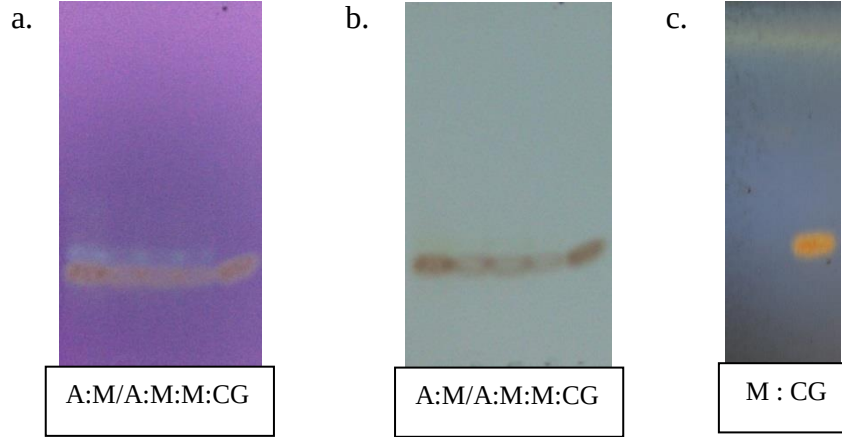


Şekil 4.2 Y4 MIP ve NIP a. Y4 MIP – polimerizasyon sonrası b. Sırasıyla, Y4 MIP ve NIP – yıkama işleminden sonra kullanıma hazır polimer.



Şekil 4.3 D4 MIP – yıkama sonrası.

Bölüm 3.2.2.3'te belirtildiği gibi polimerlerin kalıp molekülden temizlenmesi uzun işlemler gerektirmektedir. Prosedür, her set sonrasında İTK yapılarak CG'nin tamamen uzaklaştığının kontrol edilmesi gerekmektedir. Şekil 4.4'te bu İTK'lara birer örnek mevcuttur.

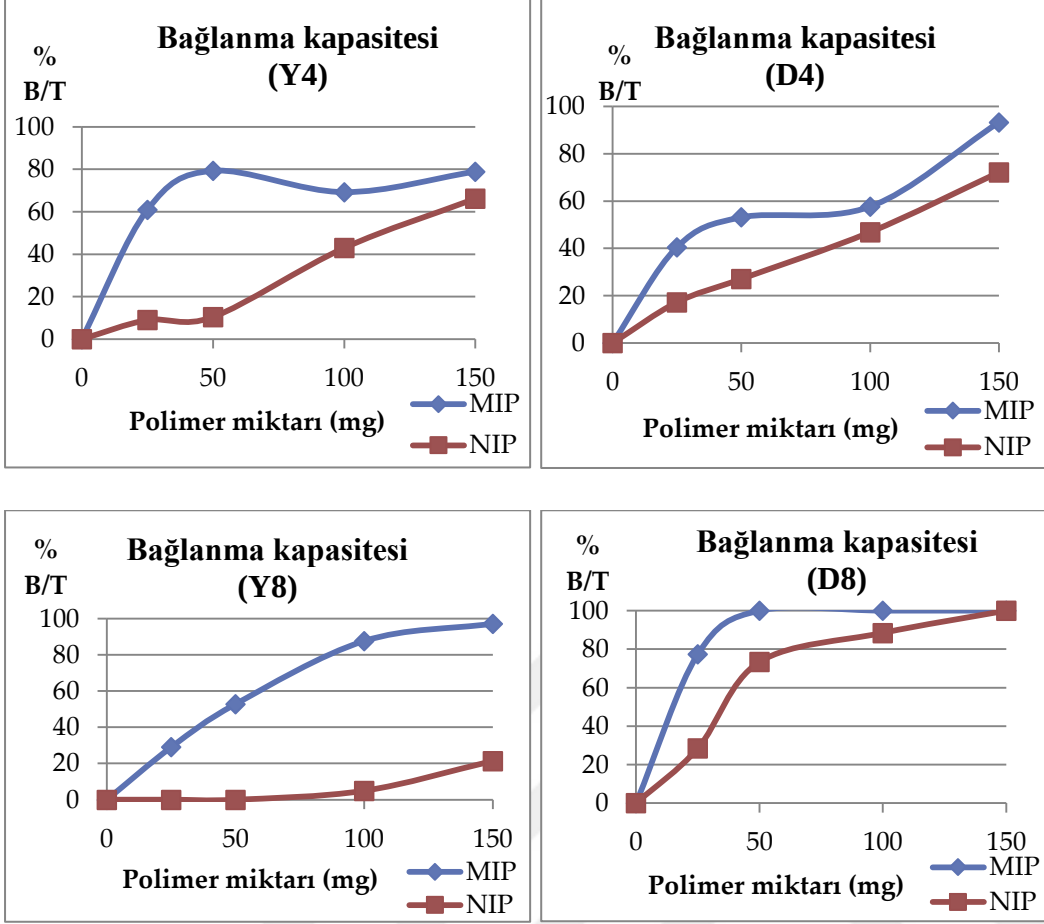


Şekil 4.4 Yıkama İTK'ları a. Yıkama sırasında - UV görüntüsü b. Yıkama sırasında c. Yıkama sonunda - UV görüntüsü (10:10:2 – hekzan:etilAsetat:metanol) – [A:aseton; M/A:metanol/Asetik asit; M:metanol; CG:sikloastragenol]

Yıkama işlemi tamamlanan polimerler moleküler tanıma (bağlanma ve katı faz ekstraksiyonu) testlerine tabii tutulmuşlardır.

4.2 Bağlanma Denemeleri

Bölüm 3.2.3.3.1'de açıklanan yöntem ile 1:4:20 ve 1:8:20 (kalıp molekül:monomer:çapraz bağlayıcı) oranında sentezlenen polimerlerin bağlanma denemeleri yapılmıştır. Buradaki amaç hem yığın polimerizasyonu ile çöktürme polimerizasyonları arasındaki farkı hem de kalıp molekül:monomer oranının polimerizasyona olan etkisini bağlanma denemeleri ile görebilmektir. Aşağıda elde edilen 8 polimerin bağlanma denemelerinin grafikleri ve hesaplanan baskı faktörlerinin tablosu yer almaktadır. Analizlerde kullanılan kalibrasyon grafiği Ekler Bölümünde Şekil A.1'de verilmiştir. Şekil 4.5'teki grafiklerde %B/T: dengede bağlanan CG'nin başlangıçta yüklenen CG'ye oranını ifade etmektedir $\left(\% \frac{B}{T} = \frac{C-C_0}{C_0} * 100\right)$; C, dengede bağlanan CG konsantrasyonu, C_0 , başlangıçta yüklenen CG konsantrasyonu.



Şekil 4.5. Y4, Y8, D4 ve D8 için bağlanma kapasitesi sonuçları - %B/T: dengede bağlanan CG/ başlangıçta yüklenen CG. [Y4 – 1:4 oranında yığın polimerizasyonu, Y8 – 1:8 oranında yığın polimerizasyonu, D4 – 1:4 oranında çöktürme polimerizasyonu, D8 – 1:8 oranında çöktürme polimerizasyonu.]

Grafikler üzerinden moleküler baskılanmış polimerler incelendiğinde, bağlanma kapasitesinin en yüksek olduğu polimer miktarı Y4 için 50 mg, Y8 için 150 mg, D4 için 150 mg ve D8 için 50 mg'dır. Bağlanmanın adsorpsiyondan mı baskılanmadan mı kaynaklandığının anlaşılması için sonuçların baskılanmamış polimerler ile beraber değerlendirilmesi gerekmektedir. Çizelge 4.1'de hesaplanan baskı faktörleri yer almaktadır.

Çizelge 4.1 Bağlanma denemeleri sonuçlarına göre hesaplanan baskı faktörleri (IP).

Polimer miktarı (mg)	IP - Y4	IP - Y8	IP - D4	IP - D8
25	5.802	28.005	1.352	1.717
50	6.617	51.783	0.960	0.363
100	0.613	16.743	0.230	0.131
150	0.192	3.542	0.293	0.000

En yüksek bağlanma konsantrasyonun elde edildiği polimer miktarları ile baskı faktörleri birlikte değerlendirildiğinde, Y4 polimeri için en iyi polimer miktarının 50 mg, Y8 polimeri için 150 mg, D4 polimeri için 150 mg ve D8 polimeri için 50 mg'dır.

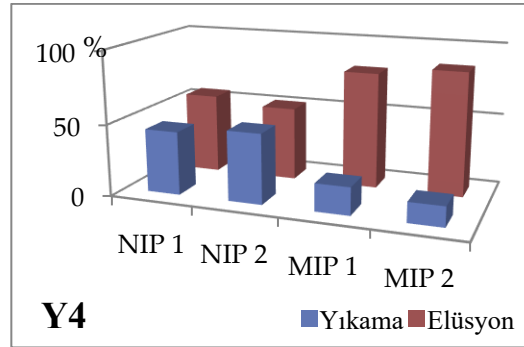
Çalışmanın temel amacı polimerlerin kolon içerisindeki performanslarının izlenmesi olduğundan çalışmalara katı faz ekstraksiyonu denemeleri ile devam edilmiştir.

4.3 Katı Faz Ekstraksiyonu – Breakthrough Eğrisi - Seçimlilik Denemeleri

Katı faz ekstraksiyonu denemeleri sürekli iyileştirme çalışmaları ile sürdürülmüştür. Elde edilen veriler, % geri kazanım ve baskı faktörleri ile değerlendirilmiştir. Hesaplamalar Bölüm 3.2.3.3'te açıklanmıştır. Aşağıda sırayla yapılan çalışmaların sonuçları kullanılan kolon çapı, dolgu maddesi miktarı ve yapılan yükleme parametreleriyle beraber verilmiştir. Katı faz ekstraksiyonu çalışmalarına, Y4, Y8, D4 ve D8 polimerlerinin hepsi için 0.1 mg CG/mL yükleme yapılması durumunda en az %70 bağlanma sağlayacak polimer miktarı olan 120 mg polimer (Şekil 4.5) kullanılarak başlanması kararlaştırılmıştır.

- **D=1.4 cm / L=1 cm / 120 mg polimer / 0.1 mg CG/mL yükleme**

Çalışmada öncelikle Y4 polimeri için iki farklı yıkama/elüsyon miktarı denenmiştir. NIP1-MIP1 kodlu çalışmada 1 KH (kolon hacmi) kloroform ile yıkama, 2 KH metanol ile elüsyon; NIP2-MIP2 kodlu çalışmada 2 KH kloroform ile yıkama, 4 KH metanol ile elüsyon gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.6'da çalışma sonucunda elde edilen geri kazanım yüzdeleri verilmiştir.

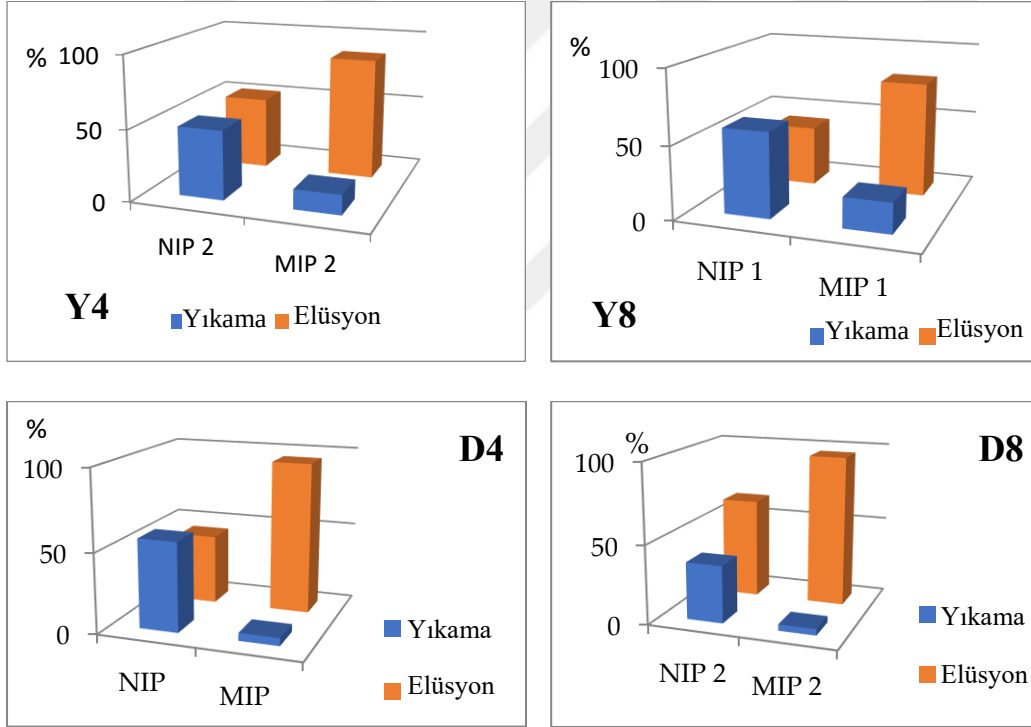


Şekil 4.6 Katı faz ekstraksiyonu – yıkama elüsyon miktarı denemesi.

Sonuçlar değerlendirildiğinde, Y4-MIP ile %86.01'lik en yüksek geri kazanımın ikinci denemede elde edildiği ortaya konmuştur. Birinci deneme için elde edilen baskı faktörü 0.446 iken ikinci denemede elde edilen baskı faktörü 0.676'dır. Dolayısıyla çalışmaların 2 KH yıkama, 4 KH elüsyon fraksiyonları ile devam ettirilmesi kararlaştırılmıştır.

- **D=1.4 cm / L=1 cm / 120 mg polimer / 0.1 mg CG/mL yükleme**

Y4, Y8, D4 ve D8 polimerleri için katı faz ekstraksiyonu çalışmaları 1.4 cm çaplı kolonda 0.1 mg CG/mL yükleme ile gerçekleştirilmiştir. 2 KH kloroform ile yıkama ve 4 KH metanol ile elüsyon gerçekleştirilerek elde edilen fraksiyonların HPLC analizleri sonucunda Şekil 4.7'de verilen geri kazanım grafikleri elde edilmiştir.



Şekil 4.7 Katı faz ekstraksiyonu sonuçları.

Teorik olarak % geri kazanım grafikleri değerlendirildiğinde, NIP için yıkamada % geri kazanım düşük olurken MIP için elüsyonda % geri kazanım yüksek olmalıdır. MIP'ler arasında en yüksek geri kazanımı %95.99 ile D8 polimeri sağlamıştır. Ancak Şekil 4.7'de sunulduğu üzere D8-NIP'in %63.58'lik bir geri kazanımı mevcuttur. Bu durumda, Çizelge 4.2'de de görüleceği gibi, D8'in baskı faktörü düşüktür. Sonuç olarak D8 polimerlerinde tutunmanın non-spesifik etkileşimlerle gerçekleştiğini yani D8-MIP'in CG'ye seçimli bir polimer olmadığı

sonucuna varılmıştır. D4-MIP ise %95.09'luk bir geri kazanıma sahip iken D4-NIP %44.0'te kalmaktadır. Karşılaştırma yapıldığında bütün polimerler arasında en yüksek D4-MIP'in CG'ye seçimli olduğu anlaşılmaktadır (Şekil 4.6 ve Çizelge 4.2).

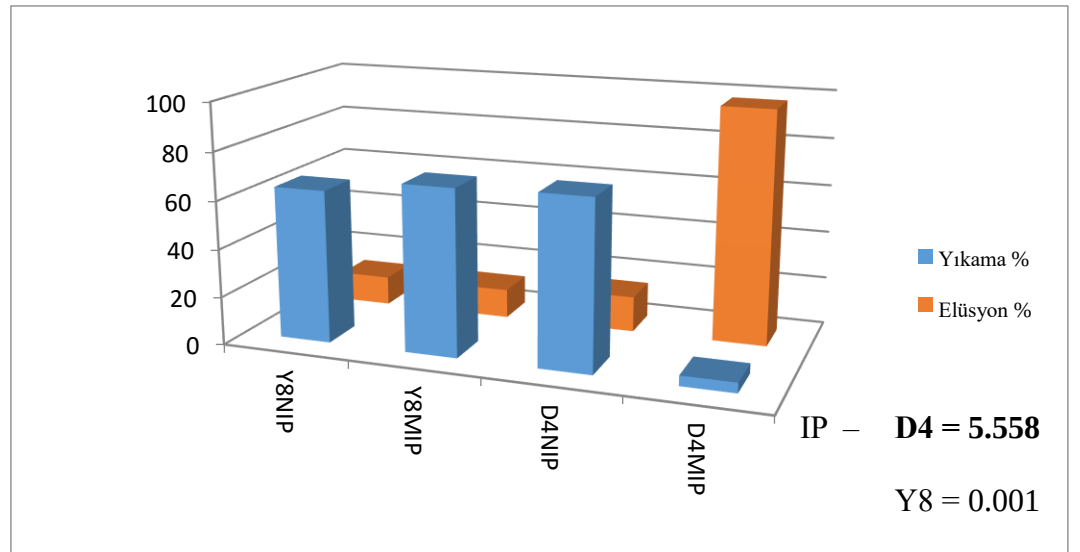
Çizelge 4.2 Katı faz ekstraksiyonunda hesaplanan baskı faktörleri.

Polimerler	IP
Y4	0.676
Y8	0.903
D4	1.161
D8	0.510

Bu çalışma ile Y4 ve D8 polimerlerinin, katı faz ekstraksiyonu için dolgu maddesi sentezlemek amaçlı olan bu teze uygun polimerler olmadıkları kararlaştırılmıştır.

- **D=1 cm / L=1 cm / 150 mg polimer / 0.5 mg CG/mL yükleme**

Bağlanma denemeleri sonuçlarına göre 0.1 mg CG/mL yükleme D4-MIP ve Y8-MIP polimerleri için 150 mg polimer ile en yüksek bağlanma değerine ulaşmaktadır (Şekil 4.5). Kolon çapı 1 cm'ye düşürülerek ve de kolona 5 kat fazla yükleme yapılarak polimerlerin performansları karşılaştırılmıştır. Şekil 4.8'de geri kazanım grafikleri ve de baskı faktörleri verilmiştir.



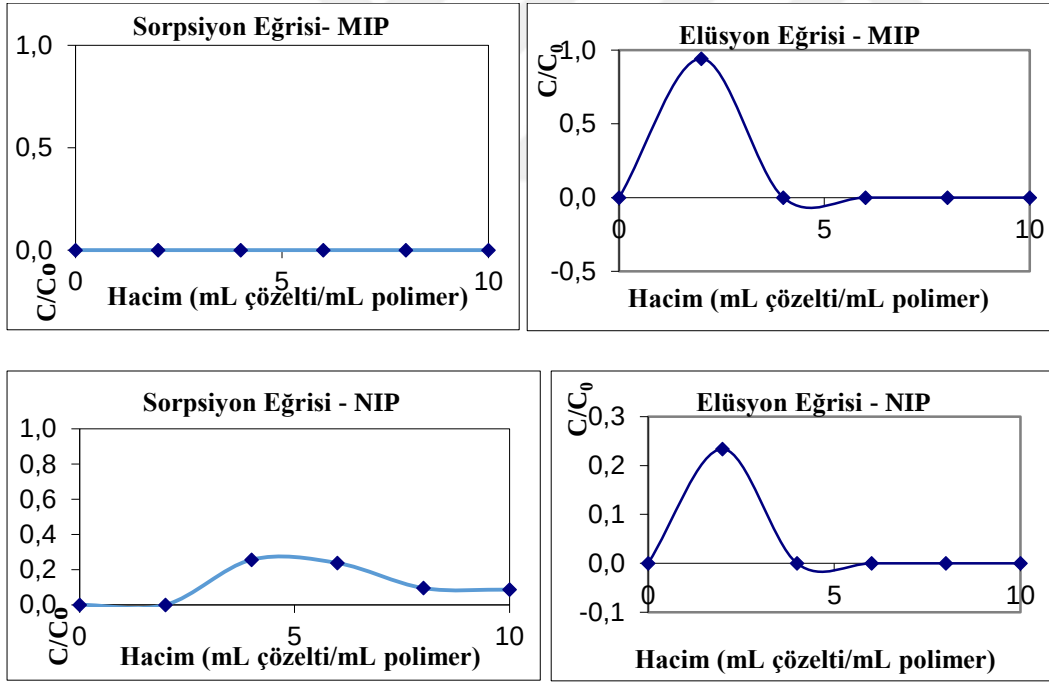
Şekil 4.8 Yükleme denemesi.

Şekil 4.8’de görüleceği üzere D4 polimerinin baskı faktörü yaklaşık 5 katına yükselmiştir. D4-MIP %97.41 geri kazanıma sahip iken D4-NIP %14.79 geri kazanıma sahiptir. Y8 polimerinin geri kazanım performansında ise düşme meydana gelmiştir. Sonuç olarak, D4 polimerinin CG’ye diğer polimerlerden daha seçimli olduğu anlaşılmaktadır.

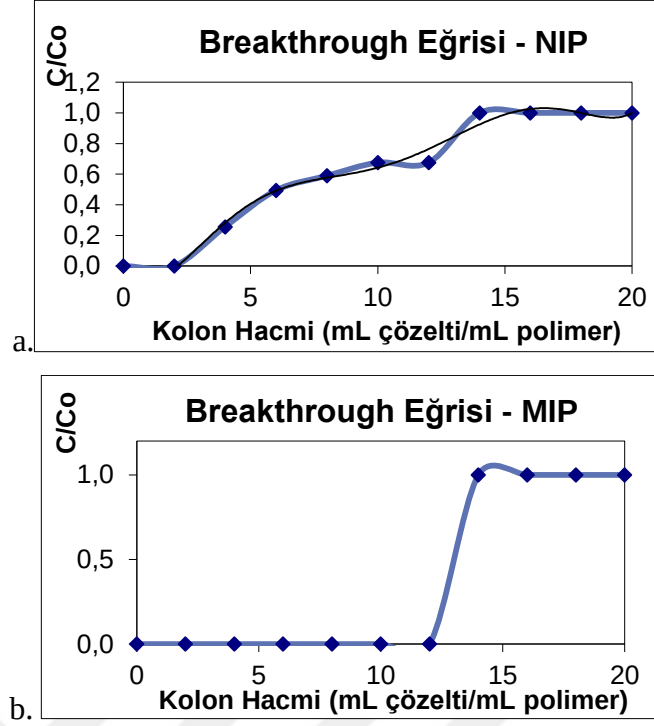
Çalışmanın bu aşamasında, breakthrough eğrilerinin çizilip baskılanmış ve baskılanmamış D4 polimerlerinin kolon hesapları yapılarak performansları karşılaştırılmıştır.

- **Breakthrough Eğrisi - D=1 cm / L=1 cm / 150 mg polimer / 0.1 mg CG/mL yükleme**

Breakthrough eğrisi için bölüm 3.2.3.3.2’de verilen prosedür izlenmiştir. Şekil 4.9’da çalışmaya ait breakthrough ve elüsyon eğrileri, Şekil 4.10’da ise Bu eğrilerin birleştirilmiş şekli görülmektedir.



Şekil 4.9 D4 polimeri için sorpsiyon ve elüsyon eğrileri.



Şekil 4.10 D4 polimeri için breakthrough eğrileri a. NIP b. MIP

MIP'in sorpsiyon eğrisine bakıldığında başlangıç konsantrasyonuna göre CG'nin hiç değişmediği görülmektedir. Bu da MIP'te %100'lük bir geri kazanım elde edildiğini göstermektedir. NIP ile kıyaslamak amacıyla baskı faktörü hesabı yapıldığında bu deneme için baskı faktörünün 2.08 olarak hesaplanmaktadır. Düşük yükleme miktarında spesifik olmayan etkileşimler sebebiyle NIP'te tutunabilen bir miktar CG baskı faktörünün azalmasına sebep olmuştur.

Şekil 4.10'da verilen breakthrough eğrileri kullanılarak kolondaki teorik tabaka sayısının hesaplanması mümkündür. Breakthrough noktası, analitin (CG) başlangıçta kolona yüklenen konsantrasyonunun %1'i oranında kolondan ayrıldığı noktayı işaret etmektedir. Aşağıda verilen denklemlerde V_R – Alıkoyma hacmi; V_B – Breakthrough hacmi; V_0 – Tutma (hold up) hacmi; N - tabaka sayısı; σ_v – standart sapma; k_w – kapasite faktörü'nü ifade etmektedir.

$$V_R = V_0(1 + k_w) \quad V_b = V_R - 2\sigma_v \quad N = 16 \frac{V_R^2}{w^2} \quad w = 4\sigma_v \quad \sigma_v = \frac{V_R}{\sqrt{N}}$$

$$\log k_w = 0.988(\pm 0.051) \log P_{oct} + 0.02(\pm 0.060)$$

Kapasite faktörü, k_w , CG'nin log P değeri olan 3.48 değeri kullanılarak aşağıdaki denklem aracılığıyla hesaplandığında $k_w=2883.527$ olarak bulunmaktadır. Sonuçlar Çizelge 4.3'te verilmiştir.

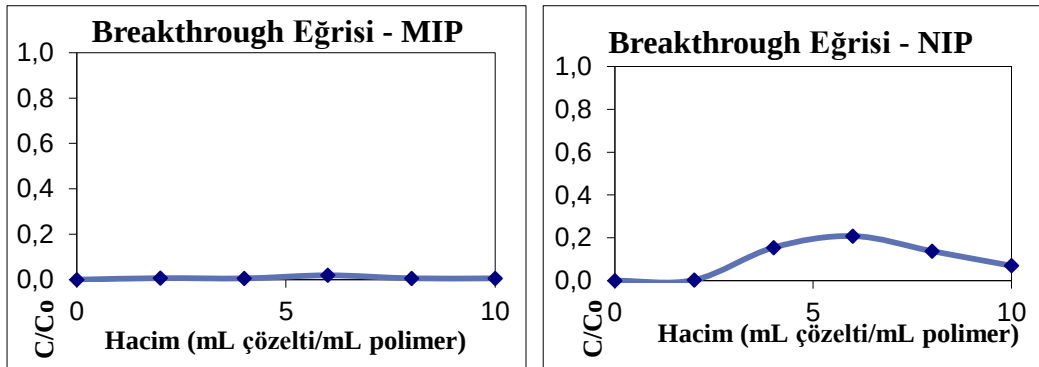
Hesaplamalar yapıldığında NIP için teorik tabaka sayısı 12 olarak bulunurken MIP için 1057 olarak bulunmaktadır. Bu kadar yüksek tabaka sayıları ancak HPLC kolonlarında görülmektedir. Bu hesaplarla D4 polimerinin HPLC kolonları kadar nitelikli bir ayırım sağlayabileceği ortaya konmaktadır.

Çizelge 4.3 Breakthrough eğrisi sonuçları.

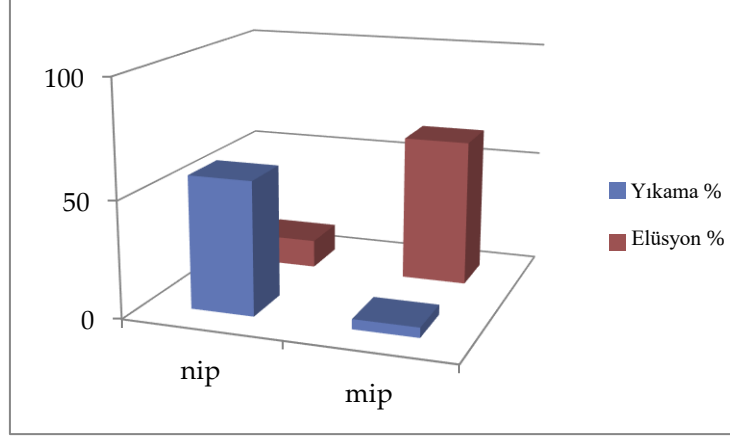
D4-NIP	D4-MIP
$V_{bNIP}=2.20$ mL	$V_{bMIP} = 12.2$ mL
$V_0 = 0.0018$ mL	$V_0 = 0.0045$ mL
$V_R = 5.29$ mL	$V_R = 13$ mL
$N = 12$	$N = 1057$
$k_w = 2883.527$	$k_w = 2883.527$
$\sigma_V = 1.5407$	$\sigma_V = 0.4$

- **Breakthrough Eğrisi - D=1.4 cm / L=1.5 cm / 300 mg polimer / 0.1 mg CG/mL yükleme**

Yükleme miktarı sabit tutularak, kolon çapı ve dolgu maddesi miktarının artırılması ile kolon performansındaki değişimin araştırılması için bu çalışma yürütülmüştür. İşlem, yıkama için 5 kez 1 KH kloroform, elüsyon için de 3 KH meoh geçirilmesini içermektedir. Sonuçlar Şekil 4.11-4.12’de sunulmuştur. Ekler Bölümünde Şekil B.1-B.13’te, bu verilere ait HPLC kromatogramları verilmiştir.



Şekil 4.11 D4 polimeri için Breakthrough eğrileri



D4 – IP = 4.18

Şekil 4.12 Breakthrough eğrisi çıkarılırken elde edilen geri kazanım ve baskı faktörü sonuçları.

Şekil 4.12 ise çalışmada elde edilen geri kazanım oranlarını göstermektedir. Önceki breakthrough eğrisinde 2.08 olan baskı faktörü 4.18'e yükselmiştir. Ancak 0.5 mg/mL yükleme ile elde edilen 5.558'lik değere ulaşamamıştır (Şekil 4.8). Yukarıdaki çalışmada yapılan, spesifik olmayan etkileşimler sebebiyle yükleme miktarının 0.5 mg/mL'den 0.1 mg/mL'ye düşmesiyle baskı faktörünün azaldığı, yorumunu bu çalışma doğrulamıştır. Dolgu maddesi miktarının 150 mg'dan 300 mg'a artması spesifik olmayan etkileşimlerin etkisini elimine ederek baskı faktörünün 4.18'e yükselmesini sağlamıştır. Sonuç olarak kolon çalışmalarından optimum geri kazanımın sağlanabilmesi için kolon özelliklerinin yanı sıra yükleme miktarının da önemli olduğu ortaya konmuştur.

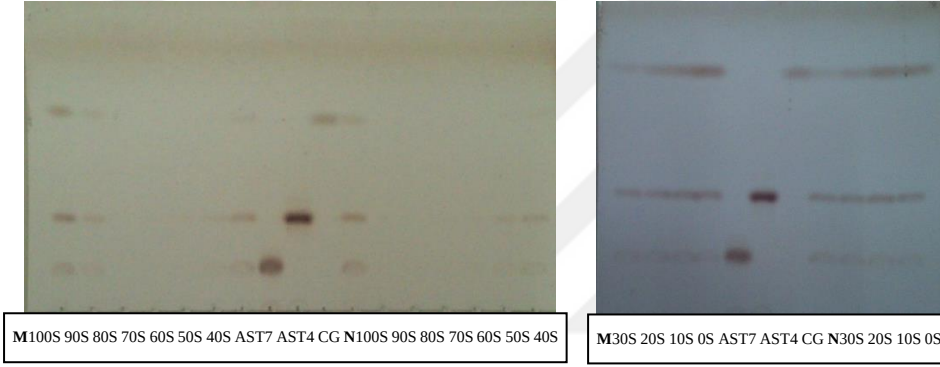
Öncelikli amaç katı faz ekstraksiyonu ile *Astragalus* ve *Astragalus* hidroliz ekstratlarından sikloastragenol izolasyonudur. Dolayısıyla polimerin bir karışım içerisinde CG'ye seçimliliği önem arz etmektedir. *Astragalus* ekstresi çok çeşitli metabolitlerden oluşan polar bir ekstrattir. Bu sebeple saf CG için kullanılan yıkama/elüsyon protokolleri ile çalışılması mümkün değildir. Çalışmada öncelikle ekstratların kolona yüklenme şekli ve CG izolasyonu için uygun çözgen sistemleri araştırılmıştır. Ardından ölçek büyütme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Aşağıda sırayla, yapılan seçimlilik çalışmalarının sonuçları kullanılan kolon çapı, dolgu maddesi miktarı ve yapılan yükleme gibi parametreleriyle beraber verilmiştir [D4 – 1:4:20 oranında çöktürme polimerizasyonu ile sentezlenen polimerler].

- D4 MIP/NIP – 1 g polimer – D=1.6 cm – AST-4/AST-7/CG karışımı

Eşit konsantrasyonda hazırlanan AST-4/AST-7/CG karışımından 5 mg alınarak 1 mL metanol içerisinde çözünüp kolona yüklenecek olan 1 g polimere

emdirilmiştir. Emdirme işlemi sonrasında polimerler SpeedVac'te kurutulmuştur. Emdirilen polimer çalışma öncesi 0.5 saat su ile şişirildikten sonra kolona yüklenmiştir. Çalışmada sırasıyla %100 su, %10'arlık gradiyent uygulanarak %90 - %10 (su:meoh) ve %100 metanol fraksiyonları alınmıştır.

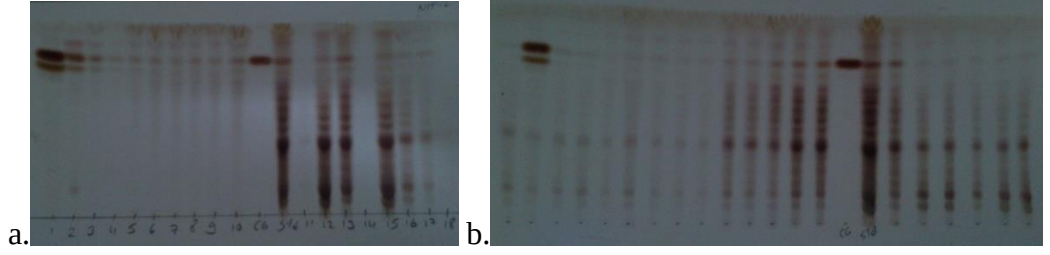
Bu çalışmada amaç, kloroform içerisinde çözünmeyeceğinden, AST-4/AST-7/CG karışımının polimere emdirilerek uygulanmasının kolon performansına etkisinin incelenmesidir. Şekil 4.13'te çalışma sonunda elde edilen İTK'lar verilmiştir. %100 su fraksiyonunda hem NIP hem de MIP'te metabolitlerin bir kısmının kolondan ayrılması, emdirme işleminden sonra gerçekleştirilen kurutma sırasında polimerin yapısında bir değişiklik meydana gelmiş olabileceğine işaret etmektedir.



Şekil 4.13 D4-MIP ve NIP ile AST-4/AST-7/CG karışımından CG izolasyonu (100:17.5:13.5 çözgen sistemi); [M-Moleküler Baskılanmış polimer; N-Baskılanmamış polimer; S-Su].

- D4 MIP/NIP – 1 g polimer – D=1.6 cm – *Astragalus* ekstresi – (Flaş Kromatografi)

10 mg *Astragalus* ekstresi 1 mL metanol içerisinde çözünüp kolona yüklenecek olan 1 g polimerin yarısına emdirilmiştir. Emdirme işlemi sonrasında polimerler SpeedVac'te kurutulmuştur. Emdirilen polimer çalışma öncesi 0.5 saat kloroform ile şişirildikten sonra kolona yüklenmiştir. Çalışma %100 kloroformdan %100 metanole gradyan oluşturulacak şekilde Flaş kromatografi cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.14'te çalışma sonunda elde edilen İTK'lar verilmiştir.

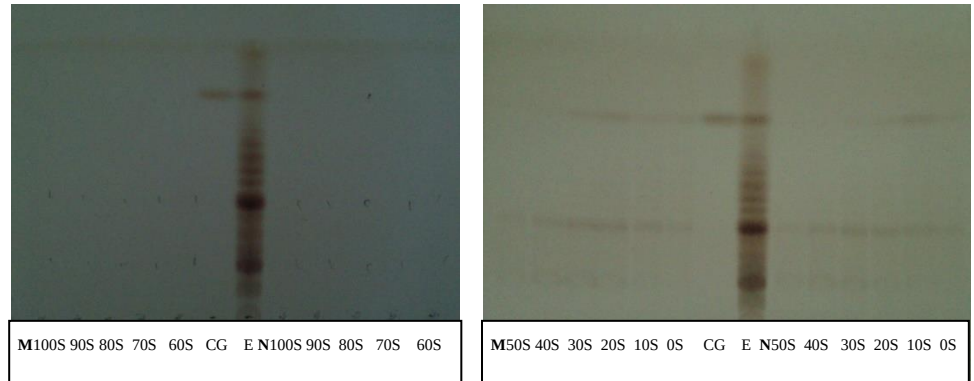


Şekil 4.14 D4-MIP ve NIP ile *Astragalus* ekstresinden CG izolasyonu a. D4-NIP b. D4-MIP (100:17.5:13.5 çözgen sistemi); [M-Moleküler Baskılanmış polimer; N-Baskılanmamış polimer; S-Su].

Flaş kromatografi cihazı kullanılarak mobil faz gradiyenti eldesi daha rahatlıkla yapıldığı için bu çalışma gerçekleştirilmiştir. Ancak bir önceki çalışmada olduğu gibi ilk fraksiyonlarda CG majör olarak hem NIP hem de MIP yüklü kolonlardan ayrılmıştır. Sorunun emdirme ile gerçekleştirilen kuru tatbikten kaynaklanıp kaynaklanmadığının anlaşılması için farklı bir yöntem daha denenmesine karar verilmiştir.

- D4 MIP/NIP – 1 g polimer – *Astragalus* ekstresi – (Ultrasonik Uyarı)

10 mg *Astragalus* ekstresi 1 mL metanol içerisinde çözünüp kolona yüklenecek olan 1 g polimere emdirilmiştir. Emdirme işlemi sonrasında polimerler SpeedVac'te kurutulmuştur. Emdirilen polimer çalışma öncesi 0.5 saat su ile 15 mL'lik santrifüj tüpünde şişirilmiştir. Çalışmada fraksiyonlama sırasıyla %100 Su, %10'arlık gradiyent uygulanarak %90 - %10 (su:meoh) ve %100 metanol olacak şekilde yapılmıştır. Sırasıyla her bir fraksiyon için önce 4 dakika ultrasonik uyarı ardından 8 dakika 5500 rpm'de santrifüj gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonunda her fraksiyonundan alınan supernatanta İTK yapılmıştır. Şekil 4.15'te sonuçlar görülmektedir.



Şekil 4.15 D4-MIP ve NIP ile *Astragalus* ekstresinden CG izolasyonu (100:17.5:13.5 çözgen sistemi); [M-Moleküler Baskılanmış polimer; N-Baskılanmamış polimer; S-Su].

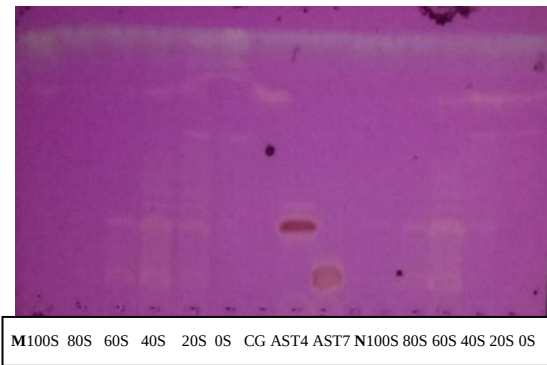
Şekil 4.15'te görüleceği gibi NIP ve MIP benzer sonuçlar vermiştir. Ultrasonik uyarı ile bile emdirilerek başarı sağlanamamıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde ekstrenin polimere emdirilmesinden sonraki kurutma aşamasında polimerlerin yapısında bir değişiklik olabileceği düşüncesi üzerine yoğunlaşmıştır. Çalışmalarımızın devamında şartlama çözgen sistemi ile ekstrenin kolona yüklenmesi ve sonrasında fraksiyonlamaların gerçekleştirilmesine karar verilmiştir.

- D4 MIP/NIP – 0.5 g polimer – D=1.6 cm – *Astragalus* ekstresi – pH 4

Kolon %100 su sistemiyle şartlanmıştır. Daha sonra aynı sistemle kolona ekstre (10 mg/500 µl) yüklenmiştir. Çalışmada sırasıyla %100 su, %20'şerlik gradiyent uygulanarak %80 - %20 (su:meoh) ve %100 metanol fraksiyonları alınmıştır.

Metakrilik asit polimerlerinin pH'sının 4 olduğu bilinmektedir. Bölüm 4.9'da ise pH'nın şişme üzerindeki etkisi, tampon çözelti ve su:asetonitril çözgen sistemleri ile çalışılarak Çizelge 4.16 ve 4.17'de sunulmuştur. Bu çalışmada pH asidik olarak ayarlanarak polimerlerin şişme oranının azaltılması ve dolayısıyla da kolondaki akışın artması hedeflenmiştir. Fraksiyonların pH'sı pH kağıdı ile asetik asit kullanılarak ayarlanmıştır.

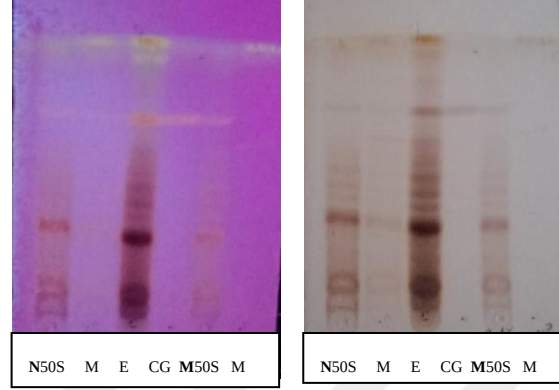
Şekil 4.16'da verilen İTK'lar incelendiğinde asidik pH'nın kolondaki ayırmaya pozitif bir etkisinin olmadığı görülmektedir. Su:metanol protokolü yerine alternatif olarak su:asetonitril karışımları kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.16 D4-MIP ve NIP ile *Astragalus* ekstresinden CG izolasyonu (100:17.5:13.5 çözgen sistemi); [M-Moleküler Baskılanmış polimer; N-Baskılanmamış polimer; S-Su].

- **D4-MIP/NIP – 0.5 g polimer – D=1.6 cm – *Astragalus* ekstresi**

Kolon 50:50 su:AcN sistemiyle şartlanmıştır. Daha sonra aynı sistemle kolona ekstre (10 mg/500 µl) yüklenmiştir. Yıkama fraksiyonu olarak 10 mL 50:50 su:AcN, elüsyon fraksiyonu olarak 10 mL meoh sistemden geçirilmiştir.

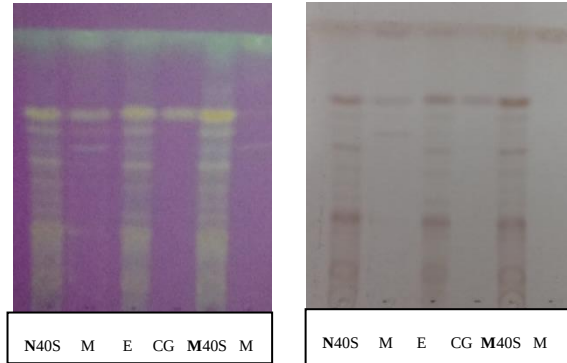


Şekil 4.17 D4-MIP ve NIP ile *Astragalus* ekstresinden CG izolasyonu (100:17.5:13.5 çözgen sistemi); [M-Moleküler Baskılanmış polimer; N-Baskılanmamış polimer; S-Su; M-Metanol; E-Ekstre].

İTK'lar (Şekil 4.17) incelendiğinde, sistemin CG izolasyonu için başarılı olmadığı görülmüştür. Bütün ekstre yıkama basamağında alınmıştır. Bir sonraki basamakta çalışmaların daha polar bir sistem ve CG konsantrasyonu bakımından daha zengin olan hidroliz ekstresi ile yürütülmesine karar verilmiştir.

- **D4-MIP/NIP – 0.5 g polimer – D=1.6 cm – *Astragalus* hidroliz ekstresi**

Kolon 40:60 su:AcN sistemiyle önce şartlanmıştır. Daha sonra aynı sistemle kolona ekstre (10 mg/500µL) yüklenmiştir. Yıkama fraksiyonu olarak 10 mL 60:40 AcN:su, elüsyon fraksiyonu olarak 10 mL meoh kolondan geçirilmiştir.

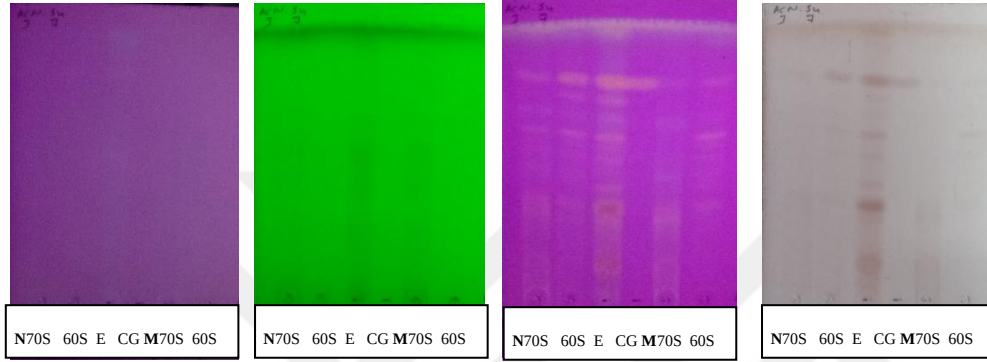


Şekil 4.18 D4-MIP ve NIP ile *Astragalus* hidroliz ekstresinden CG izolasyonu (100:17.5:13.5 çözgen sistemi); [M-Moleküler Baskılanmış polimer; N-Baskılanmamış polimer; S-Su; M-Metanol; E-Ekstre].

İTK’larda (Şekil 4.18) da görüleceği üzere bu sistem de izolasyon için başarılı değildir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda daha da polar bir sistemle izolasyona başlanması gerektiği ortaya konmuştur.

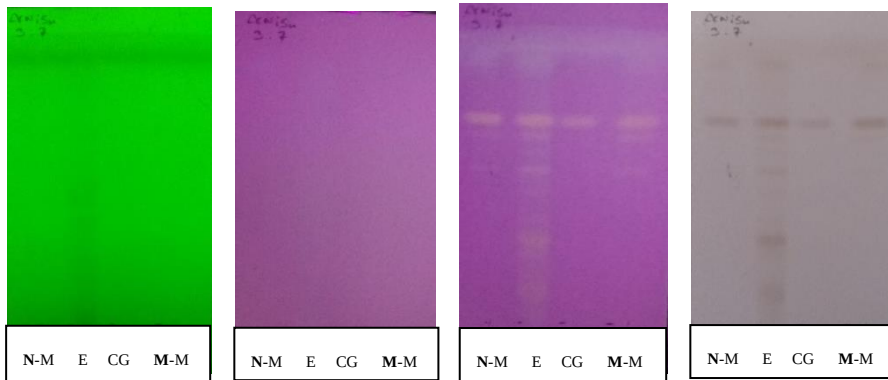
- **D4-MIP/NIP – 0.5 g polimer – D=1.6 cm – *Astragalus* hidroliz ekstresi**

Kolon 70:30 su:AcN sistemiyle önce şartlanmıştır. Daha sonra aynı sistemle kolona ekstre (2.5 mg/500µL) yüklenmiştir. Yıkama fraksiyonu olarak 5 mL 70:30 su:AcN, elüsyon fraksiyonu olarak 5 mL 60:40 su:AcN kolondan geçirilmiştir



Şekil 4.19 D4-MIP ve NIP ile *Astragalus* hidroliz ekstresinden CG izolasyonu (100:17.5:13.5 çözgen sistemi); [M-Moleküler Baskılanmış polimer; N-Baskılanmamış polimer; S-Su; E-Ekstre].

Steroller ile yapılan bir çalışma örnek alınarak bu çözgen sistemi ile deneme yapılmıştır (Qiujin et al., 2009). İTK’lardan (Şekil 4.19) görüleceği gibi baskılanmamış polimerde ekstre karışık olarak kolondan ayrılırken baskılanmış polimerde yıkama basamağında istenmeyen metabolitlerin çoğu giderilebilmektedir. Ancak elüsyon basamağında CG miktarının oldukça az olduğu görülmüştür. Bu durumda CG’nin kolonda kalmış olabileceği düşüncesiyle bir elüsyon basamağı da eklenerek kolondan 5 mL meoh geçirilmiştir.



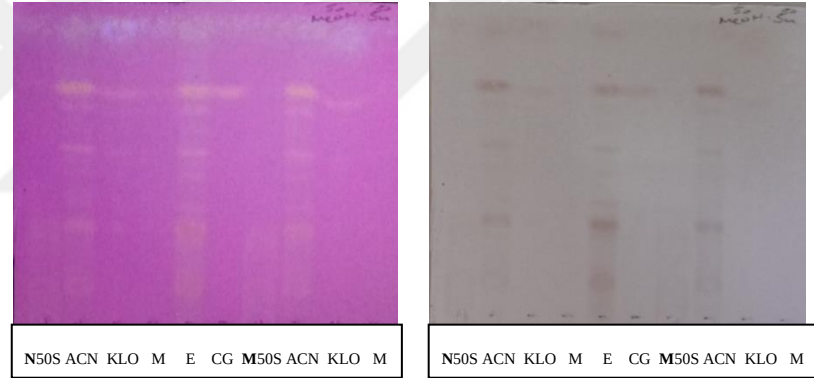
Şekil 4.20 D4-MIP ve NIP ile *Astragalus* hidroliz ekstresinden CG izolasyonu (100:17.5:13.5 çözgen sistemi); [M-Moleküler Baskılanmış polimer; N-Baskılanmamış polimer; M-Metanol; E-Ekstre].

İTK'lerden (Şekil 4.20) görüleceği gibi kolonda halen CG bulunmaktadır. Ancak bu durum hem baskılanmış hem baskılanmamış polimer için geçerlidir. Bu çalışmada kolona yüklenen CG konsantrasyonu da azaltılmış olmasına rağmen net bir ayırım görülememiştir. Farklı yıkama ve elüsyon çözümleri kullanılarak denemelere devam edilmesi kararlaştırılmıştır.

- **D4-MIP/NIP – 0.5 g polimer – D=1.6 cm – *Astragalus* hidroliz ekstresi**

Kolon 50:50 su:meoh sistemiyle önce şartlanmıştır. Daha sonra aynı sistemle kolona ekstre (2.5 mg/500µL) yüklenmiştir. Yıkama fraksiyonları olarak 5 mL 50:50 meoh:su, 5 mL asetonyitril, 5 mL kloroform ve elüsyon fraksiyonu olarak 5 mL meoh kolondan geçirilmiştir.

Araştırmalara göre baskılanmış polimerlerle ayırma saflaştırma sırasında farklı çözümlere geçişler kolonda yeniden yerleşmelere fırsat vererek baskılanan molekülün izolasyonunu kolaylaştırmaktadır(Claude et al., 2010).

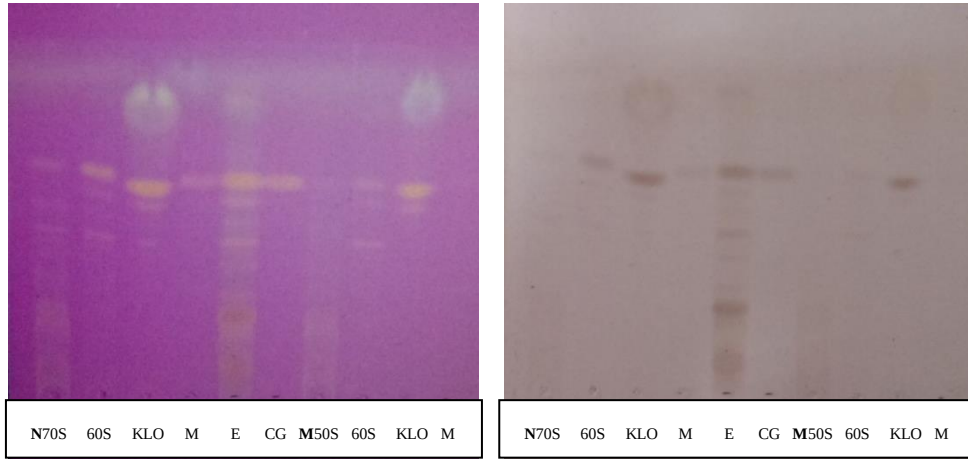


Şekil 4.21 D4-MIP ve NIP ile *Astragalus* hidroliz ekstresinden CG izolasyonu (100:17.5:13.5 çözümleri sistemi); [M-Moleküler Baskılanmış polimer; N-Baskılanmamış polimer; S-Su; M-Metanol; E-Ekstre; AcN-Asetonyitril;KLO-Kloroform].

Ancak İTK'lar (Şekil 4.21) incelendiğinde, metanol:su sisteminde yüklenen ekstreden, ikinci fraksiyonda asetonyitrile geçilmesiyle CG'nin direkt olarak hem baskılanmış hem de baskılanmamış polimerde ayrıldığı görülmektedir. Bu sonuçlar ışığında kolonda yeniden yerleşme teorisi ile farklı bir fraksiyonlama sırası uygulanmıştır.

- **D4-MIP/NIP – 0.5 g polimer – D=1.6 cm – *Astragalus* hidroliz ekstresi**

Kolon 70:30 su:AcN sistemiyle önce şartlanmıştır. Daha sonra aynı sistemle kolona ekstre (2.5 mg/500 µL) yüklenmiştir. Yıkama fraksiyonları olarak 10 mL 70:30 Su:ACN, 10 mL 60:40 su:AcN, 10 mL kloroform, elüsyon fraksiyonu olarak 10 mL meoh kolondan geçirilmiştir.

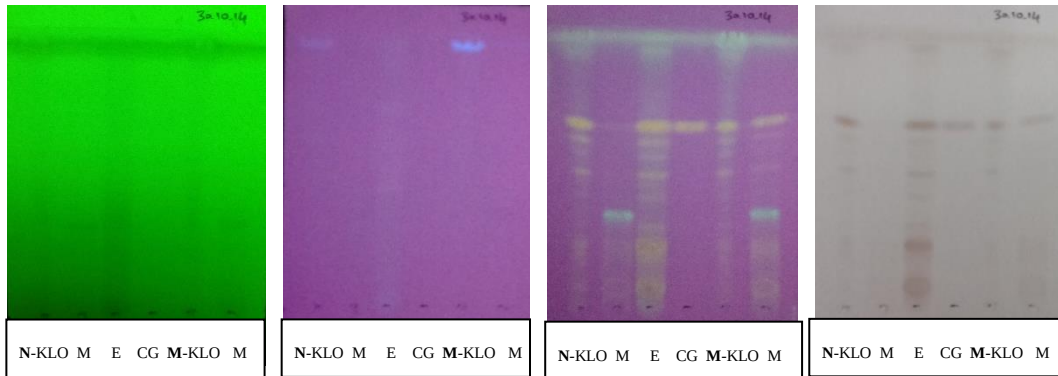


Şekil 4.22 D4-MIP ve NIP ile *Astragalus* hidroliz ekstresinden CG izolasyonu (100:17.5:13.5 çözgen sistemi); [M-Moleküler Baskılanmış polimer; N-Baskılanmamış polimer; S-Su; M-Metanol; KLO-Kloroform].

Bu çalışmada yıkama basamağına kloroform da eklenmiştir. Asetonitril sistemi ile şartlanan kolondan kloroforma geçişte bir önceki çalışmada olduğu gibi hem baskılanmış hem de baskılanmamış polimerde CG'nin tamamı kolondan alınmıştır (Şekil 4.22). Yeniden yerleşme teorisinin hedeflerimiz için uygun olmadığı ortaya konmuştur. Saf CG ile yapılan MIP çalışmasında kloroform ile kolondan CG gelmemektedir. Ancak su:meoh ve su:asetonitril sistemi ile şartlanmış kolonda kloroform ile hem MIP hem de NIP'te yüklenen CG'nin tamamı kolondan alınmıştır. Bunun üzerine kloroformlu sistemlerin ekstre ile denenmesi kararlaştırılmıştır.

- D4-MIP/NIP – 0.5 g polimer – D=1.6 cm – *Astragalus* hidroliz ekstresi

Kolon kloroform ile şartlanmıştır. 100 µl metanolde çözünen hidroliz ekstresi (2.5 mg) kolona uygulanmıştır. 5 mL CHCl₃ ile yıkama, 5 mL meoh ile elüsyon gerçekleştirilmiştir.



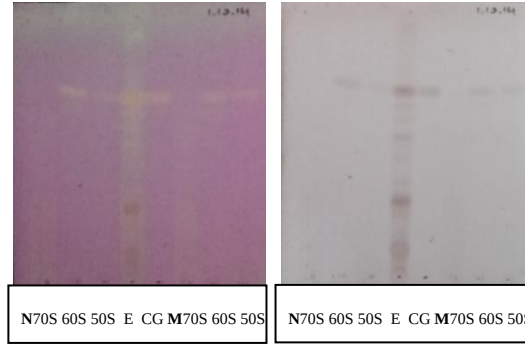
Şekil 4.23 D4-MIP ve NIP ile *Astragalus* hidroliz ekstresinden CG izolasyonu (100:17.5:13.5 çözgen sistemi); [M-Moleküler Baskılanmış polimer; N-Baskılanmamış polimer; S-Su; M-Metanol; KLO-Kloroform].

İTK'lar incelendiğinde; NIP'te CG'nin tamamı yıkama fraksiyonunda gelirken MIP'te yalnızca bir bölümü yıkamada kolondan alınmıştır. Kalan CG ise elüsyon fraksiyonunda görülmektedir. Yıkama basamağında kloroform kullanımının CG'yi ekstreden saflaştırmaya yetmediği sonucuna varılmıştır (Şekil 4.23).

Katı faz ekstraksiyonu çalışmalarında karşılaşılan en büyük problem polimerlerin şişerek jelleşmesi ve de vakum altında çalışılırken kanallaşmaya sebep olması olduğundan, bu durumun saflaştırma verimine etki ettiği yargısına varılmıştır. Polimerlerin SpeedVac'te kurutulmak yerine liyofilize edilmesinin polimerlerin şişmesini engelleyebileceği düşüncesi ile bir sonraki çalışmada kullanılacak olan polimerlerin kurutma işlemlerinin liyofilizatörde yapılması kararlaştırılmıştır.

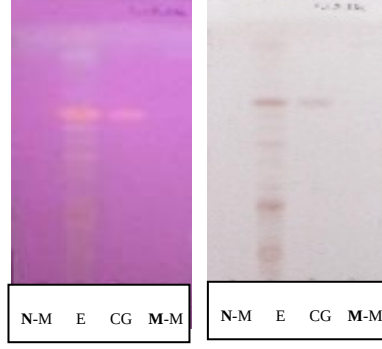
- **D4-MIP/NIP – 0.5 g polimer (liyofilize) – D=1.6 cm – *Astragalus* hidroliz ekstresi**

Kolon 70:30 su:AcN sistemi ile şartlanmıştır. 2.5 mg/500 µL hidroliz ekstresi aynı sistemle kolona uygulandıktan sonra yıkama fraksiyonları olarak 10 mL 70:30, 10 mL 60:40 su:AcN ve elüsyon fraksiyonu olarak 10 mL 50:50 su:AcN sistemleri kolondan geçirilmiştir.



Şekil 4.24 D4-MIP ve NIP ile *Astragalus* hidroliz ekstresinden CG izolasyonu (100:17.5:13.5 çözgen sistemi); [M-Moleküler Baskılanmış polimer; N-Baskılanmamış polimer; S-Su].

Önceki çalışmada 60:40 su:AcN sisteminde MIP ile CG kolonda tutulabilmiştir. Bu çalışmada ise bir kısmı kolonda kalırken bir kısmı 60:40 sistemi ile kolondan ayrılmıştır (Şekil 4.24). Bunun sebebinin kolonda yaşanan kanallaşma olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.25 D4-MIP ve NIP ile *Astragalus* hidroliz ekstresinden CG izolasyonu (100:17.5:13.5 çözgen sistemi) [M-Moleküler Baskılanmış polimer; N-Baskılanmamış polimer; M-Metanol].

Kolonda kalan CG miktarını saptamak için son olarak 5 mL meoh geçirilmiştir. Şekil 4.25'te görüleceği gibi MIP'te eser miktarda, NIP'te ise hiç CG kalmamıştır.

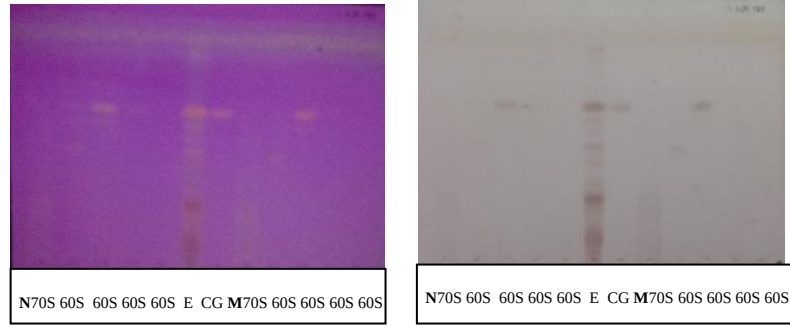
Polimerlerin şişmesini bir miktar engelleyebileceği düşüncesiyle bu çalışmada liyofilize edilen polimerler kullanılmıştır. Ancak polimerlerin şişmesi sorunu giderilememiştir. Dolayısıyla SpeedVac ile kurutma veya liyofilizasyon ile kurutma arasında bir fark olmadığı gösterilmiştir. Sonuç olarak polimerlerin liyofilize edilmesi, polimerin şişmesini etkilemediği gibi şişerek jelleşen polimerlerde vakum sayesinde kanallaşma yaşanmasını da engellemektedir. Kanallaşma sorununu çözmek adına farklı adımların atılması gerektiği kanaatine varılmıştır.

Bir sonraki çalışmada, şişme ve kanallaşma sorunları bir yana bırakılarak CG'nin kolondan saf olarak izole edilebilmesini sağlayacak farklı fraksiyon hacimleri üzerine bir deneme oluşturulmuştur.

- D4-MIP/NIP – 0.5 g polimer – D=1.6 cm – *Astragalus* hidroliz ekstresi

Kolon 70:30 su:AcN sistemi ile şartlanmıştır. 2.5 mg/500 µL hidroliz ekstresi aynı sistemle kolona uygulandıktan sonra yıkama fraksiyonu olarak 10 mL 70:30, elüsyon fraksiyonu olarak ise 40 mL 60:40 su:AcN sistemi kolondan geçirilmiştir.

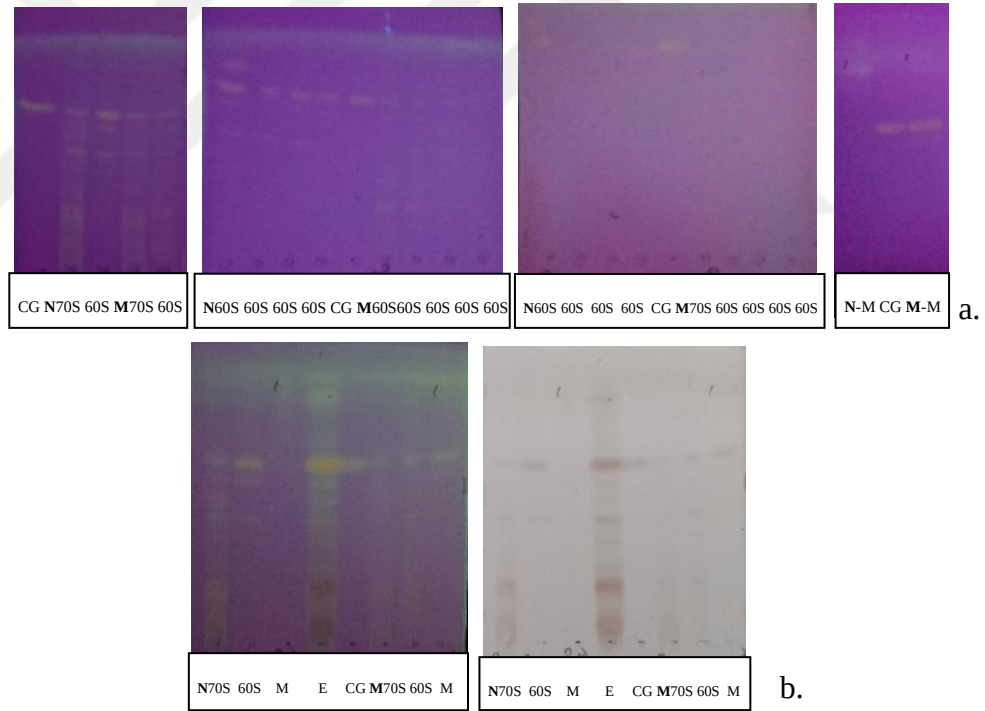
Bir önceki çalışmada olduğu gibi bu çalışmada da 60:40 sistemi ile kolondan CG alınmıştır. İlk 10 mL'de eser miktarda CG gelirken ikinci 10 mL'de kolona yüklenen bütün CG kolondan alınmıştır. Şekil 4.26 incelendiğinde NIP ile MIP'in benzer şekilde davrandığı görülmektedir. Şartlama sırasında kanallaşma olabileceği düşünülerek çalışma tekrar edilmiştir.



Şekil 4.26 D4-MIP ve NIP ile *Astragalus* hidroliz ekstresinden CG izolasyonu (100:17.5:13.5 çözgen sistemi); [M-Moleküler Baskılanmış polimer; N-Baskılanmamış polimer; S-Su].

- D4-MIP/NIP – 0.5 g polimer – D=1.6 cm – *Astragalus* hidroliz ekstresi

Kolon 70:30 su:AcN sistemi ile şartlanmıştır. 2.5 mg/500 µL hidroliz ekstresi aynı sistemle kolona uygulandıktan sonra 10 mL 70:30, 40 mL 60:40 su:AcN sistemi ile kolon yıkanmıştır. 40 mL 60:40 su:AcN 5'er mL'lik fraksiyonlar halinde geçirilerek İTK ile kontrol edilmiştir. En son 10 mL metanol ile elüsyon yapılmıştır.

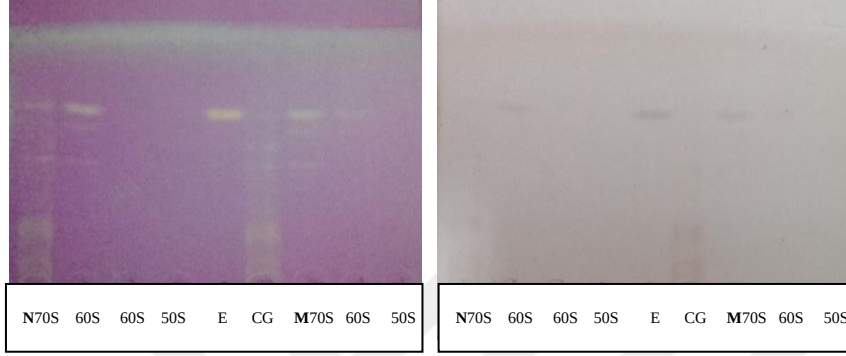


Şekil 4.27 D4-MIP ve NIP ile *Astragalus* hidroliz ekstresinden CG izolasyonu (100:17.5:13.5 çözgen sistemi) a. Tek tek fraksiyonlar b. Birleştirilerek konsantre edilmiş fraksiyonlar [M-Moleküler Baskılanmış polimer; N-Baskılanmamış polimer; S-Su; M-Metanol].

Sonuçlar incelendiğinde (Şekil 4.27), MIP'te 60:40 (su:AcN) sistemi ile bir miktar CG kolondan alınırken NIP'te tamamı alınmıştır. Ancak MIP'in elüsyon fraksiyonu olan metanol fraksiyonunda bir takım kirlilikler de mevcuttur. CG'nin saf olarak izolasyonunun gerçekleştirilebilmesi için prosedürün geliştirilerek kullanılmasına karar verilmiştir.

- **D4-MIP/NIP – 0.5 g polimer – D=1.6 cm – *Astragalus* hidroliz ekstresi**

Kolon 70:30 su:AcN sistemi ile şartlanmıştır. 2.5mg/500µL hidroliz ekstresi aynı sistemle kolona uygulandıktan sonra yıkama fraksiyonu olarak 10 mL 70:30, 40 mL 60:40, elüsyon fraksiyonu olarak ise 10 mL 50:50 su:AcN sistemi kolondan geçirilmiştir.



Şekil 4.28 D4-MIP ve NIP ile *Astragalus* hidroliz ekstresinden CG izolasyonu (100:17.5:13.5 çözgen sistemi); [M-Moleküler Baskılanmış polimer; N-Baskılanmamış polimer; S-Su].

Şekil 4.28 incelendiğinde çalışmanın başarısızlıkla sonuçlandığı görülmektedir. Daha ilk yıkama fraksiyonuyla CG'nin kolondan ayrılması kolonda kanallaşma yaşandığına işaret etmektedir.

Çizelge 4.4'te 0.5 g polimer ile yapılan katı faz ekstraksiyonu çalışmaları özetlenmiştir. Katı faz ekstraksiyonu denemelerinde yaşanan bir takım problemler saflaştırma işleminin optimizasyonunu zorlaştırmaktadır. Bu problemler ölçek büyütme de karşılaşılabilecek problemleri de kapsamaktadır: kanallaşma, basınç düşmesi, tıkanma ve aşırı yükleme.

Metakrilik asit polimerlerinin jelleşen bir yapıya sahip olması kolonları şartlamayı güç hale getirmektedir. Katı faz ekstraksiyonu vakum altında çalışan bir sistem olduğundan kolon daha şartlanırken kolonda kanalların meydana gelmesi mümkündür. Bu kanalların dışında kolon duvarlarında oluşan hava kabarcıklarının da ayırma saflaştırma işlemlerinin verimini etkileyeceği açıktır. Kanallaşma sorununa bir çözüm getirmek adına polimer miktarının iki katına çıkarılarak denemelerin sürdürülmesi kararlaştırılmıştır. Ancak polimer miktarı arttıkça kolondaki basınç düşmesi artacağından ve tıkanma meydana geleceğinden benzer basınç düşmelerinde dolayısıyla da benzer akış hızlarında çalışılabilmesi için kolon çapının da belli bir oranda artırılması kararlaştırılmıştır.

Çizelge 4.4 0.5 g polimer çalışmaları.

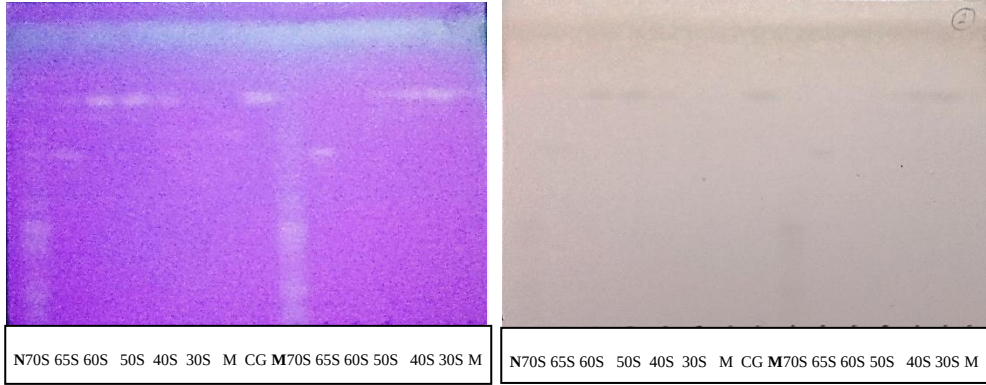
Yükleme	Şartlama	Yıkama	Elüsyon	Yapılan İyileştirme Çalışması
<i>Astragalus</i> ekstresi (10 mg/500 µL)	Su	su-meoh	meoh	pH 3-4
<i>Astragalus</i> ekstresi (10 mg/500 µL)	50:50 su:AcN	50:50 su:AcN	meoh	Apolar sistem ile şartlama
<i>Astragalus</i> hidroliz ekstresi (10 mg/500 µL)	40:60 su:AcN	40:60 su:AcN	meoh	Hidroliz ekstresi/polar sistem ile şartlama
<i>Astragalus</i> hidroliz ekstresi (2.5 mg/500 µL)	70:30 su:AcN	70:30 su:AcN	60:40 su:AcN	Polar sistem ile şartlama/yükleme konsantrasyonunu azaltma
<i>Astragalus</i> hidroliz ekstresi (2.5 mg/500 µL)	50:50 su:AcN	50:50 su:AcN, AcN, KLO	meoh	Yeniden yerleşme teorisi
<i>Astragalus</i> hidroliz ekstresi (2.5 mg/500 µL)	70:30 su:AcN	70:30 su:AcN, 60:40 su:AcN, KLO	meoh	Yeniden yerleşme teorisi
<i>Astragalus</i> hidroliz ekstresi (2.5 mg/500 µL)	KLO	KLO	meoh	Saf CG denemeleri benzeri
<i>Astragalus</i> hidroliz ekstresi (2.5 mg/500 µL)	70:30 su:AcN	70:30 su:AcN, 60:40 su:AcN	50:50 su:AcN	Liyofilize polimer
<i>Astragalus</i> hidroliz ekstresi (2.5 mg/500 µL)	70:30 su:AcN	70:30 su:AcN,	60:40 su:AcN	Fraksiyon hacmi değiştirilerek elüsyon basamağını iyileştirme
<i>Astragalus</i> hidroliz ekstresi (2.5 mg/500 µL)	70:30 su:AcN	70:30 su:AcN, 60:40 su:AcN	meoh	Fraksiyon hacmi değiştirilerek elüsyon basamağını iyileştirme
<i>Astragalus</i> hidroliz ekstresi (2.5 mg/500 µL)	70:30 su:AcN	70:30 su:AcN, 60:40 su:AcN	50:50 su:AcN	Fraksiyon hacmi değiştirilerek elüsyon basamağını iyileştirme

Yukarıdaki çalışmalarda, 1.6 cm çaplı kolon ve 0.5 g polimer ile elde edilen akış hızı 0.25mL/dk iken bölüm 3.2.4'te verilen basınç düşmesi denklemleri kullanılarak hesaplanan basınç düşmesi ise 0.35 Pa'dır. Yapılan hesaplamalar sonucunda 1 g polimerin 1.8 cm çaplı bir katı faz ekstraksiyonu kolonuna yüklenmesi ile benzer koşulların elde edilebileceği ortaya konmuştur. Ölçek büyütme sonuçlarıyla birlikte bu çalışma için yapılan hesaplamaların da sonuçları Çizelge 4.25'te yer sunulmuştur.

- **D4-MIP/NIP – 1 g polimer – D=1.8 cm – *Astragalus* hidroliz ekstresi**

Kolon 70:30 su:AcN sistemi ile şartlanmıştır. 7 mg/500 µL hidroliz ekstresi aynı sistemle kolona uygulandıktan sonra 20 mL 70:30, 20 mL 65:35, 10 mL 60:40,

10 mL 50:50, 10 mL 40:60, 10 mL 30:70 su:AcN ve en son meoh sistemleri ile fraksiyonlama yapılmıştır.



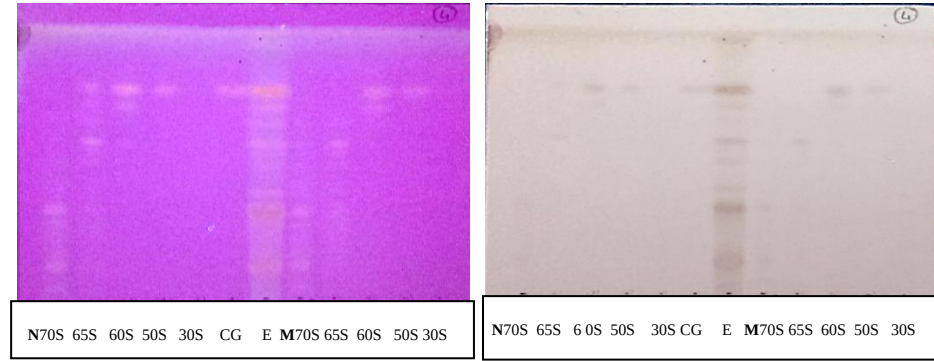
Şekil 4.29 D4-MIP ve NIP ile *Astragalus* hidroliz ekstresinden CG izolasyonu (100:17.5:13.5 çözgen sistemi); [M-Moleküler Baskılanmış polimer; N-Baskılanmamış polimer; S-Su; E-Ekstre; M-Metanol].

Şekil 4.29'daki İTK'lar incelendiğinde 50:50 fraksiyonunun belirleyici olduğu saptanmıştır. NIP'te 50:50 fraksiyonu dahil olmak üzere önceki fraksiyonlarda CG'nin çoğunluğu kolondan elüe edilmişken MIP'te CG'nin büyük bir kısmının 50:50 fraksiyonundan sonra geldiği görülmüştür. Her ne kadar 0.5 g polimer ile yapılan denemelerde pH'nın CG saflaştırmasına bir etkisi olmadığı ortaya konduysa da polimerlerin şişme miktarını azalttığı bilindiğinden (Bölüm 4.9) bir sonraki denemede pH'nın etkisinin araştırılması kararlaştırılmıştır.

- D4-MIP/NIP – 1 g polimer – D=1.8 cm – *Astragalus* hidroliz ekstresi – pH:4

Kolon 70:30 su:AcN sistemi ile şartlanmıştır. 7 mg/500 µL hidroliz ekstresi (pH: 4) aynı sistemle kolona uygulandıktan sonra 15 mL 70:30, 15 mL 65:35, 20 mL 60:40, 10 mL 50:50 su:AcN sistemleri ile yıkama, 20 mL 30:70 su:AcN sistemi ile elüsyon gerçekleştirilmiştir.

Polimerin 0.5 g'ı ile yapılan çalışmalara bakıldığında, 60:40 su:AcN fraksiyonunda MIP'te çok az miktarda CG elüe edilebilmektedir. Bu çalışmada, 65:35 fraksiyonunu hacimce 5 mL azaltılıp 60:40 fraksiyonu 10 mL artırılmıştır. Şekil 4.30'da da görüleceği gibi tam ters bir uygulama ile daha iyi bir ayırımın gerçekleştirilebileceği düşünülmektedir.



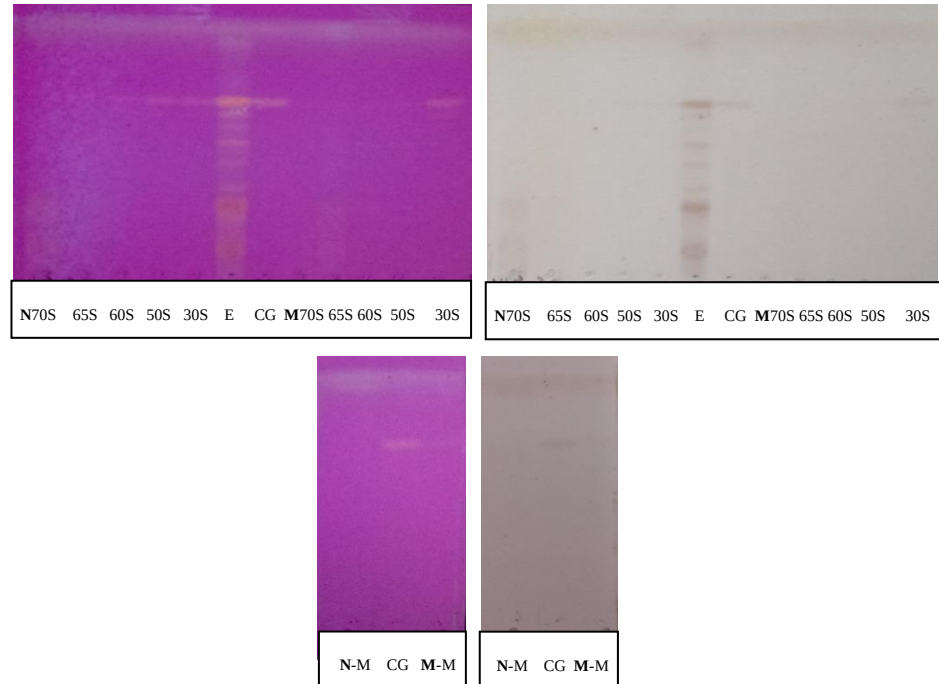
Şekil 4.30 D4-MIP ve NIP ile *Astragalus* hidroliz ekstresinden CG izolasyonu (100:17.5:13.5 çözgen sistemi); [M-Moleküler Baskılanmış polimer; N-Baskılanmamış polimer; S-Su; E-Ekstre].

Bu çalışma asidik pH'nın akışı kolaylaştırıp ayırımı düzenleyeceği düşünüldükçe gerçekleştirilse de sonuç olarak bir kez daha pH'nın düşürülmesinin çalışmaya pozitif etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.30).

Bir sonraki çalışma, CG'nin kolondan saf eldesine yönelik farklı fraksiyon hacimlerinin araştırılması için kurgulanmıştır.

- **D4-MIP/NIP – 1 g polimer – D=1.8 cm – *Astragalus* hidroliz ekstresi**

Kolon 70:30 su:AcN sistemi ile şartlanmıştır. 7 mg/500 µL hidroliz ekstresi aynı sistemle kolona uygulandıktan sonra 15 mL 70:30, 25 mL 65:35, 10 mL 60:40, 10 mL 50:50 su:AcN sistemleri ile yıkama, 20 mL 30:70 su:AcN ve 10 mL metanol sistemleri ile elüsyon gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.31 D4-MIP ve NIP ile *Astragalus* hidroliz ekstresinden CG izolasyonu (100:17.5:13.5 çözgen sistemi); [M-Moleküler Baskılanmış polimer; N-Baskılanmamış polimer; S-Su; E-Ekstre; M-Metanol].

İTK'lar incelendiğinde (Şekil 4.31), MIP'in baskılama potansiyelinin yüksek olduğu ve CG'nin tamamını kolonda tutabildiği görülmektedir. Çalışmalar neticesinde CG içeren majör fraksiyonun 30:70 su:AcN fraksiyonu olduğu Şekil 4.31'de açıkça görülmektedir.

Çizelge 4.5'te 1 g polimer ile yapılan katı faz ekstraksiyonu çalışmalarının bir özeti verilmiştir.

Çizelge 4.5 1 g polimer ile yapılan çalışmalar.

Yükleme	Şartlama	Yıkama	Elüsyon	Yapılan İyileştirme Çalışması
<i>Astragalus</i> hidroliz ekstresi (7mg/500 µL)	70:30 su:AcN	70:30, 65:35, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70 su:AcN	meoh	Dolgu maddesi miktarı ve kolon çapı artışı
<i>Astragalus</i> hidroliz ekstresi (7mg/500 µL)	70:30 su:AcN	70:30, 65:35, 60:40, 50:50 su:AcN	30:70 su:AcN	pH 4/ yıkama fraksiyon hacmi
<i>Astragalus</i> hidroliz ekstresi (7mg/500 µL)	70:30 su:AcN	70:30, 65:35, 60:40, 50:50, 30:70 su:AcN	meoh	Fraksiyon hacimleri

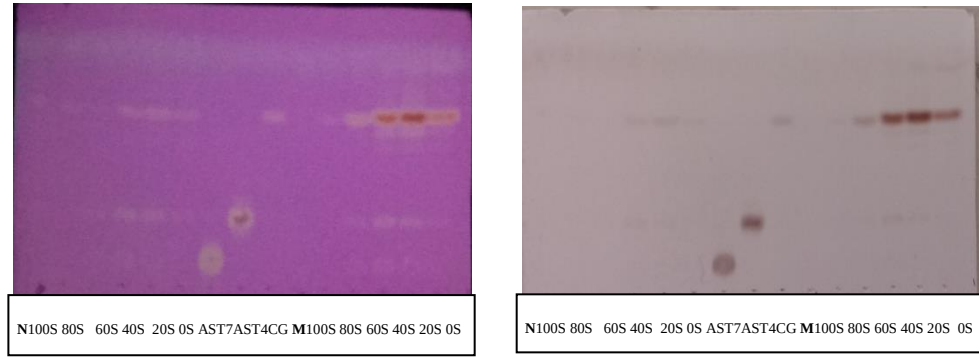
Ölçek büyütme çalışmalarına geçilmeden önce farklı monomerlerden elde edilen moleküler baskılanmış polimerlerin metakrilik asit polimerlerine göre daha iyi ayırım sağlayıp sağlamayacaklarını anlamak için denemeler yürütülmüştür.

4.4 Alternatif Polimerler ile Seçimlilik Denemeleri

Bölüm 3.2.1 Çizelge 3.5 ve 3.6'da verilen oranlar kullanılarak stiren ve vinil piridin bazlı polimerler sentezlenmiştir. Çalışmaların sonuçları aşağıda verilmektedir.

- Sty-DVB – 300 mg polimer – D=1.4 cm – AST-4/AST-7/CG karışımı

Stiren-divinilbenzen bazlı polimerler öncelikle kloroform ile şartlanarak saf CG ile yüklenmiştir. Ancak polimer kloroform ile jelleştiğinden hiç akış sağlanamamıştır. Bunun üzerine *Astragalus* ekstresi metabolitlerinden AST-4, AST-7 ve CG karışımı hazırlanarak (30'ar mg/12 mL) %100 su ile şartlandırılan polimere yüklenmiştir. %100 sudan %100 metanole fraksiyonlar toplanmıştır.



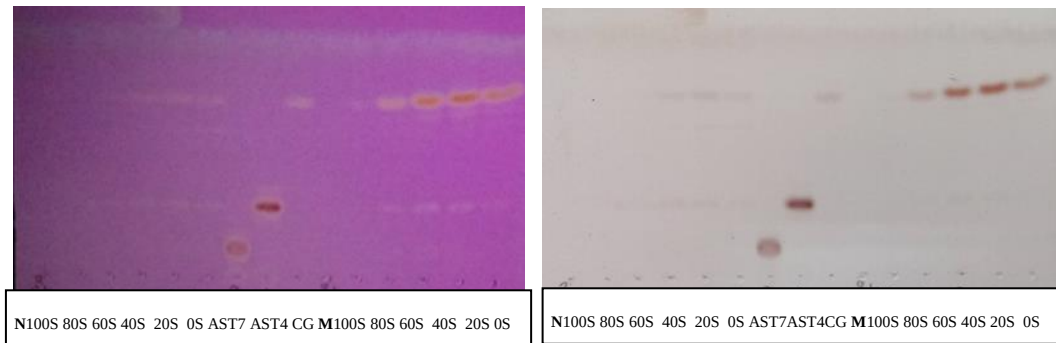
Şekil 4.32 Stiren divinilbenzen polimerleriyle yapılan çalışma sonucu (100:17.5:13.5 çözgen sistemi); [M-Moleküler Baskılanmış polimer; N-Baskılanmamış polimer; S-Su].

Şekil 4.32’de verilen İTK’lar incelendiğinde stiren divinil benzen bazlı moleküler baskılanmış polimerlerin ve baskılanmamış polimerlerin benzer sonuçlar verdiği görülmektedir.

- 4-vinilpiridin-EGDMA – 300 mg polimer – D=1.4 cm – AST-4/AST-7/CG karışımı

4-Vinil Piridin-EGDMA bazlı polimerler öncelikle kloroform ile şartlanarak saf CG ile yüklenmiştir. Ancak bu polimerler de kloroform ile jelleştiğinden hiç akış sağlanamamıştır. Bunun üzerine *Astragalus* ekstresi metabolitlerinden AST-4, AST-7 ve CG karışımı hazırlanarak (30’ar mg/12 mL) %100 su ile şartlandırılan polimere yüklenmiştir. %100 sudan %100 metanole fraksiyonlar toplanmıştır.

Şekil 4.33 incelendiğinde Stiren DivinilBenzen polimerleri gibi 4-VP-EGDMA polimerlerinde de NIP ve MIP benzer sonuçlar vermiştir. Bu sebeple çalışmaların metakrilik asit polimerleriyle devam etmesine karar verilmiştir.

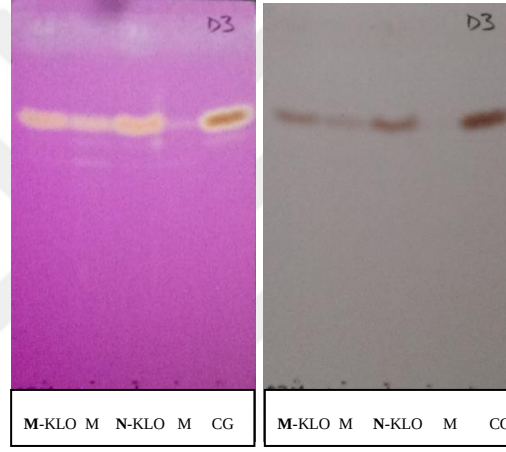


Şekil 4.33 4-Vinilpiridin EGDMA polimerleriyle yapılan çalışma sonucu (100:17.5:13.5 çözgen sistemi); [M-Moleküler Baskılanmış polimer; N-Baskılanmamış polimer; S-Su].

Çalışmalar, metakrilik asit polimerlerinin şişmesine çözüm olabileceği düşüncesiyle metakrilik asit monomerlerinin farklı polimerizasyon protokolleri kullanılarak sentezlenen polimerleri ile sürdürülmüştür. Bölüm 3.2.1 Çizelge 3.5 ve 3.6’da kullanılan protokoller verilmiştir.

- **D3-MIP/NIP – 150 mg polimer – D=1.4 cm – 0.5 mg CG/mL**

D3 polimerleri Bölüm 3.2.1.3 ve 3.2.1.4’te açıklanan 1:3:20 kalıp molekül/monomer/çapraz bağlayıcı protokolü ile sentezlenmişlerdir. Kolon kloroform ile şartlanmıştır. 500 mg/L konsantrasyonda 1 mL CG kloroform ile kolona uygulandıktan sonra kolon 10 mL kloroform ile yıkanmış ve 6 mL metanol ile elüsyon gerçekleştirilmiştir.

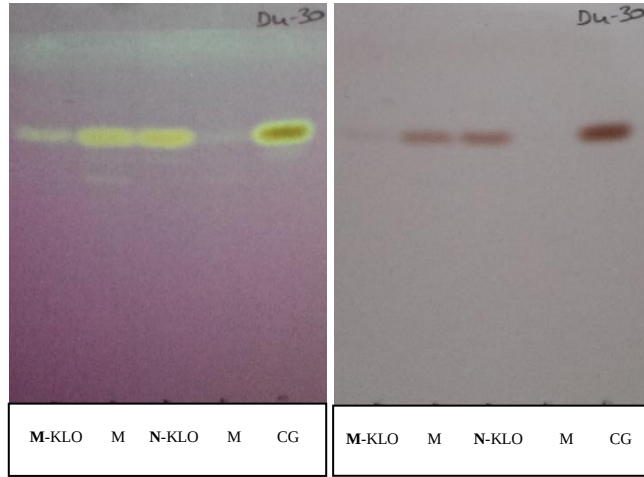


Şekil 4.34 D3-MIP ve NIP ile *Astragalus* hidroliz ekstresinden CG izolasyonu (100:17.5:13.5 çözgen sistemi); [M-Moleküler Baskılanmış polimer; N-Baskılanmamış polimer; KLO-Kloroform; M-Metanol].

Şekil 4.34’te verilen İTK’lar ve Şekil B.14-B.17’de verilen HPLC sonuçları incelenerek gerekli hesaplar yapıldığında D3-MIP’in geri kazanım oranının %23.20, D3-NIP’in ise %2.25 olduğu ortaya çıkmaktadır.

- **D4-30-MIP/NIP – 150 mg polimer – D=1.4 cm – 0.5mg CG/mL**

D4-30 polimerleri Bölüm 3.2.1.3 ve 3.2.1.4’te açıklanan 1:4:30 kalıp molekül/monomer/çapraz bağlayıcı protokolü ile sentezlenmişlerdir. Kolon kloroform ile şartlanmıştır. 500 mg/L CG 1 mL kloroform ile kolona uygulandıktan sonra kolon 10 mL kloroform ile yıkanmış ve 6 mL metanol ile elüe edilmiştir.

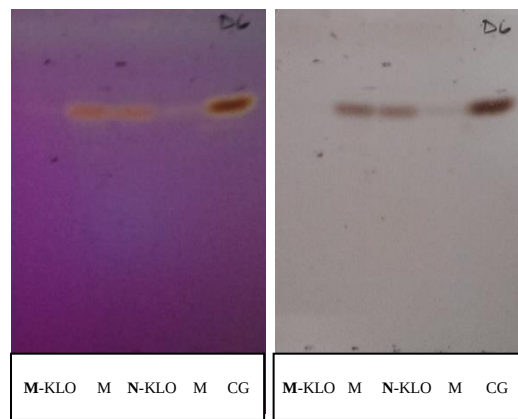


Şekil 4.35 D4-30-MIP ve NIP ile *Astragalus* hidroliz ekstresinden CG izolasyonu (100:17.5:13.5 çözgen sistemi); [**M**-Moleküler Baskılanmış polimer; **N**-Baskılanmamış polimer; KLO-Kloroform; M-Metanol].

Şekil 4.35 incelendiğinde D4-30-MIP'in NIP'e göre daha iyi bir ayrım yaptığı görülmektedir. Şekil B.22-B.25'deki HPLC kromatogramları incelenerek gerekli hesaplar yapıldığında ise D4-30-MIP'in %82.81, NIP'in ise %0.47'lik bir geri kazanım oranına sahip olduğu anlaşılmaktadır.

- D6-MIP/NIP – 150 mg polimer – D=1.4 cm – 0.5mg CG/mL

D6 polimerleri Bölüm 3.2.1.3 ve 3.2.1.4'te açıklanan 1:6:20 kalıp molekül/monomer/çapraz bağlayıcı protokolü ile sentezlenmişlerdir. Kolon kloroform ile şartlanmıştır. 500 ppm CG 1 mL kloroform ile kolona uygulandıktan sonra kolon 10 mL kloroform ile yıkanmış ve 6 mL metanol ile elüe edilmiştir.



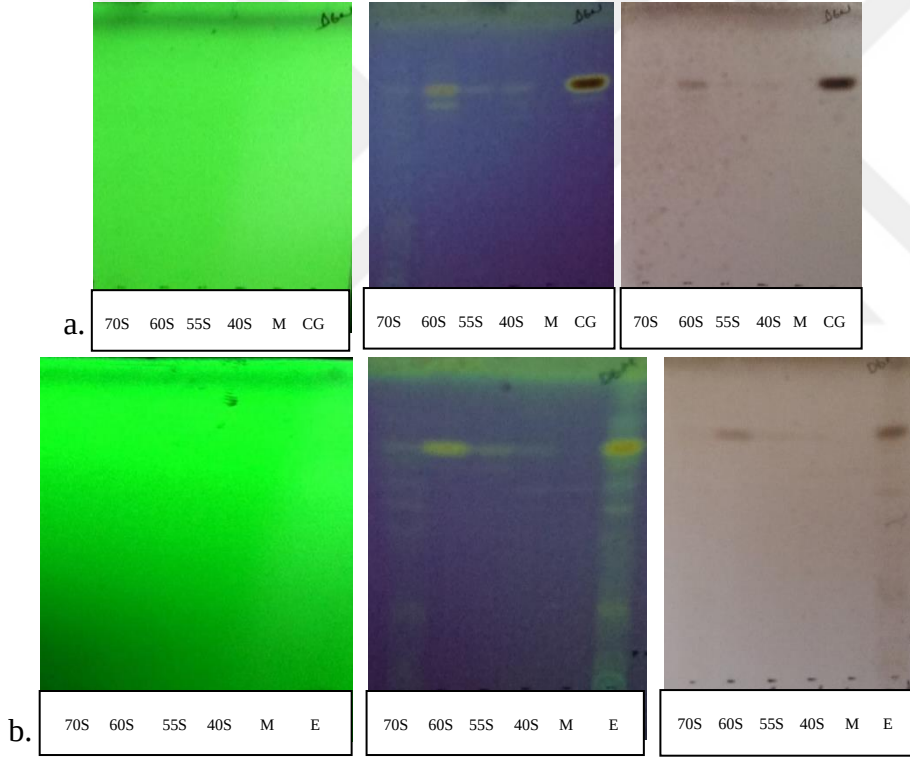
Şekil 4.36 D6-MIP ve NIP ile *Astragalus* hidroliz ekstresinden CG izolasyonu (100:17.5:13.5 çözgen sistemi); [**M**-Moleküler Baskılanmış polimer; **N**-Baskılanmamış polimer; KLO-Kloroform; M-Metanol].

Şekil 4.36'da verilen İTK'lar ve Şekil B.18-B.21'te verilen HPLC kromatogramları incelenerek gerekli hesaplar yapıldığında D6-MIP'in geri kazanım oranının %99.26

D6-NIP'in ise %10.24 olduğu anlaşılmaktadır. 1 cm çapında, 1 cm yüksekliğinde kolonlarda, 0.5 mg CG/mL yükleme ve 150 mg D4-MIP ile yapılan çalışmalarda %97.41 CG geri kazanım, CG baskılanmayan eş polimerinde (D4-NIP) ise %14.79 geri kazanım elde edilmiştir. D6 polimeriyle MIP'te elde edilen bu yüksek geri kazanım oranı üzerine D6 polimerinin *Astragalus* hidroliz ekstresi ile performansının belirlenmesi için bir deneme yapılması kararlaştırılmıştır.

- D6-MIP/NIP – 1 g polimer – D=1.8 cm – *Astragalus* hidroliz ekstresi

Kolon 70:30 su:AcN sistemi ile şartlanmıştır. 10 mg/1000µL hidroliz ekstresi aynı sistemle kolona uygulandıktan sonra 20 mL 70:30, 20 mL 60:40, 20 mL 55:45 su:AcN sistemleri ile yıkama, 20 mL 40:60 su:AcN ve 20 mL metanol sistemleri ile elüsyon gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.37 a. D6-NIP b. D6-MIP ile *Astragalus* hidroliz ekstresinden CG izolasyonu (100:17.5:13.5 çözgen sistemi); [E-Ekstre; S-Su; M-Metanol].

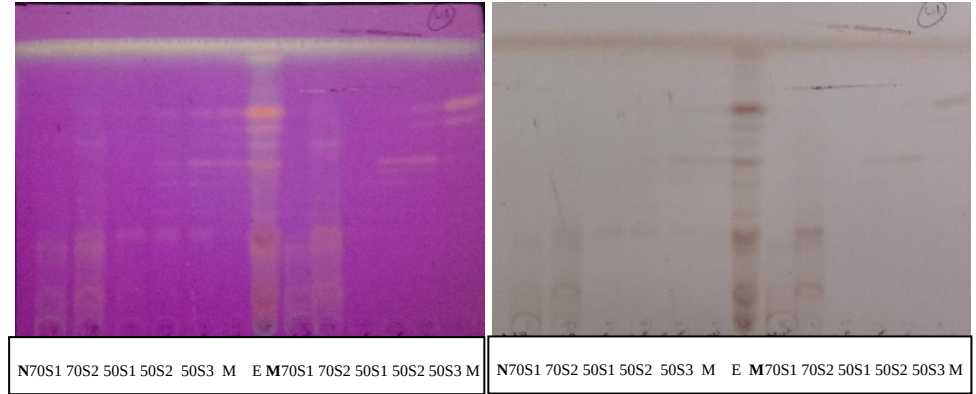
Şekil 4.37'de çalışmanın İTK'ları Şekil B.32-B.33'te de HPLC kromatogramları verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde D6 polimerinin D4 polimeri için uygun bulunan protokole tam olarak uyum sağlamadığı MIP ile NIP sonuçlarının birbirine çok yakın olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar ışığında ölçek büyütme işlemlerinin D4 polimeri ile gerçekleştirilmesi kararlaştırılmıştır.

4.5 Ölçek Büyütme

Ölçek büyütme çalışmaları Bölüm 3.2.4'te açıklandığı gibi kolondaki basınç düşmesi ve lineer akış hızı sabit tutularak gerçekleştirilmiştir. Çizelge 3.7'de hesaplar sonunda ortaya çıkan kolon çapları verilmiştir. Ancak metakrilik asit polimerlerinin şişerek jelleşmesi her ölçekte tekrar iyileştirme çalışmaları yapılmasını gerektirmiştir. Katı faz ekstraksiyonunda yaşanan kanallaşma probleminin üstesinden gelinmesi adına büyük ölçek çalışmalarında yüklemelerin seyreltilerek daha yüksek hacimde yapılması uygun yaklaşım olarak benimsenmiştir. Çalışmalar, yükleme miktarının ve kolondan alınan yıkama ve elüsyon fraksiyonlarının hacimlerinin araştırılarak iyileştirilmesi ile sürdürülmüştür.

- **D4-MIP/NIP – 2.5 g polimer – D=2.7 cm – *Astragalus* hidroliz ekstresi**

Kolon 70:30 su:AcN sistemi ile şartlanmıştır. 10 mg/mL (1+1 mL seyreltilerek) hidroliz ekstresi aynı sistemle kolona uygulandıktan sonra kolon, 20 mL 70:30, 20 mL 70:30, 3 kere 10'ar mL 50:50 su:AcN sistemleri ile yıkanmış ve en son 10 mL meoh ile elüe edilmiştir.

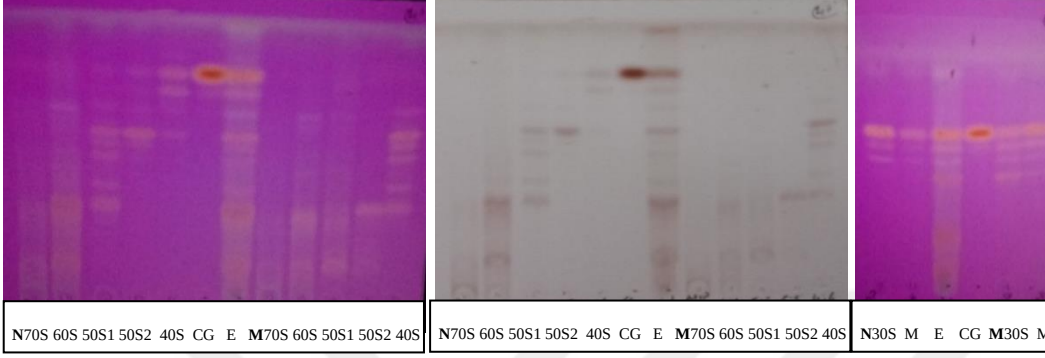


Şekil 4.38 D4-MIP ve NIP ile *Astragalus* hidroliz ekstresinden CG izolasyonu (100:17.5:13.5 çözgen sistemi); [M-Moleküler Baskılanmış polimer; N-Baskılanmamış polimer; S-Su; E-Ekstre; M-Metanol].

Şekil 4.38 incelendiğinde NIP ile ön yıkama fraksiyonlarında CG kolondan ayrılırken MIP'te CG içeren majör fraksiyon elüsyon fraksiyonudur. Ancak elüsyon fraksiyonunda CG ile beraber bir takım kirlilikler mevcuttur. İyileştirme çalışmalarının devam ettirilmesi kararlaştırılmıştır.

- **D4-MIP/NIP – 2.5 g polimer – D=2.7 cm – *Astragalus* hidroliz ekstresi**

Kolon 70:30 su:AcN sistemi ile şartlanmıştır. 25 mg/mL hidroliz ekstresi (2+2 mL seyreltilerek) aynı sistemle kolona uygulandıktan sonra kolon, 20 mL 70:30, 10 mL 60:40, 10 mL 50:50, 10 mL 50:50, 10 mL 40:60, 10 mL 30:70 su:AcN sistemleri ile yıkanmış ve en son 10 mL meoh elüe edilmiştir.



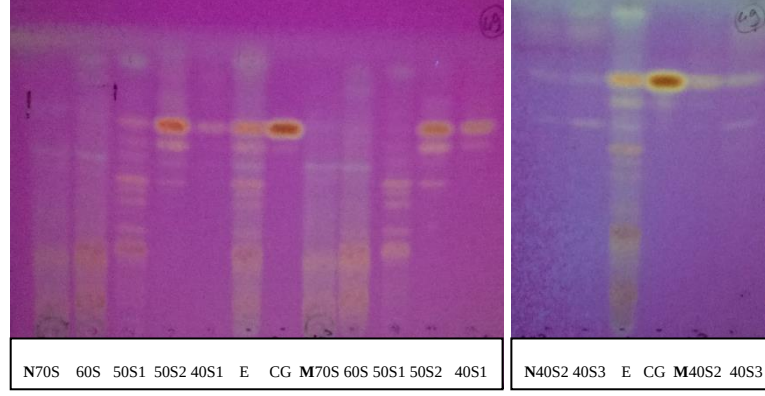
Şekil 4.39 D4-MIP ve NIP ile *Astragalus* hidroliz ekstresinden CG izolasyonu (100:17.5:13.5 çözgen sistemi); [**M**-Moleküler Baskılanmış polimer; **N**-Baskılanmamış polimer; S-Su; E-Ekstre; M-Metanol].

Şekil 4.39 incelendiğinde yükleme miktarındaki artışın negatif etkisi açıkça görülmektedir. Yıkama fraksiyonları incelendiğinde NIP'te yüksek miktarda CG ayrımı görülmektedir. MIP'te ise CG'nin tamamı metanol fraksiyonunda elde edilmiştir. Ancak halen bir miktar kirlilik mevcuttur. İyileştirme çalışmalarının devam ettirilmesi kararlaştırılmıştır.

- **D4-MIP/NIP – 2.5 g polimer – D=2.7 cm – *Astragalus* hidroliz ekstresi**

Kolon 70:30 su:AcN sistemi ile şartlanmıştır. 50 mg/mL hidroliz ekstresi (2+2 mL seyreltilerek) aynı sistemle kolona uygulandıktan sonra kolon, 20 mL 70:30, 10 mL 60:40, 2 kere 20'şer mL 50:50 su:AcN sistemleri ile yıkanmış ve 3 kere 10'ar mL 40:60 su:AcN sistemi ile elüe edilmiştir.

Şekil 4.40 incelendiğinde yükleme miktarındaki artış sebebiyle MIP'in CG kapasitesini doldurduğu ve 50:50 fraksiyonunda MIP'te beklenilenden daha fazla CG elüe edildiği gözlenmektedir. Ancak NIP'te CG'nin büyük çoğunluğu 50:50 fraksiyonunda alınmıştır ve 40:60 elüsyon fraksiyonları karşılaştırıldığında MIP'in CG'ye olan seçici özelliği ortadadır.



Şekil 4.40 D4-MIP ve NIP ile *Astragalus* hidroliz ekstresinden CG izolasyonu (100:17.5:13.5 çözgen sistemi); [M-Moleküler Baskılanmış polimer; N-Baskılanmamış polimer; S-Su; E-Ekstre].

Çizelge 4.6’da 2.5 g polimerle gerçekleştirilen çalışmaların bir özeti verilmiştir. Elde edilen bilgiler ışığında ölçeğin bir basamak daha büyütülmesi kararlaştırılmıştır. Bölüm 3.2.4 Çizelge 3.7’de verilen ölçek büyütme basamaklarına göre çalışmalar sürdürülmüştür.

Çizelge 4.6 2.5 g polimer çalışmaları.

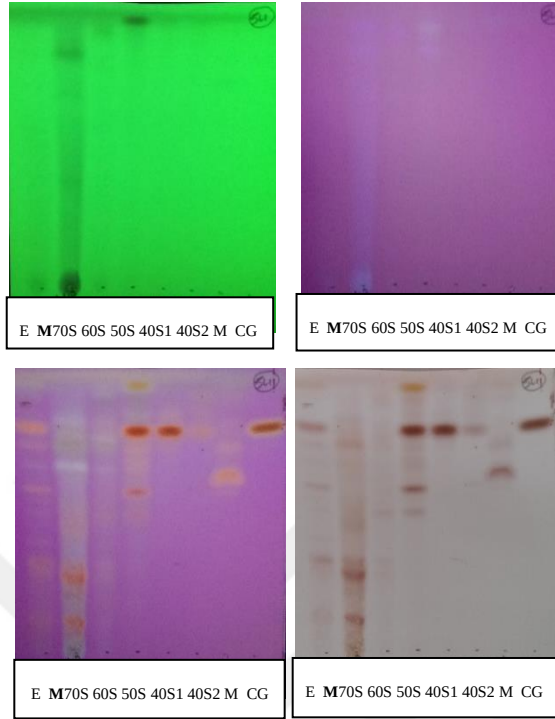
Yükleme	Şartlama	Yıkama	Elüsyon	Yapılan İyileştirme Çalışması
<i>Astragalus</i> hidroliz ekstresi (10 mg/1000 µL)	70:30 su:AcN	70:30, 50:50 su:AcN	meoh	Dolgu maddesi miktarı ve kolon çapı artışı
<i>Astragalus</i> hidroliz ekstresi (25 mg/1000 µL)	70:30 su:AcN	70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70 su:AcN	meoh	Yükleme miktarı artışı ve yıkama fraksiyon hacimleri
<i>Astragalus</i> hidroliz ekstresi (50 mg/1000 µL)	70:30 su:AcN	70:30, 60:40, 50:50 su:AcN	40:60 su:AcN	Yükleme miktarı artışı ve yıkama fraksiyon hacimleri

D4-MIP – 10 g polimer – D=4 cm – *Astragalus* hidroliz ekstresi

Kolon 70:30 su:AcN sistemi ile şartlanmıştır. 250 mg/mL (4 mL’ye seyreltilerek) hidroliz ekstresi aynı sistemle kolona uygulandıktan sonra kolon, 80 mL 70:30, 50 mL 60:40, 80 mL 50:50 su:AcN sistemleri ile yıkanmış ve iki kere 50’şer mL 40:60 kolon su:AcN sistemi ile elüe edilmiştir.

Şekil 4.41 incelendiğinde ölçek büyütmenin ayırmadaki etkisi açıktır. Polimer miktarının 4 katına çıkmasıyla kolonda yaşanan kanallaşma gibi sorunlar ortadan kalktığı için daha rahat bir ayırım yapılabilmiştir. Ancak 50:50 su:AcN

fraksiyonunda kolondan alınan CG miktarı çok fazla olduğundan iyileştirme denemelerinin devam ettirilmesi kararlaştırılmıştır.

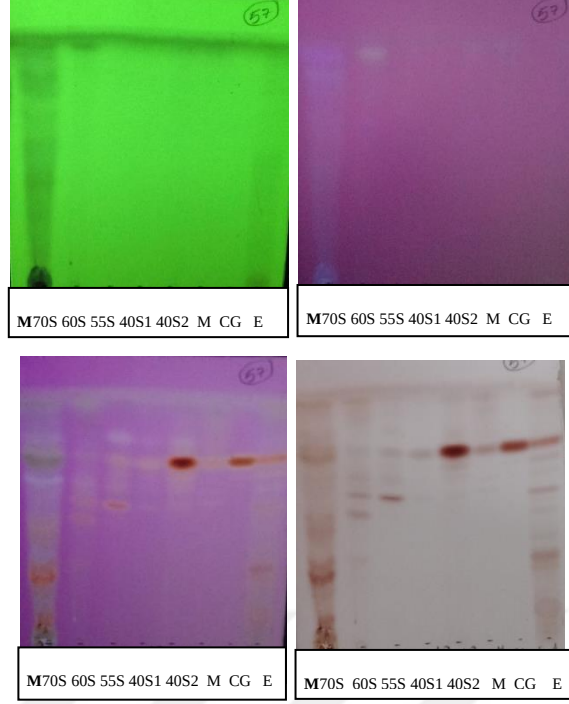


Şekil 4.41 D4-MIP ile *Astragalus* hidroliz ekstresinden CG izolasyonu (100:17.5:13.5 çözgen sistemi); [M-Moleküler Baskılanmış polimer; S-Su; E-Ekstre; M-Metanol].

- D4-MIP – 10 g polimer – D=4 cm – *Astragalus* hidroliz ekstresi

Kolon 70:30 su:AcN sistemi ile şartlanmış. 250 mg/mL (4 mL'ye seyreltilerek) hidroliz ekstresi aynı sistemle kolona uygulandıktan sonra 80 mL 70:30, 80 mL 60:40, 50 mL 45:55, 80 (20+60) mL 40:60 Su:ACN sistemleri ve 50 mL metanol ile fraksiyonlama gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.42'de görüldüğü gibi ilk 40:60 fraksiyonunun miktarı daha az tutulduğunda daha majör bir CG fraksiyonu elde edilebilmektedir. Ancak *Astragalus* ekstresi çok miktarda yapı olarak benzer moleküller içerdiğinden D4-MIP her ne kadar CG'ye seçimli bir polimer de olsa yükleme miktarı arttıkça CG'ye çok benzer yapıları da kirlilik olarak aynı fraksiyonda beraberinde getirmektedir. Şekil B.34'te verilen HPLC kromatogramı incelenerek gerekli hesaplar yapıldığında elüsyon fraksiyonu olan 40:60(2) fraksiyonunun %70 saflığa ve %70 geri kazanım oranına sahip olduğu ortaya çıkmıştır.

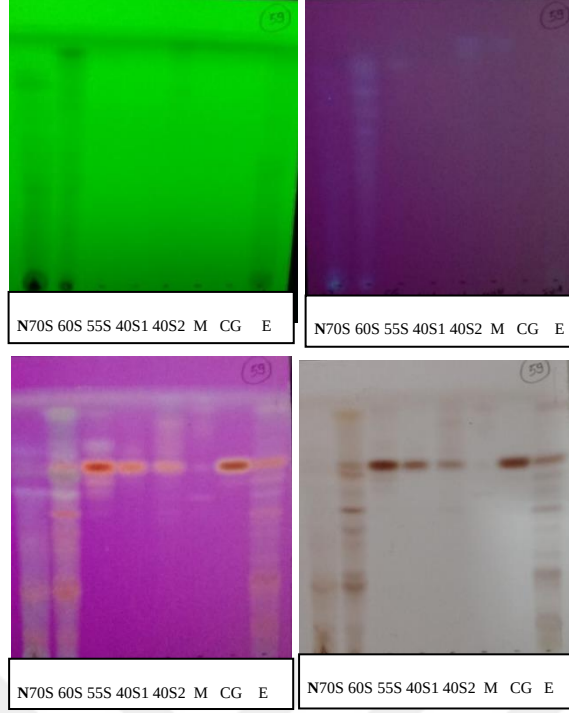


Şekil 4.42 D4-MIP ile *Astragalus* hidroliz ekstresinden CG izolasyonu (100:17.5:13.5 çözgen sistemi); [M-Moleküler Baskılanmış polimer; S-Su; E-Ekstre; M-Metanol].

- **D4-NIP – 10 g polimer – D=4 cm – *Astragalus* hidroliz ekstresi**

Kolon 70:30 su:AcN sistemi ile şartlanmıştır. 250 mg/mL (4 mL'ye seyreltilerek) hidroliz ekstresi aynı sistemle kolona uygulandıktan sonra 80 mL 70:30, 80 mL 60:40, 50 mL 45:55, 80 (20+60) mL 40:60 su:AcN sistemleri ve 50 mL metanol ile fraksiyonlama gerçekleştirilmiştir.

Baskılanmamış polimerde CG, 60:40 su:AcN fraksiyonundan itibaren kolondan elüe edilmektedir (Şekil 4.43). Bu durumda MIP'in NIP'e göre CG'ye daha fazla seçimli olduğu aşikardır. Şekil B.35-B.36'da bu çalışmaya ait HPLC kromatogramları verilmiştir. Elüsyon fraksiyonu olan 40:60(2) fraksiyonu ile gerekli hesaplar yapıldığında %7.71 geri kazanım oranı ve %61.04 saflık tespit edilmiştir.



Şekil 4.43 D4-NIP ile *Astragalus* hidroliz ekstresinden CG izolasyonu (100:17.5:13.5); [N-Moleküler Baskılanmamış polimer; S-Su; E-Ekstre; M-Metanol].

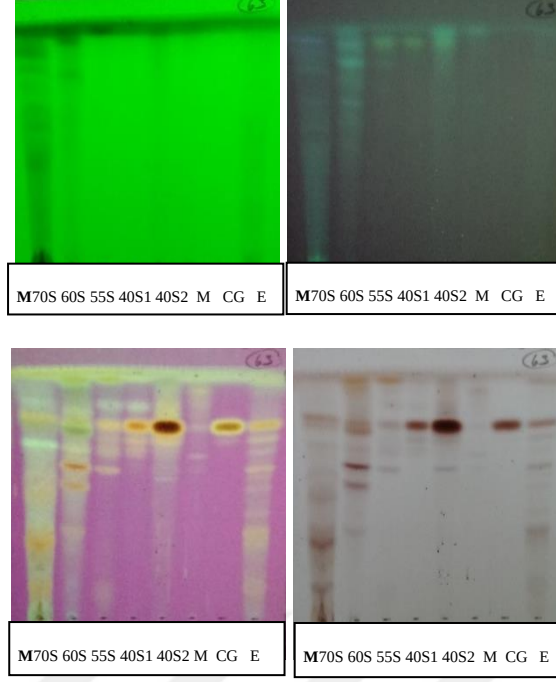
Çizelge 4.7’de 10 g polimer ile yapılan iyileştirme çalışmalarının bir özeti verilmiştir. Bu noktada asıl hedeflenen büyük ölçek çalışmalar için ölçek büyütme hesapları yapılmıştır. Hesaplamalar sonucu ortaya çıkan ve Çizelge 3.7’de verilen boyutlardaki kolonlar ile büyük ölçek çalışmaları devam ettirilmiştir.

Çizelge 4.7 10 g polimer ile yapılan çalışmalar.

Yükleme	Şartlama	Yıkama	Elüsyon	Yapılan İyileştirme Çalışması
<i>Astragalus</i> hidroliz ekstresi (250 mg/1000 µL)	70:30 su:AcN	70:30, 60:40, 50:50 su:AcN	40:60 su:AcN	Dolgu maddesi miktarı ve kolon çapı artışı
<i>Astragalus</i> hidroliz ekstresi (250 mg/1000 µL)	70:30 su:AcN	70:30, 60:40, 50:50 su:AcN	40:60 su:AcN, meoh	Yıkama fraksiyon hacimleri

- D4-MIP – 100 g polimer – D=12 cm – *Astragalus* hidroliz ekstresi

Kolon 70:30 su:AcN sistemi ile şartlanmıştır. 1 g/mL (40 mL’ye seyreltilerek) hidroliz ekstresi aynı sistemle kolona uygulandıktan sonra 800 mL 70:30, 800 mL 60:40, 500 mL 45:55, 800 (200+600) mL 40:60 su:AcN ve 500 mL metanol ile fraksiyonlama gerçekleştirilmiştir.

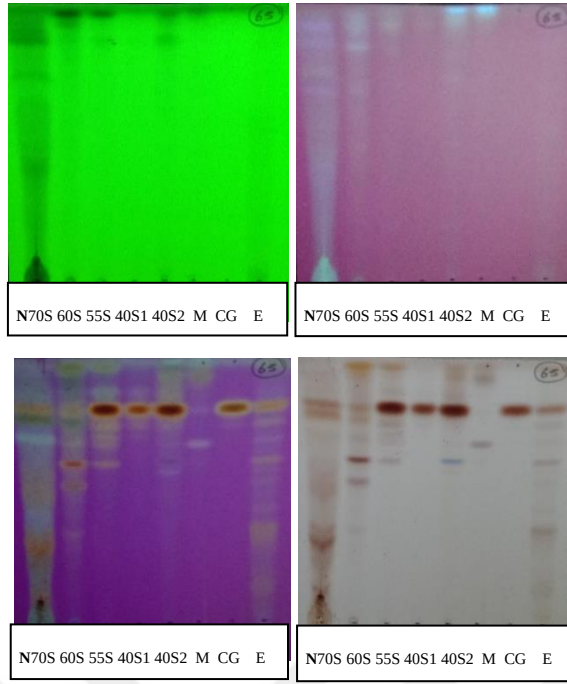


Şekil 4.44 D4-MIP ile *Astragalus* hidroliz ekstresinden CG izolasyonu (100:17.5:13.5); [M-Moleküler Baskılanmış polimer; S-Su; E-Ekstre; M-Metanol].

Şekil 4.44'te D4-MIP için 100 g polimerle ölçek büyütme sonunda elde edilen ilk İTK sonuçları verilmiştir. 10 g sonuçları ile benzer sonuçlar alınmıştır. Bu durumda iyileştirme çalışmalarının sonuç verdiği, ölçek büyütme çalışmaları sırasında karşılaşılan kanallaşma, tıkanma, basınç düşmesi sorunlarının aşılarda tekrarlanabilir sonuçlar elde edilebildiği söylenebilmektedir. Çalışmanın HPLC kromatogramları Şekil B.37-B.38'de verilmiştir. Kolona daha fazla ekstre uygulamanın getirdiği bir sonuç olarak elde edilen CG fraksiyonunun geri kazanım oranında artış tespit edilmiştir. Yapılan hesaplarda elüsyon fraksiyonu olan 40:60(2) fraksiyonu için %85.78'lik geri kazanım %49.32'lik saflık elde edilmiştir.

- D4-NIP – 100 g polimer – D=12 cm – *Astragalus* hidroliz ekstresi

Kolon 70:30 su:AcN sistemi ile şartlanmıştır. 1 g/mL (40 mL'ye seyreltilerek) hidroliz ekstresi aynı sistemle kolona uygulandıktan sonra 800 mL 70:30, 800 mL 60:40, 500 mL 45:55, 1000 (200+800) mL 40:60 su:AcN ve 500 mL metanol ile fraksiyonlama gerçekleştirilmiştir.

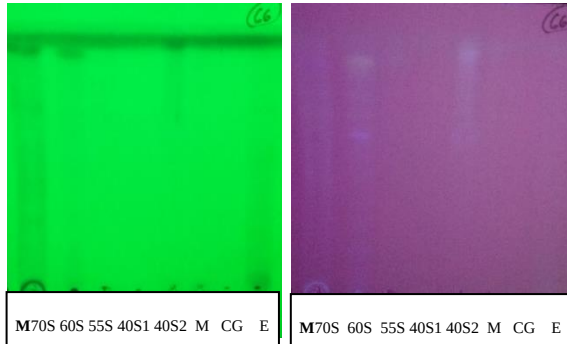


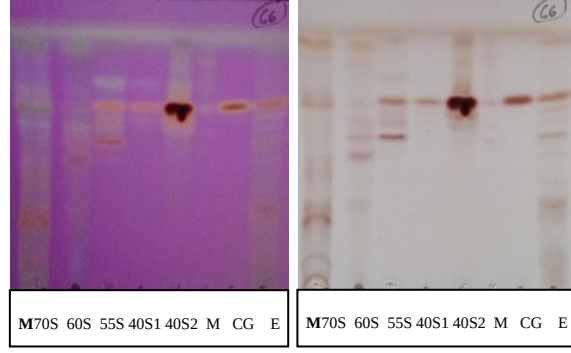
Şekil 4.45 D4-NIP ile *Astragalus* hidroliz ekstresinden CG izolasyonu (100:17.5:13.5); [N-Moleküler Baskılanmamış polimer; S-Su; E-Ekstre; M-Metanol].

NIP için de ölçek büyütme çalışmaları 10 g çalışmalarına benzer şekilde sonuçlandırılmıştır (Şekil 4.45). Şekil B.39-B.40'da verilen HPLC kromatogramları ile gerekli hesaplar yapıldığında elüsyon fraksiyonu olan 40:60(2) fraksiyonu için %41.29 geri kazanım oranı %17.74 saflık tespit edilmiştir. 10 g çalışmasıyla karşılaştırıldığında, MIP'te olduğu gibi NIP'te de geri kazanımın arttığı ancak saflığın azaldığı ortaya çıkmaktadır.

- D4-MIP – 100 g polimer – D=12 cm – *Astragalus* hidroliz ekstresi

Kolon 70:30 su:AcN sistemi ile şartlanmıştır. 1 g/mL (40 mL'ye seyreltilerek) hidroliz ekstresi aynı sistemle kolona uygulandıktan sonra 800 mL 70:30, 800 mL 60:40, 500 mL 45:55, 1000 (100+900) mL 40:60 su:AcN ve 500 mL metanol ile fraksiyonlama gerçekleştirilmiştir.



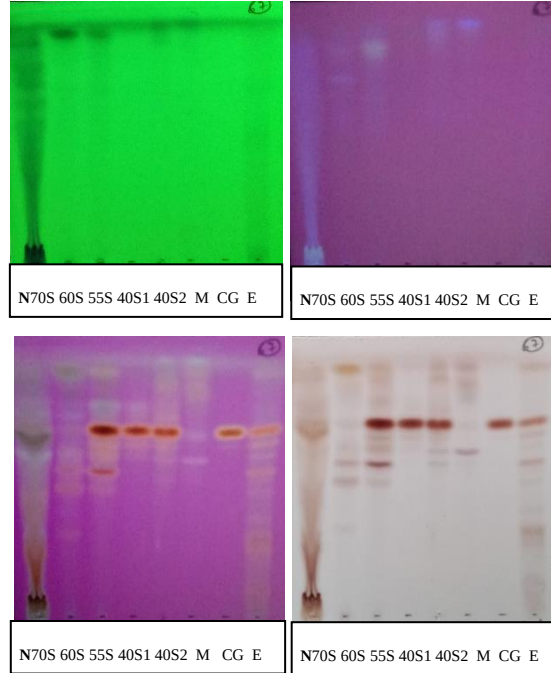


Şekil 4.46 D4-MIP ile *Astragalus* hidroliz ekstresinden CG izolasyonu (100:17.5:13.5); [M-Moleküler Baskılanmış polimer; S-Su; E-Ekstre; M-Metanol].

Kolonda daha az CG kaybı sağlayabilmek adına 40:60(1) no'lu fraksiyonun miktarı düşürülerek yapılan bu çalışmada alınan İTK sonuçları Şekil 4.46'da, HPLC sonuçları Şekil B.41'de verilmiştir. Yapılan hesaplamalar sonucunda elüsyon fraksiyonu olan 40:60(2) fraksiyonunun %86.78 geri kazanım oranına %52.64 saflığa sahip olduğu ortaya konmuştur.

- D4-NIP – 100 g polimer – D=12 cm – *Astragalus* hidroliz ekstresi

Kolon 70:30 su:AcN sistemi ile şartlanmıştır. 1 g/mL (40 mL'ye seyreltilerek) hidroliz ekstresi aynı sistemle kolona uygulandıktan sonra 800 mL 70:30, 800 mL 60:40, 500 mL 45:55, 1000 (100+900) mL 40:60 su:AcN ve 500 mL metanol ile fraksiyonlama gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.47 D4-NIP ile *Astragalus* hidroliz ekstresinden CG izolasyonu (100:17.5:13.5); [N-Moleküler Baskılanmamış polimer; S-Su; E-Ekstre; M-Metanol].

Bu çalışmada alınan İTK sonuçları Şekil 4.47’de, HPLC sonuçları Şekil B.42’de verilmiştir. Elüsyon fraksiyonu olan 40:60(2) fraksiyonu %41.85 geri kazanım oranına ve %42.44 saflığa sahiptir.

Çizelge 4.8’de 100g polimer ile yapılan çalışmaların koşulları sunulmuştur.

Çizelge 4.8 100 g polimer ile yapılan iyileştirme çalışmaları.

Yükleme	Şartlama	Yıkama	Elüsyon	Yapılan İyileştirme Çalışması
<i>Astragalus</i> hidroliz ekstresi (1 g/1 mL)	70:30 su:AcN	70:30, 60:40, 45:55 su:AcN	40:60 su:AcN, meoh	Dolgu maddesi miktarı ve kolon çapı artışı
<i>Astragalus</i> hidroliz ekstresi (1 g/1 mL)	70:30 su:AcN	70:30, 60:40, 45:55 su:AcN	40:60 su:AcN, meoh	Yıkama fraksiyon hacimleri

Metakrilik asit bazlı D4 polimerinin, ticari olarak satılan ve triterpen izolasyonlarında kullanımı kanıtlanan D101 polimeri ile karşılaştırılması kararlaştırılmıştır (Zhang et al., 2012).

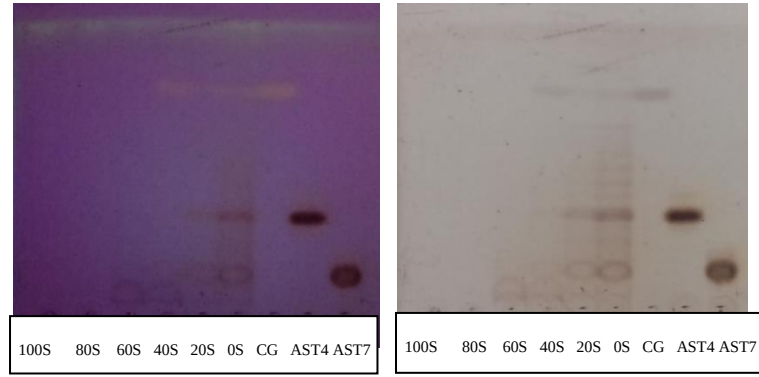
4.6 Ticari Polimer Denemeleri

Bölüm 3.2.3.3.2’de belirtildiği üzere çalışmada son olarak, sentezlenen polimerlerden CG’ye en yüksek seçimlilik gösteren polimer, ticari bir polimer olan D101 ile karşılaştırılmıştır.

- D101 – 1 g polimer – D=1.8 cm - *Astragalus* ekstresi

Kolon su ile şartlandıktan sonra 10 mg/500 µl ekstre kolona yüklenmiştir. Ardından %100 su, %80, %60, %40, %20 su:meoh ve %100 metanol fraksiyonları alınmıştır.

Şekil 4.48’de verilen İTK incelendiğinde, D101 polimerinin *Astragalus* ekstresinden CG izolasyonu için uygun olmadığı görülmüştür. D101 polimeri bu koşullar altında CG’yi kendisinden çok daha polar olan şekerli türevlerinden ayıramamıştır.



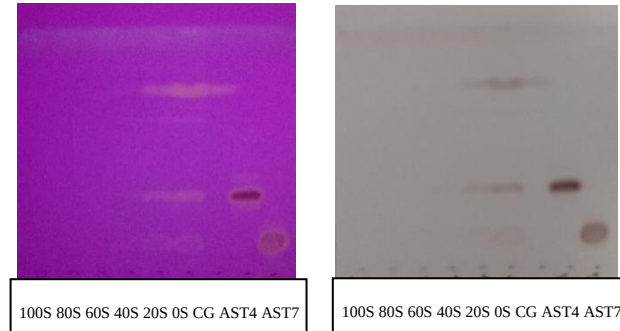
Şekil 4.48 *Astragalus* ekstresinden CG izolasyonu için kullanılan D101 polimeri (100:17.5:13.5 çözgen sistemi); [S-Su].

Yüklenen ekstrenin CG izolasyonunu baskılayabileceği düşüncesiyle yalnızca CG ve CG'nin şekerli türevleri olan AST-4 ve AST-7 karışımı ile deneme yapılması kararlaştırılmıştır (Şekil 4.48).

- D101 – 1 g polimer – D=1.8 cm – AST-4/AST-7/CG karışımı

Kolon su ile şartlandıktan sonra eşit konsantrasyonda hazırlanan triterpen karışımından 5 mg/500 µL yükleme gerçekleştirilmiştir. %100 su, %80, %60, %40, %20 su:meoh ve %100 metanol fraksiyonları alınmıştır.

Şekil 4.49'da görüleceği gibi D101 polimeri üç sikloartan türevini bu koşullar altında ayıramamıştır.

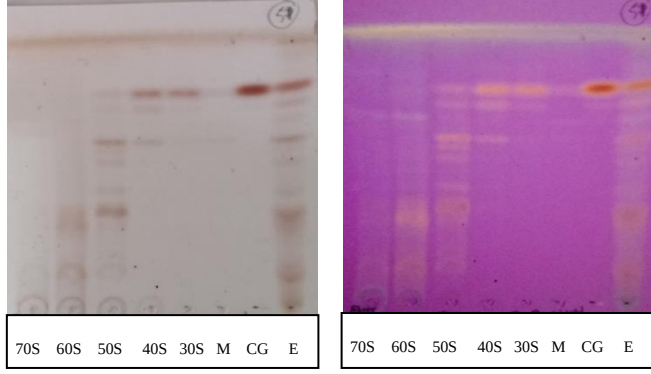


Şekil 4.49 AST-4/AST-7/CG karışımından CG izolasyonu için kullanılan D101 polimeri (100:17.5:13.5 çözgen sistemi); [S-Su].

Bir sonraki çalışmada D101 polimerinin D4 polimeri ile hacimce benzer olacağı bir deneme yapılması kararlaştırılmıştır.

- D101 – 10 g polimer – D=2.7 cm – H= 3 cm – *Astragalus* hidroliz ekstresi

D101, 70:30 su:AcN sistemiyle şartlandıktan sonra kolona 50 mg/mL (4 mL'ye seyreltilerek) hidroliz ekstresi yüklenmiştir. Ardından 70:30, 60:40, 50:50, 40:60 ve 30:70 su:AcN fraksiyonları toplanmıştır.



Şekil 4.50 *Astragalus* hidroliz ekstresinden CG izolasyonu için kullanılan D101 polimeri. (100:17.5:13.5 çözgen sistemi); [S-Su; E-Ekstre; M-Metanol].

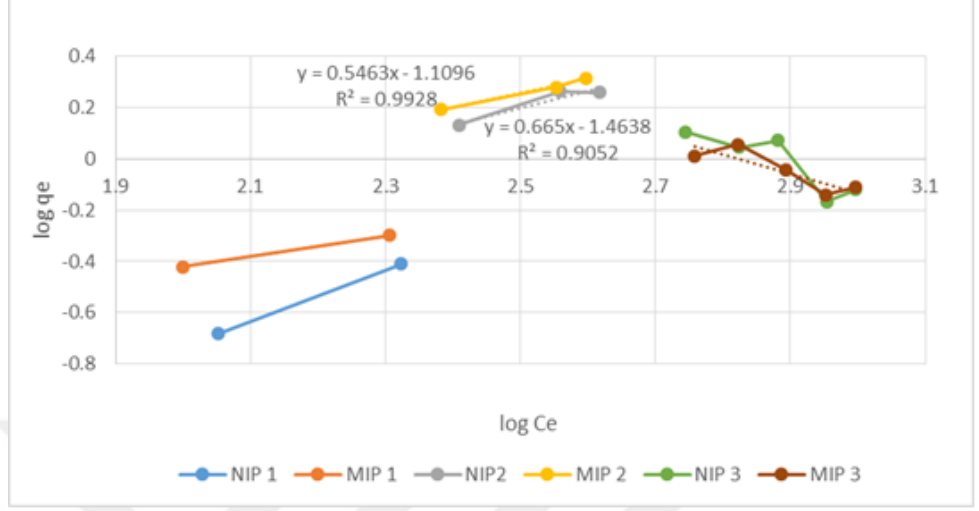
Şekil 4.50’de çalışma sonucunda elde edilen İTK’lar Şekil B.26-B.31’de HPLC kromatogramları verilmiştir. D101 polimerinin MIP ve NIP ile kıyasalanabilmesi için hacimce benzer olmaları ve benzer akış hızlarına sahip olmaları gerektiği düşünülerek bu deneme öncekilerin aksine vakumsuz gerçekleştirilmiştir. D101 polimerinin D4 polimeri ile hacimce benzer olabilmesi için 2.7 cm çaplı kolona 10g D101 polimeri yüklenmiştir. Böylece 2.5 g D4 polimeri içeren çalışmalardaki gibi 3 cm yüksekliğe sahip olunmuştur. Yapılan hesaplamalar sonucunda 30:70 (su:AcN) fraksiyonunun %100 saflığa %52.03 geri kazanım oranına sahip olduğu belirlenmiştir.

4.7 Adsorpsiyon İzotermi ve Adsorpsiyon Kinetiği

D4 polimeri için en iyi katı faz ekstraksiyonu koşullarında kolondaki adsorpsiyonun mekanizmasını ortaya çıkarmak için kinetik çalışmalar yürütülmüştür. Adsorpsiyon kinetiğinin araştırılabilmesi için farklı konsantrasyonlarda yükleme denemeleri yapılmıştır. Bölüm 3.2.3.2.1’de de açıklandığı gibi çalışma açılı karıştırıcıda 3 saat sürdürülmüştür. Sonuçlar Langmuir, Freundlich izotermi ile Scatchard eğrisine uyumlu bulunmuştur.

Şekil 4.51’de görüleceği üzere Freundlich izoterminde 3 farklı bölge bulunmaktadır. Grafik incelendiğinde 0.3-0.4-0.5 mg/mL konsantrasyonlarda Freundlich izotermi ile uyumlu sonuçlar elde edildiği görülmektedir. Grafik üzerinde eğilim çizgilerinin doğrusallığa uygunluğu ve denklemleri verilmiştir. Bölüm 2.3’te Freundlich eğrisinin denklemleri verilmiştir. Freundlich izotermi eğimlerinin 1’e eşit ya da küçük olması gerekmektedir. Freundlich izotermine göre yüzey ne kadar heterojen ise eğim o kadar sıfıra yakın olmaktadır.

Bu durumda, MIP için $1/n$ değeri 0.5463 olduğuna göre moleküler baskılanmış polimerin yüzeyinin NIP'e göre daha heterojen olduğu sonucuna varılabilmektedir (Çizelge 4.9).

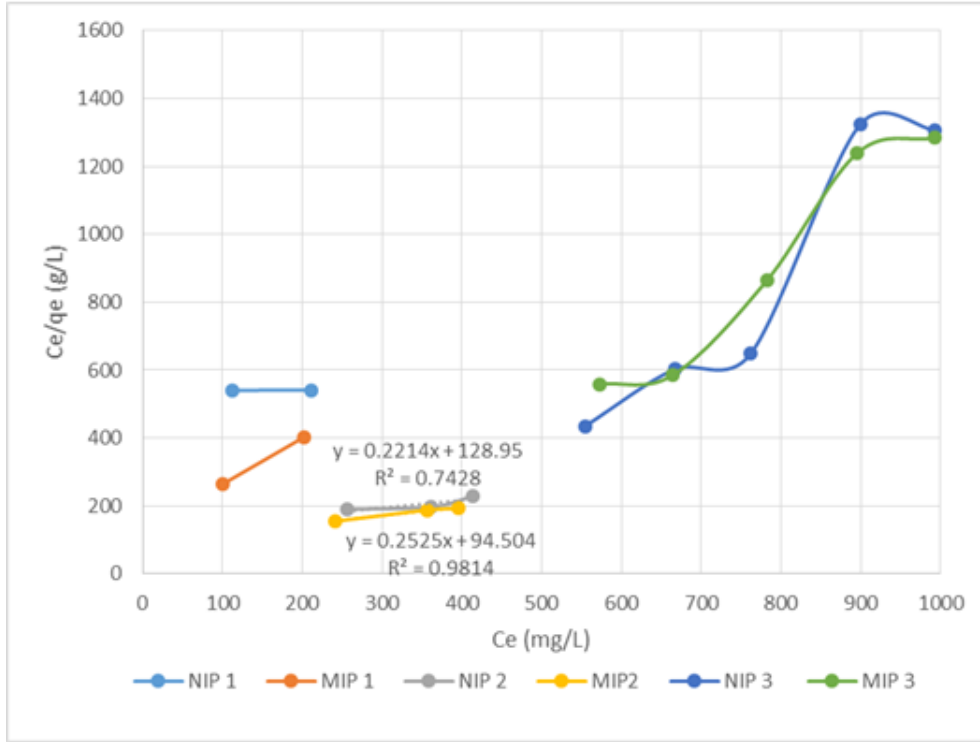


Şekil 4.51 D4 NIP ve MIP'in Freundlich izotermi ile değerlendirilmesi [q_e : 1 g adsorban tarafından adsorplanan madde miktarı C_e : çözülmüş maddenin denge konsantrasyonu].

Çizelge 4.9 Freundlich izotermi kullanılarak elde edilen sonuçlar.

	$1/n$	$\log K_F$	n	K_F
MIP	0.5463	-1.1096	1.830496	0.077696
NIP	0.6650	-1.4638	1.503759	0.034372

Langmuir izotermi ise homojen yüzeyleri daha iyi ifade eden bir izotermdir. Şekil 4.52 ve Çizelge 4.10-4.11 Langmuir izotermi için elde edilen sonuçları göstermektedir. Grafik üzerinde denklemler ve denklemlerin doğrusallığa uygunluğu verilmiştir.



Şekil 4.52 D4 NIP ve MIP'in Langmuir izotermi ile değerlendirilmesi [q_e : 1 g adsorban tarafından adsorplanan madde miktarı C_e : çözülmüş maddenin denge konsantrasyonu].

Çizelge 4.10 Langmuir izotermine göre elde edilen sonuçlar.

	$1/K_L$	a_L/K_L	K_L (L/g)	a_L (L/mg)	Q_{max} (mg/L)
MIP	94.504	0.2525	0.010582	0.002672	3.960396
NIP	128.950	0.2214	0.007755	0.001717	4.516712

Çizelge 4.11 Langmuir izotermine göre dağılma sabitlerini vermektedir. Bölüm 2.3'te de belirtildiği gibi Langmuir izotermine göre dağılımın elverişli olabilmesi için R_L değerinin 0 ile 1 arasında olması gerekmektedir. Değerler incelendiğinde hem NIP hem de MIP için Langmuir eğrisinin her konsantrasyonda elverişli olduğu görülmektedir. Konsantrasyonlar azaldıkça R_L değerinin 1'e yaklaştığı göze çarpmaktadır. Bu da dağılımın lineerleştiğini ortaya koymaktadır.

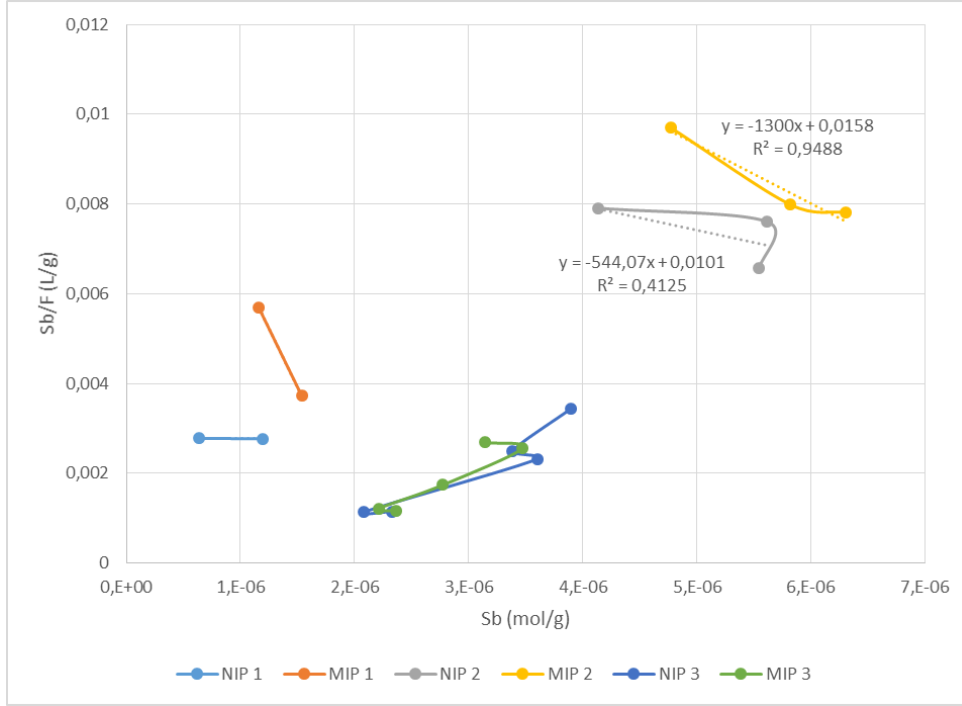
Çizelge 4.11 Langmuir izotermine göre seçilen 10 konsantrasyon (C) için R_L (dağılıma sabiti) hesabı.

C (mg/L)	MIP	NIP
0.1	0.745	0.820
0.2	0.630	0.708
0.3	0.511	0.620
0.4	0.428	0.538
0.5	0.405	0.514
0.6	0.365	0.473
0.7	0.333	0.437
0.8	0.306	0.407
0.9	0.283	0.380
1	0.263	0.357

Şekil 4.52'deki grafik incelendiğinde ise Langmuir izotermi için en uygun aralığın Freundlich'te olduğu gibi 0.3-0.4-0.5 mg/mL konsantrasyonları olduğu görülmektedir. Her iki izoterm için de uygun bir konsantrasyon aralığı olduğundan R^2 değerlerini karşılaştırdığımızda D4 polimerleri için Freundlich izotermine daha doğru bir yaklaşım olduğu ortaya çıkmaktadır. ($R^2=0.9928$) Bu durumda D4 polimerlerinin heterojen bir yüzey alanına sahip olduğu yargısına varılmaktadır.

Şekil 4.53'te ise D4 polimerinin Scatchard eğrisi yer almaktadır. Eğride görüleceği üzere hem NIP hem de MIP için 3 farklı alan mevcuttur. Freundlich ve Langmuir izotermine olduğu gibi Scatchard eğrisinde de en elverişli sonuçlar 0.3-0.4-0.5 mg/mL konsantrasyonlarında ortaya konulmuştur. Scatchard eğrisinin lineer olmaması heterojen bir yapıyı işaret etmektedir. Ancak üç farklı bölgenin yer alması, polimerin üç farklı bağlanma türüne sahip olduğu anlamına gelmektedir. Pek çok moleküler baskılamada bu tür bulgular saptanmıştır (Lopez et al., 2011). Eğri incelendiğinde maksimum bölge sayısı S_b 'nin MIP (12.154 $\mu\text{mol/g}$) için NIP'ten (18.564 $\mu\text{mol/g}$) daha küçük olduğu görülmektedir (Çizelge 4.12). Aynı şekilde ayrışma sabiti, K_{diss} de moleküler baskılanmış polimerlerde 769.231 $\mu\text{mol/L}$ ile NIP'e daha küçük bir değere sahiptir. Bu bulgular katı faz

ekstraksiyonu sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde, MIP'in daha yüksek seçimliliğe sahip bir polimer olduğuna işaret etmektedir.

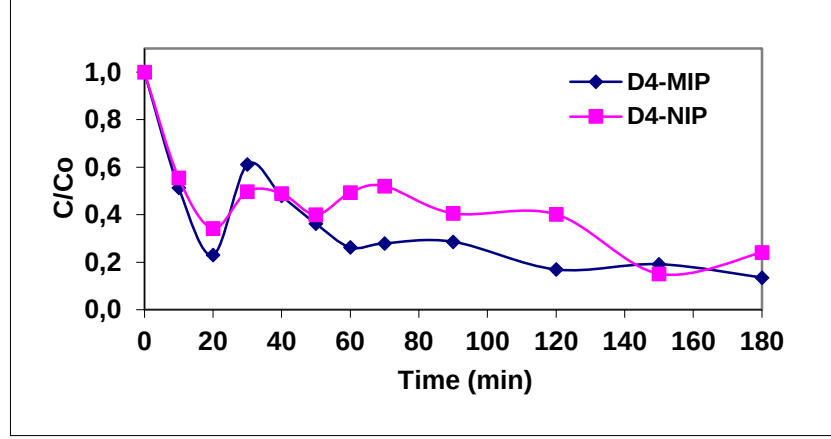


Şekil 4.53 D4 NIP ve MIP'in Scatchard eğrisi ile değerlendirilmesi (F: serbest CG, Sb: CG'nin adsorplandığı bölgeler).

Çizelge 4.12 Scatchard eğrisi ile yapılan hesaplamalar.

	$-1/K_{diss}$	Sb_{max}/K_{diss}	K_{diss} (mol/L)	Sb_{max} (mol/g)	Sb_{max} (μ mol/g)	K_{diss} (μ mol/L)
MIP	-1300	0.0158	0.00077	1.21538E-05	12.154	769.231
NIP	-544.07	0.0101	0.00184	1.85638E-05	18.564	1837.999

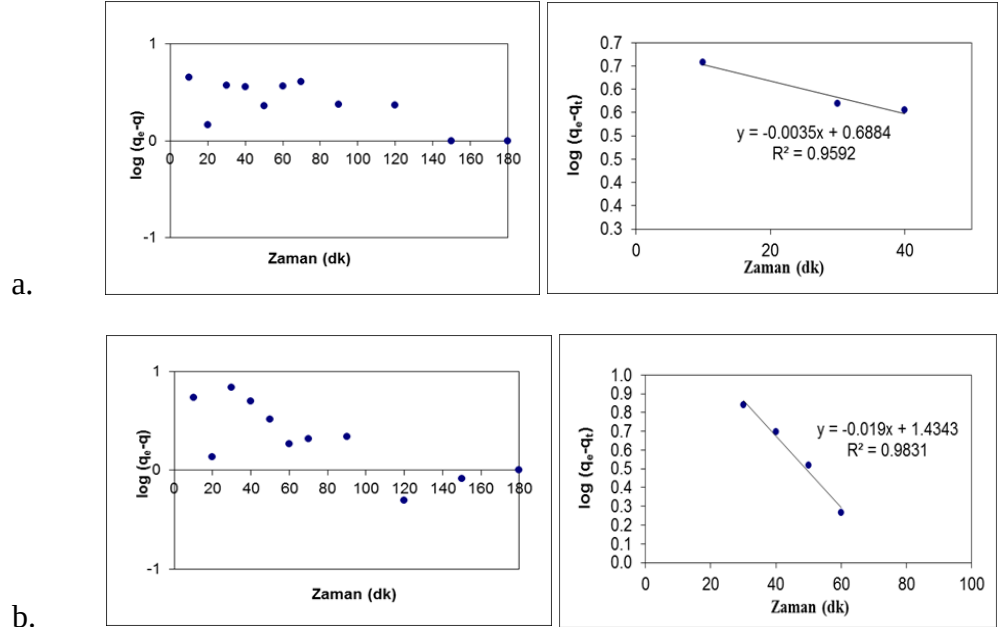
Zamana karşı adsorpsiyon kapasitesindeki değişimin izlenebilmesi için, 500 mg polimer ile 20 mL, 5 mg/50 mL konsantrasyonda CG bölüm 3.2.3.2.1'de açıklandığı şekilde muamele edilmiştir. 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 90, 120, 150 ve 180. dakikalarda örnek alınarak zamana karşı değişim izlenmiştir. Şekil 4.54'te verilen grafikte zamana bağlı olarak adsorpsiyon kapasitelerindeki değişim görülebilmektedir. D4 NIP ve MIP benzer bir eğilim içerisindedir. Grafik incelendiğinde; konsantrasyonun 3 saat sonunda platoya ulaşması, 3 saatlik sürenin bağlanma denemeleri için yeterli bir süre olduğunu ortaya koymaktadır.



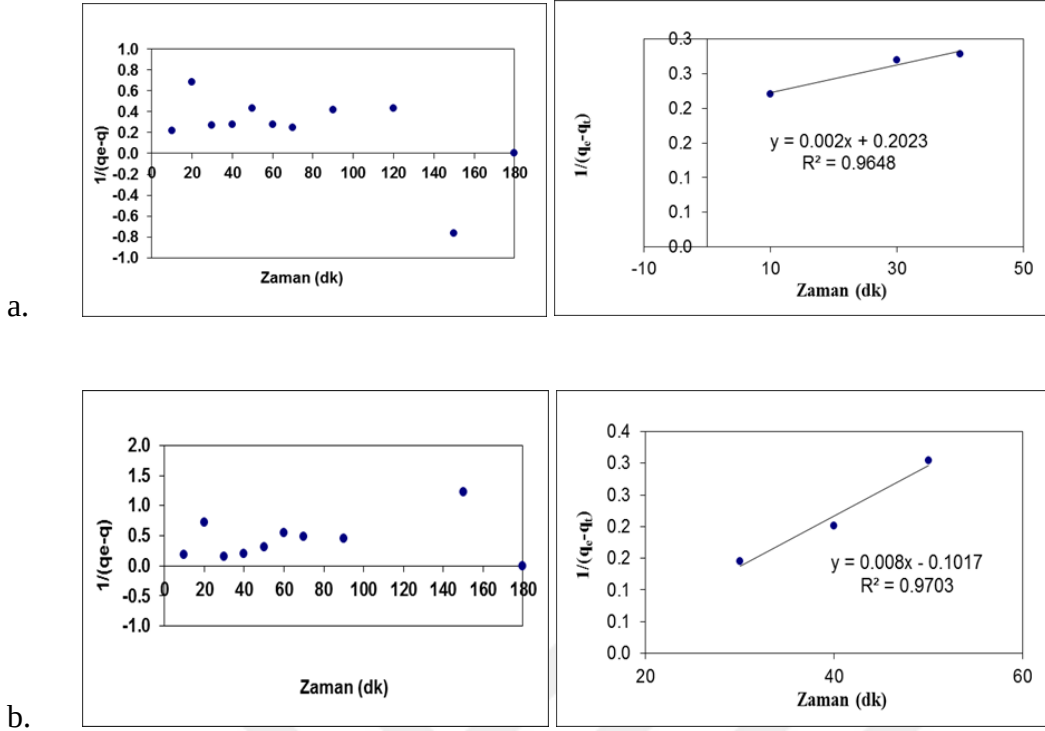
Şekil 4.54 D4-NIP ve MIP'in zamana bağlı olarak adsorpsiyon kapasitesindeki değişim (C: anlık konsantrasyon; C_0 : başlangıç konsantrasyonu).

Bu çalışmada elde edilen veriler bazı modellere uygulanarak belirlenen koşullar altındaki transfer mekanizmasının tespit edilmesi mümkün olabilmektedir (Bknz. Bölüm 2.6). Çalışma R^2 değerlerinin en uygun olduğu aralıklar için gerçekleştirilmiştir.

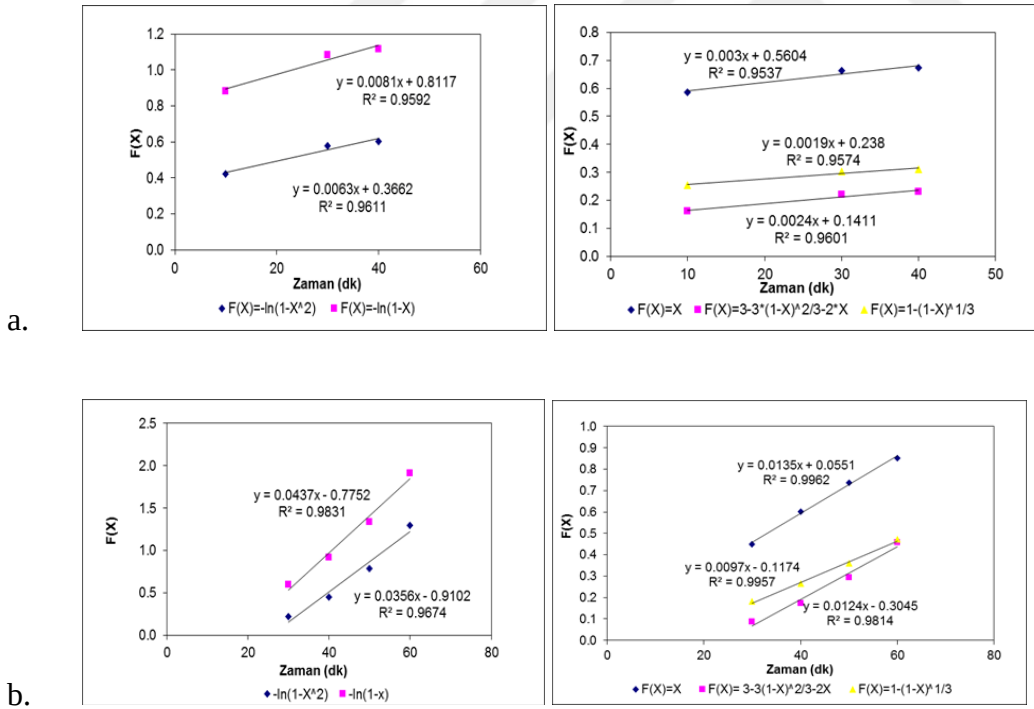
Şekil 4.55-4.56'da Pseudo 1. ve 2. dereceden hız denklemlerine ait sonuçlar yer almaktadır. Şekil 4.57'de ISV ve UCM modelleri ile hazırlanan grafikler Şekil 4.58'de ise partikül içi difüzyon modeline uygun hazırlanan grafikler mevcuttur. Çizelge 4.14 ve 4.15 ise bütün grafiklerin sonuçlarını bir arada sunulmuştur.



Şekil 4.55 Pseudo 1. derece hız modeli a. NIP b. MIP



Şekil 4.56 Pseudo 2. derece hız modeli a. NIP b. MIP

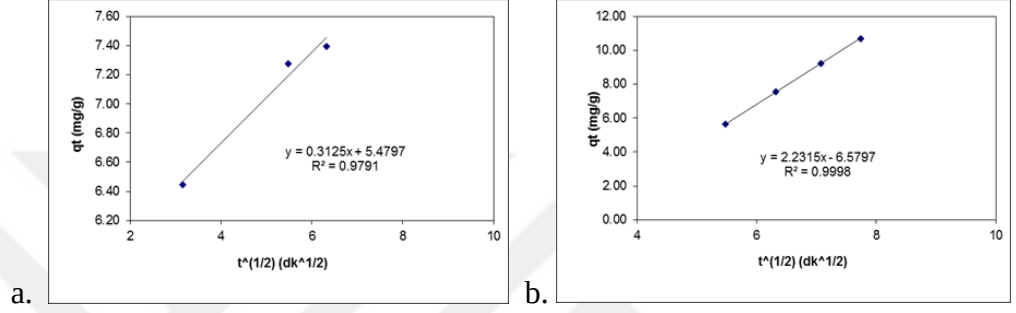


Şekil 4.57 ISV ve UCM hız belirleyici adımlar a. NIP b. MIP

Çizelge 4.13'te ISV ve UCM modellerine göre difüzyonu işaret eden denklemler verilmiştir. Grafiklerle beraber incelendiğinde Çizelge 4.13 ve 4.14'te yer alan sonuçlara ulaşılabacaktır.

Çizelge 4.13 ISV ve UCM hız belirleyici adımlar için denklemler

Model	Denklem	Hız belirleyici adım
ISV	$-\ln(1-X)=kt$ -- $k=D\pi^2/r_0^2$	Film difüzyonu
ISV	$-\ln(1-X^2)=K_{1it}$ -- $K_{1i}=3DC/r_0\delta C_r$	Partikül difüzyonu
UCM	$X=(3C_{A0}KmA/ar_0Cs_0)t$	Sıvı film
UCM	$3-3(1-X)^{2/3}-2X=(6D_{eR}C_{A0}/ar_0^2Cs_0)t$	Tabaka
UCM	$1-(1-X)^{1/3}=(ksC_{A0}/ar_0Cs_0)t$	Kimyasal reaksiyon



Şekil 4.58 Partikül içi difüzyon a. NIP b. MIP

Çizelge 4.14 D4-NIP hız denklemleri sonuçları.

D4-NIP	R ²	UCM	R ²	ISV	R ²	Partikül içi - R ²
1. derece	0.9592	F(X)=X	0.9537	F(X)=-ln(1-X ²)	0.9611	0.9791
2. derece	0.9648	F(X)=3-3*(1-X) ^{2/3} -2*X	0.9601	F(X)=-ln(1-X)	0.9592	
		F(X)=1-(1-X) ^{1/3}	0.9574			
Yorum	2. derece	Yorum	Tabaka	Yorum	Partikül difüzyonu	

Çizelge 4.15 D4-MIP hız denklemleri sonuçları

D4-MIP	R ²	UCM	R ²	ISV	R ²	Partikül içi - R ²
1. derece	0.9831	F(X)=X	0.9962	F(X)=-ln(1-X ²)	0.9674	0.9998
2. derece	0.9703	F(X)=3-3*(1-X) ^{2/3} -2*X	0.9814	F(X)=-ln(1-X)	0.9831	
		F(X)=1-(1-X) ^{1/3}	0.9957			
Yorum	1. derece	Yorum	Sıvı film	Yorum	Film difüzyonu	

Çizelge 4.14 ve 4.15 incelendiğinde NIP ve MIP için hız denklemlerinin farklı olduğu görülmektedir. MIP Pseudo 1. derece hız denklemine uyarken NIP 2.

derece, MIP sıvı film UCM modeline uygunken NIP tabaka difüzyonuna, MIP film difüzyonu ISV modeline uygunken NIP partikül difüzyonuna uymaktadır. Ancak bütün sonuçlar incelendiğinde en iyi R^2 değerlerinin (NIP – 0.9791; MIP – 0.9998) her iki polimer için de partikül içi difüzyon modeline ait olduğu bu çalışma ile ortaya konmuştur.

4.8 Tekrarlanabilirlik

Kolon çapı 1.4 cm ve 120 mg polimer D4MIP polimeri içeren kolona 100 µg/mL yükleme yapılarak ardışık iki deneme gerçekleştirilmiştir. Birinci denemede elüsyon fraksiyonunun konsantrasyonu 50.324 µg CG/mL, ikinci denemede ise 53.581 µg/mL olarak elde edilmiştir. Ardışık iki deneme arasında %6.47’lik bir fark mevcuttur. Ölçek büyütme çalışmalarında ise 10 g ve 100 g denemelerinin tamamı aynı polimerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmaların öncesinde kolonda ekstre kalıntısı olup olmadığı İTK yapılarak kontrol edilmiştir. Kolonda ekstre kalması durumunda önce 2 kolon hacmi %80 metanol-asetik asit sonra da metanol ile kolon iyice yıkandıktan sonra yeni kolon çalışması başlatılmıştır.

4.9 Şişme Denemesi

Şişme denemelerinde öncelikli olarak polimerlerin metanolde şişmeleri göz önünde bulundurulmuştur. Sonraki aşamada %70 su:Asetonitril çözeltisinde şişme performansları belirlenmiştir. Ölçek büyütme için seçilen polimerler için ise Sitrat-Fosfat tampon çözeltisinde ve %70 su:Asetonitril çözeltisinde farklı pH’larda şişme denemeleri yürütülmüştür. Çalışmalar 100 mg polimerin üzerine 2 mL çözgen ilavesi ile gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.16-4.20 proje boyunca sentezlenen polimerlerin farklı çözgen sistemleri ve pH koşullarındaki şişme oranlarını göstermektedir. Ölçek büyütme sırasında karşılaşılan problemlerden bazıları polimerlerin şişme oranları ile doğrudan ilgilidir. Kolonlarda tıkanma, basınç düşmesi gibi problemleri gidermek adına çalışmaların bir kısmı daha az şişme oranına sahip polimerlerle tekrar edilmiştir. Ancak çalışmalar boyunca en başarılı sonuçları veren polimerin D4 olması, şişmenin CG’nin baskılanmasını kolaylaştırabileceğine işaret etmektedir.

Çizelge 4.16 Farklı pH'larda %70 su:asetonitril çözeltisinde D4-NIP ve D4-MIP polimerlerinin şişme oranları.

NIP Kuru Yükseklik (mm)	NIP Yaş Yükseklik (mm)	pH	% Şişme	MIP Kuru Yükseklik (mm)	MIP Yaş Yükseklik (mm)	pH	% Şişme
2	5.5	3	175	2	7.5	3	275
2	5.5	4	175	2	8	4	300
2	5.5	5	175	2	8	5	300
2	5.5	6	175	2	8	6	300
2	6	7	200	2	8	7	300
2	6	8	200	2	8.5	8	325
2	6	9	200	2	8.5	9	325

Çizelge 4.17. Farklı pH'larda tampon çözeltide D4-NIP ve D4-MIP polimerlerinin şişme oranları.

NIP Kuru Yükseklik (mm)	NIP Yaş Yükseklik (mm)	pH	% Şişme	MIP Kuru Yükseklik (mm)	MIP Yaş Yükseklik (mm)	pH	% Şişme
2	3	3	50	2	3	3	50
2	3	4	50	2	3	4	50
2	3	5	50	2	3	5	50
2	3	6	50	2	4	6	100
2	3	7	50	2	4	7	100
2	3	8	50	2	4	8	100

Çizelge 4.18. Polimerlerin metanol etkileşimi sonucunda ortaya çıkan şişme oranları.

Polimerizasyon Protokolü (MIP)	D4 (1:4:20) Polimerleri	D4-30 (1:4:30) Polimerleri	D4-40 (1:4:40) Polimerleri
Porojen miktarı (mL)	% Şişme	% Şişme	% Şişme
10	226.7	-	137.5
20	170	-	307.7
30	230	300	335.7

Çizelge 4.19. Yeni protokol ile üretilen D4Y polimerlerinin şişme oranları.

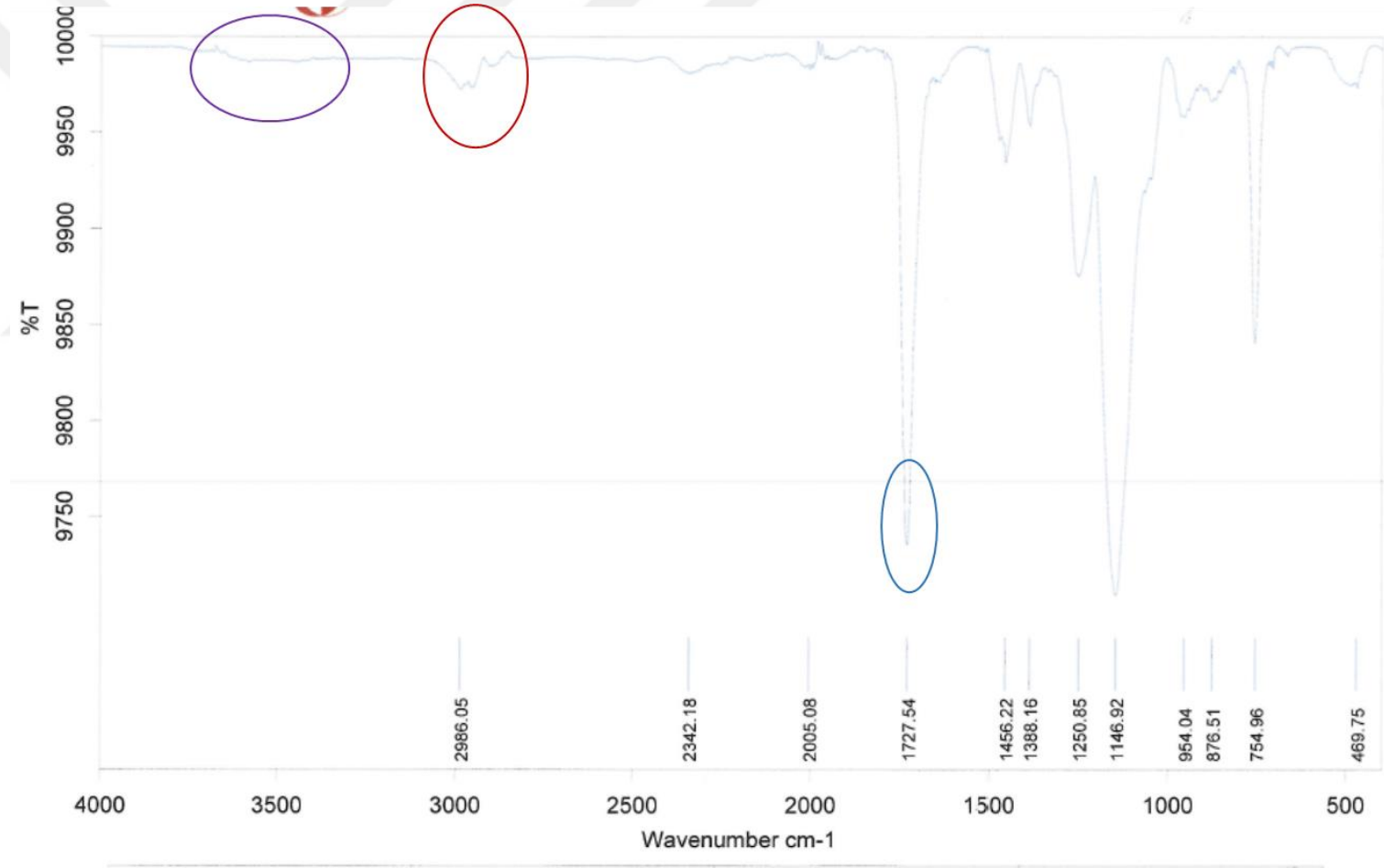
Polimerizasyon Protokolü	% Şişme
D4Y-NIP	215
D4Y-MIP	277

Çizelge 4.20. 1:3:20 ve 1:6:20 protokolleri ile üretilen polimerlerin %70 su:Asetonitril çözeltisinde şişme oranları.

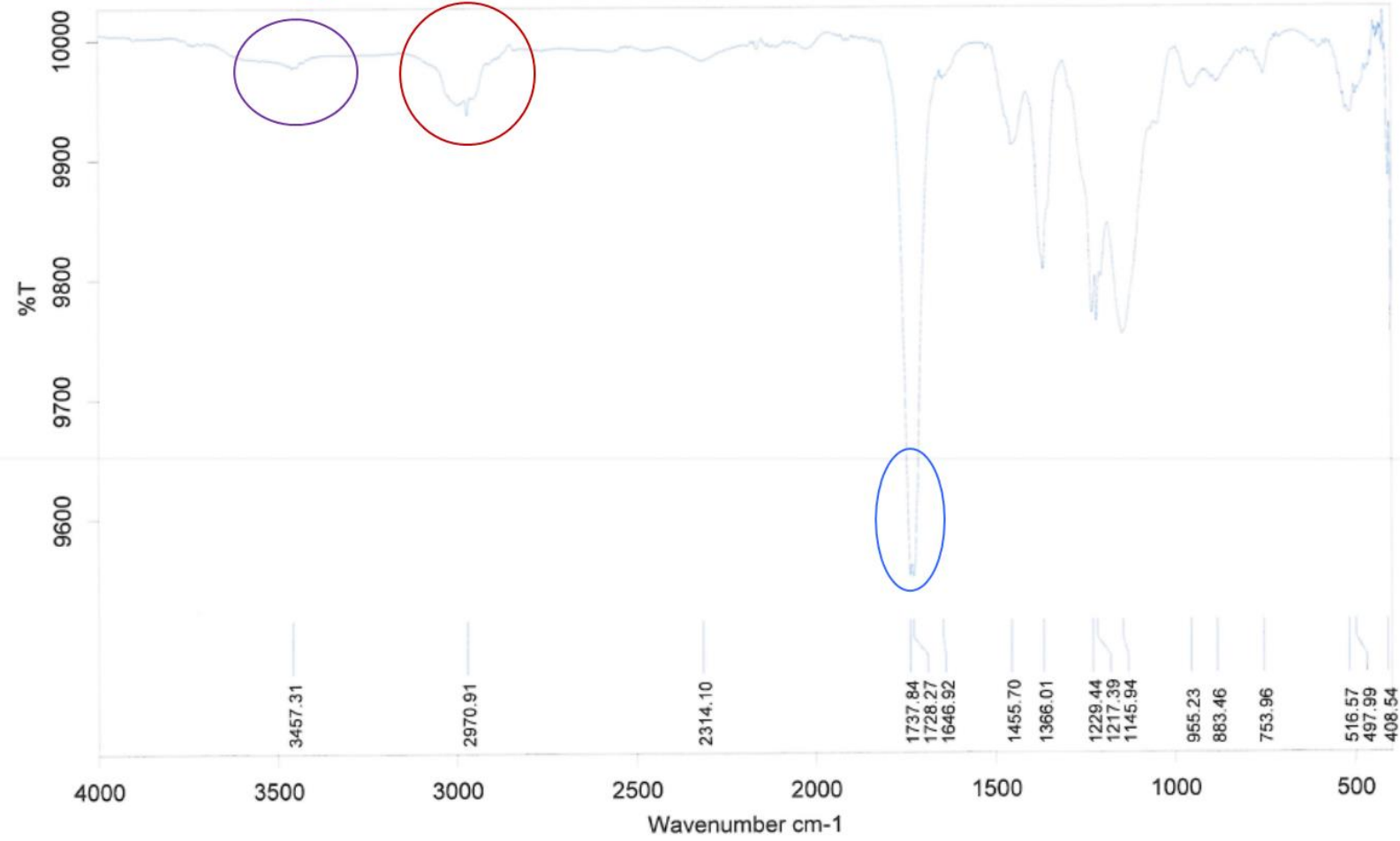
Polimerizasyon Protokolü	% Şişme
D3 – NIP	100
D3 - MIP	750
D6 – NIP	100
D6 - MIP	300

4.10 FTIR Analizleri

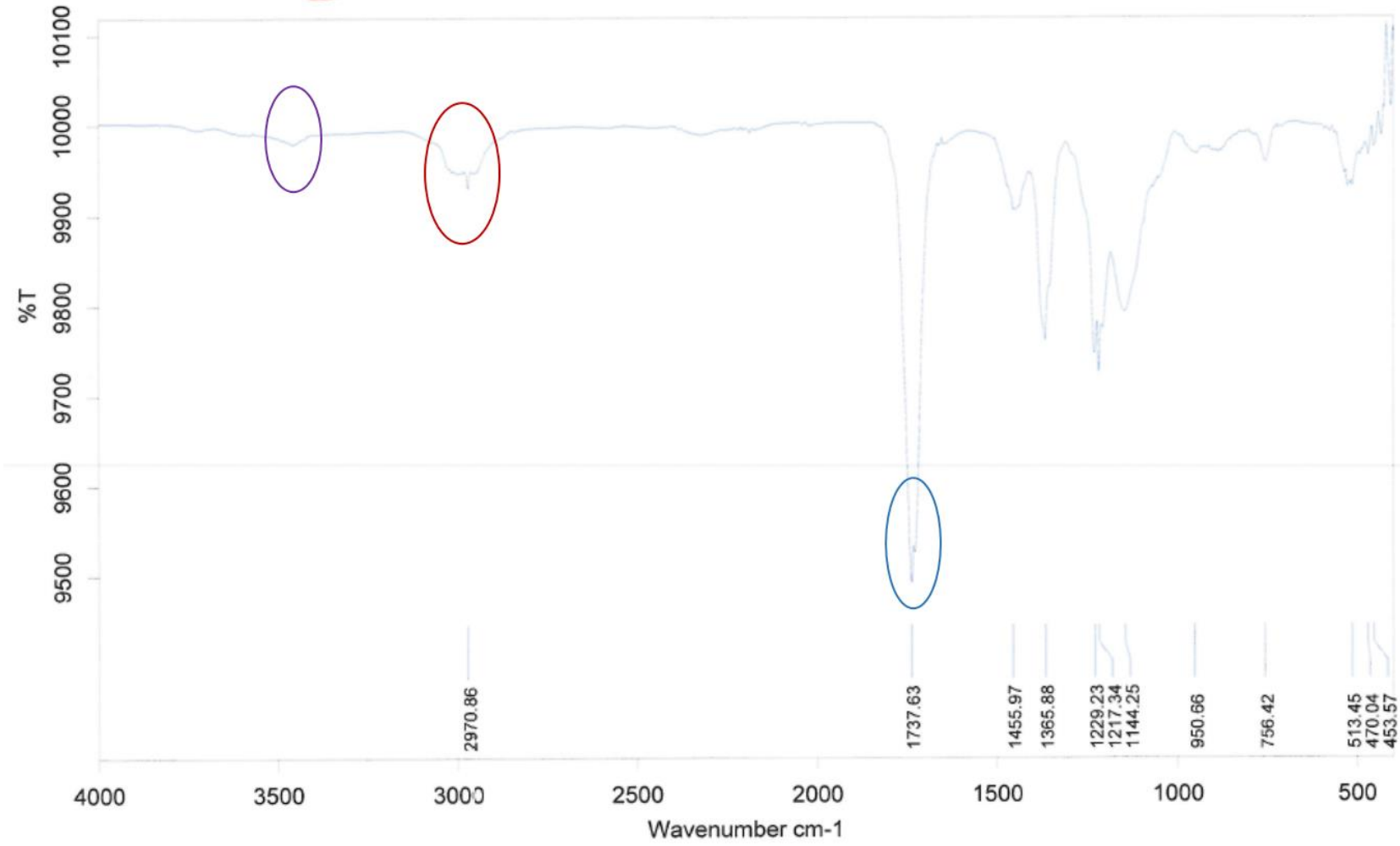
Polimerlerin karakterizasyonu için FTIR analizleri yapılmıştır (Şekil 4.59-4.81). Aşağıda bütün polimerlere ait spektrumlar verilmiştir. Spektrumlar incelendiğinde polimerlerin ana iskeletlerinin aynı olduğu görülmektedir. 1737 cm^{-1} 'lerde görülen karbon karbon ve karbon oksijen çift bağları ifade eden pikler, 2970 cm^{-1} 'lerde görülen karboksilik asit kökenli hidroksil gerilimini işaret eden pikler ve 3500 cm^{-1} 'lerdeki hidroksil pikleri baskılanmış polimerlerle baskılanmamış polimerlerin farkını açık bir şekilde ortaya koymaktadır.



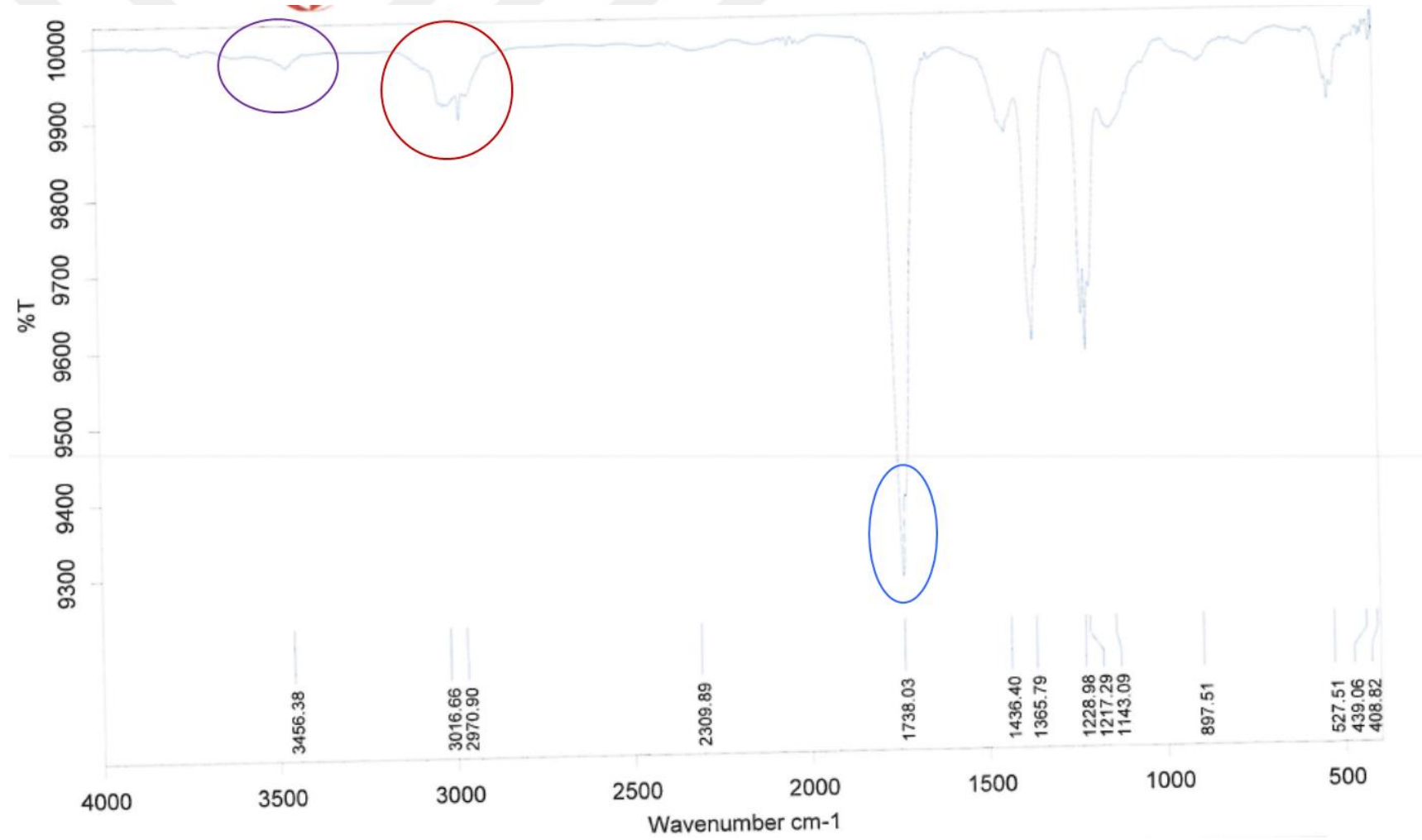
Şekil 4.59 Y4NIP0



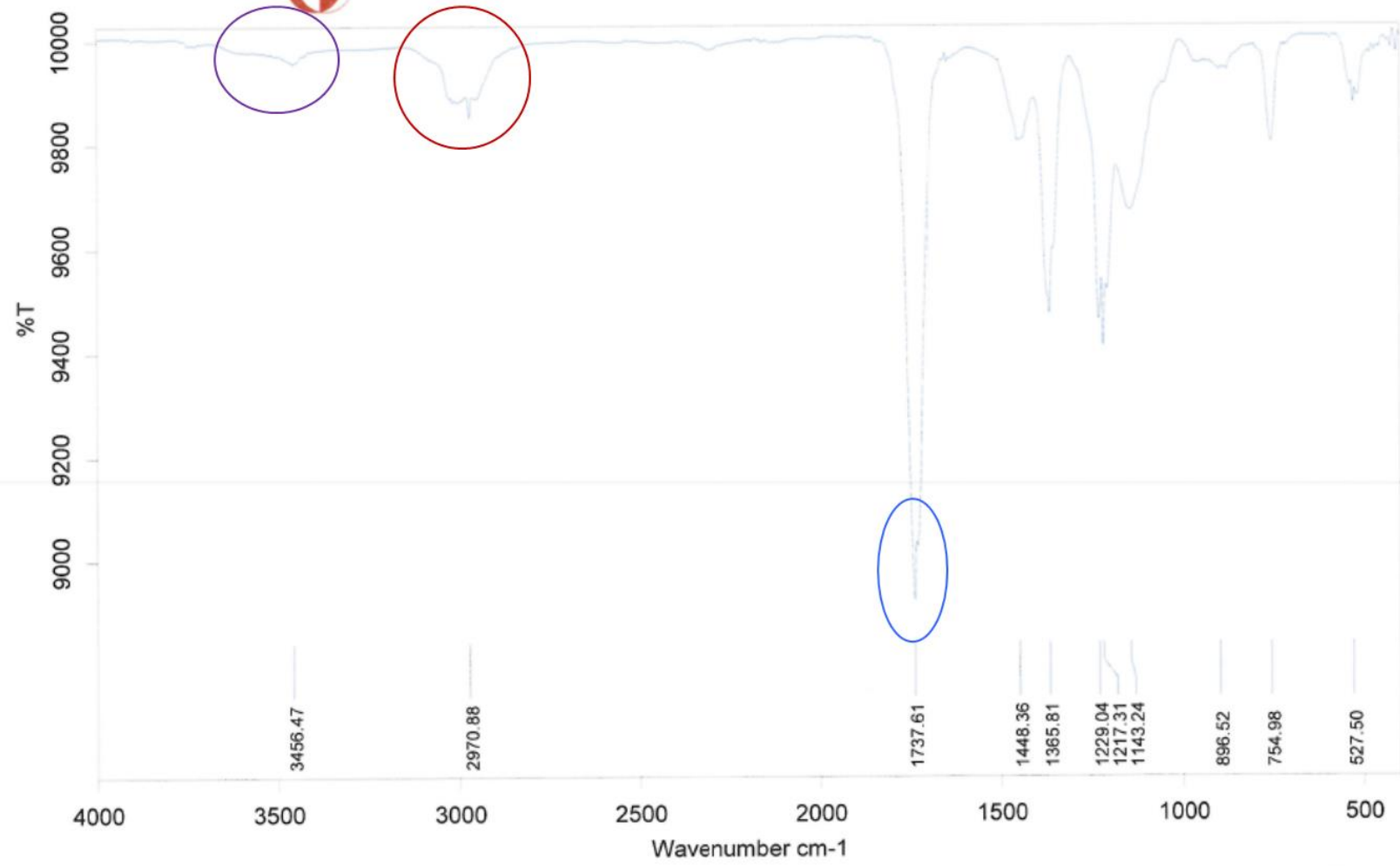
Şekil 4.60 Y4 NIP



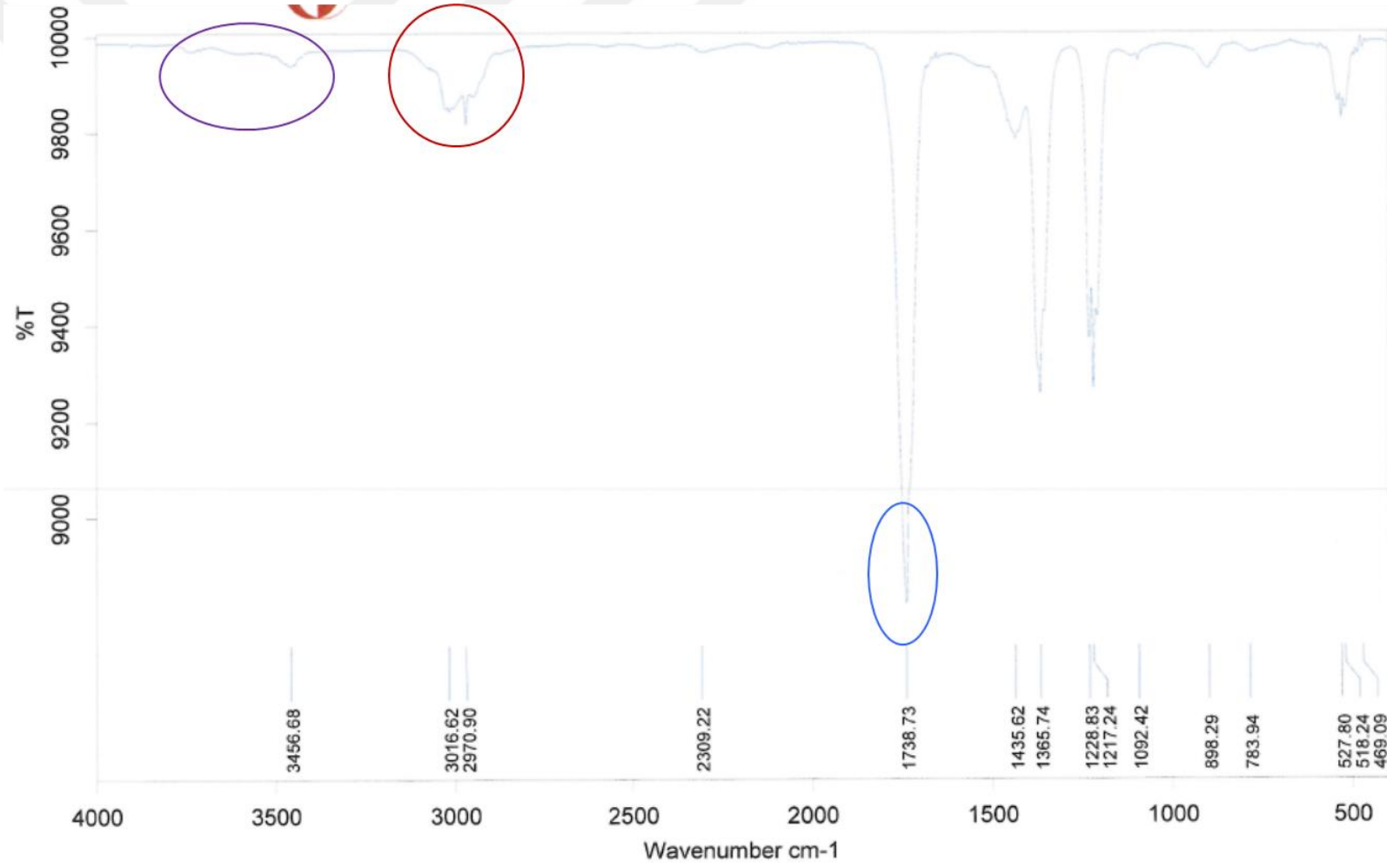
Şekil 4.61 Y4MIP0



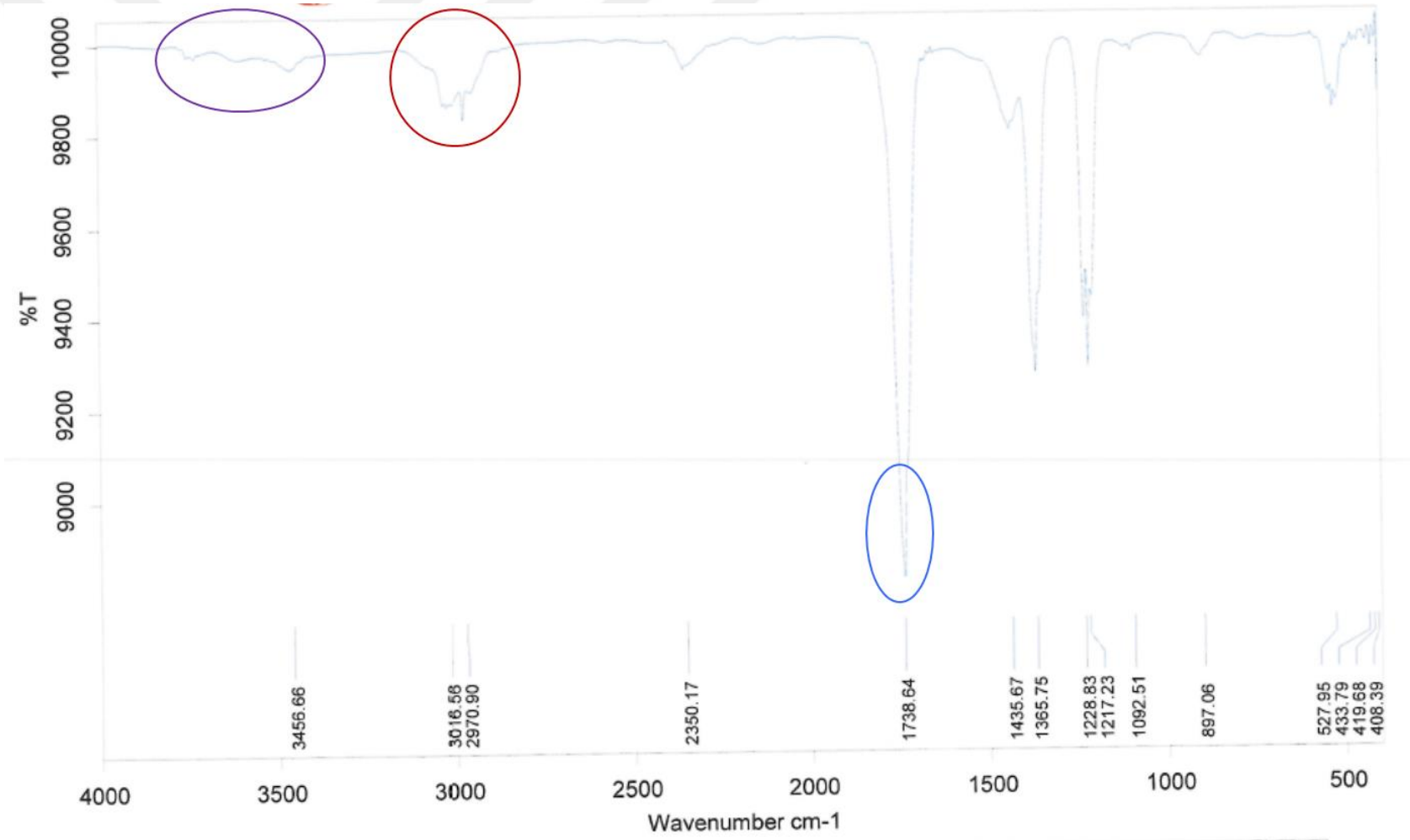
Şekil 4.62 Y4MIP



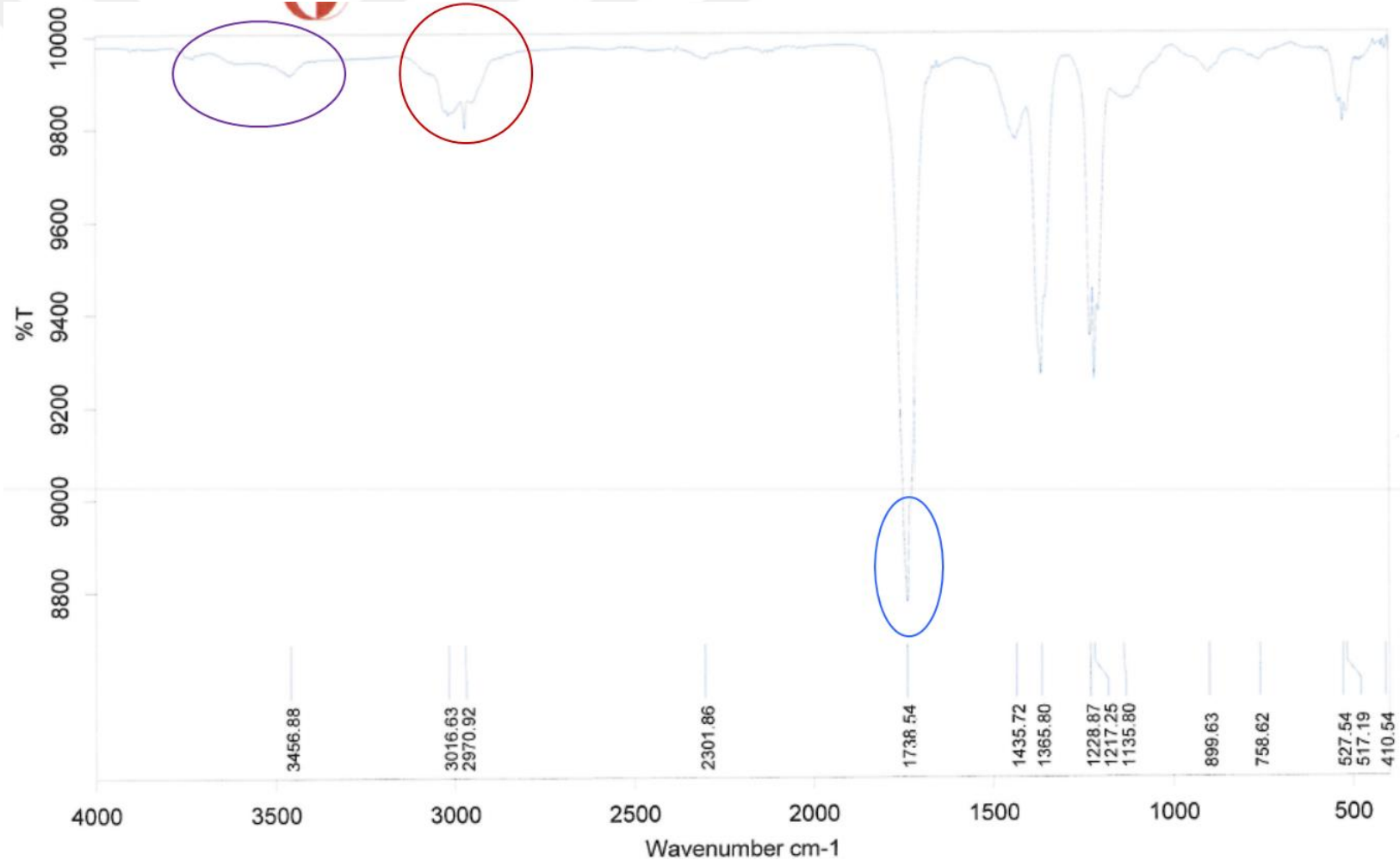
Şekil 4.63 Y8NIP0



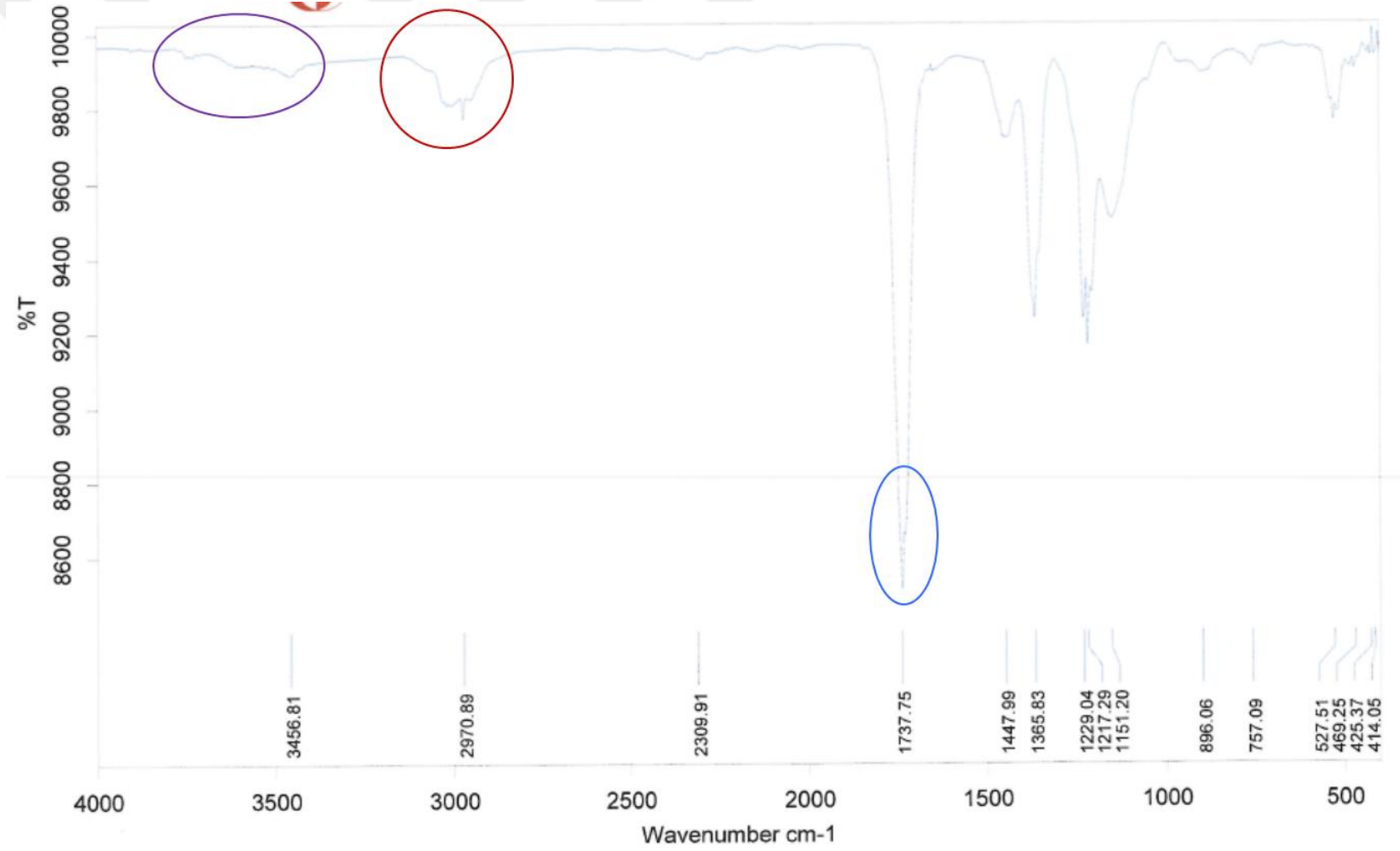
Şekil 4.64 Y8NIP



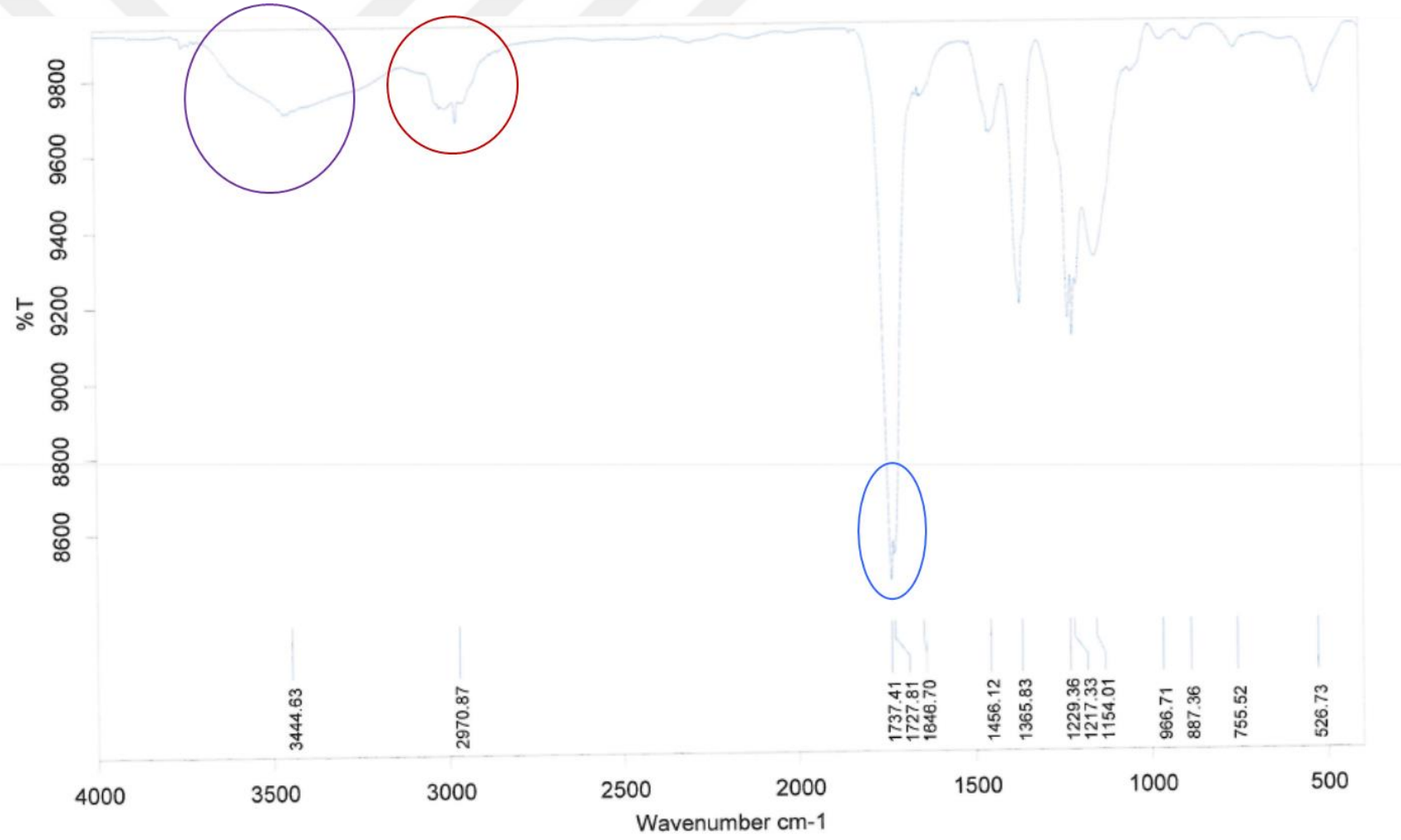
Şekil 4.65 Y8MIP0



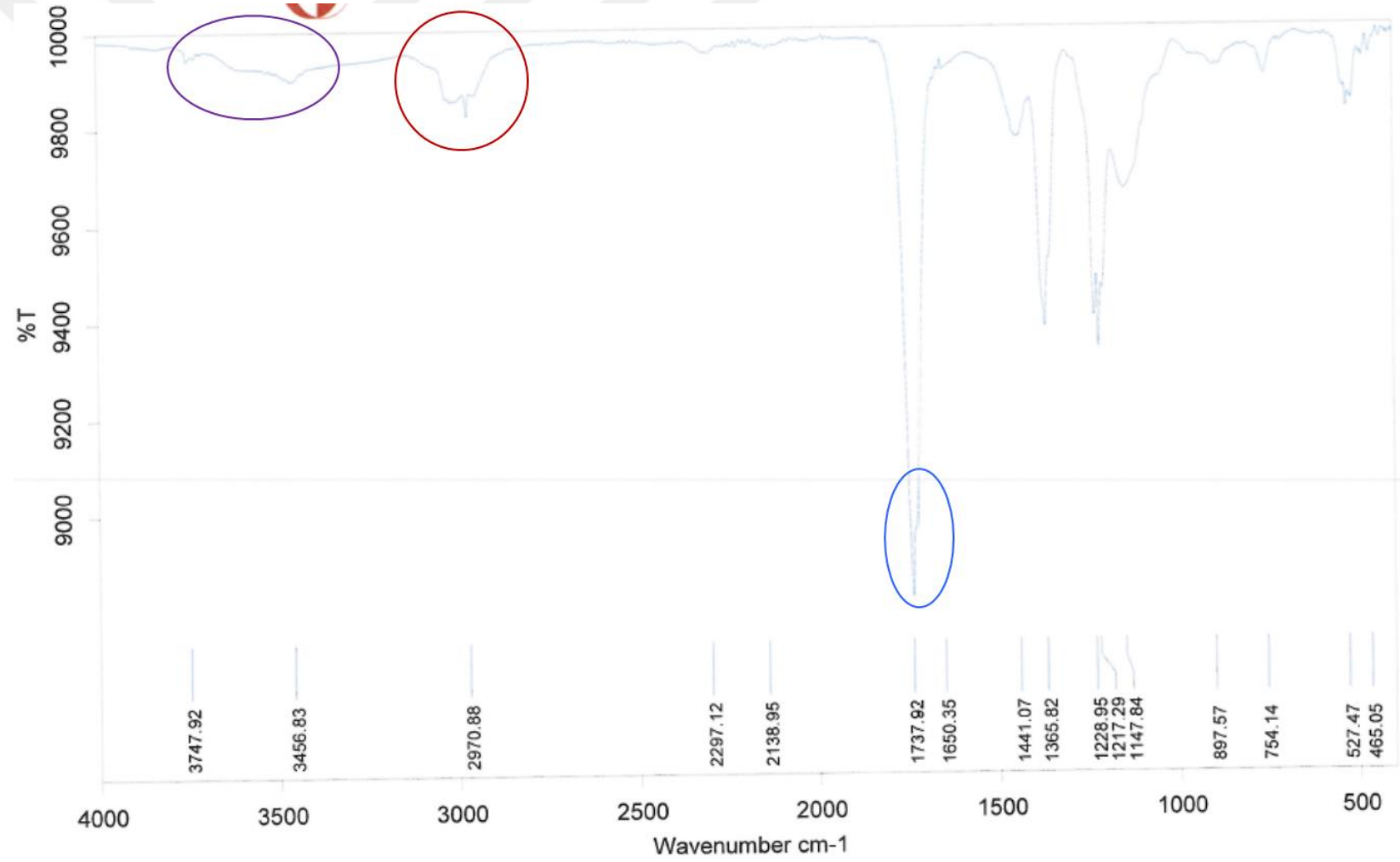
Şekil 4.66 Y8MIP



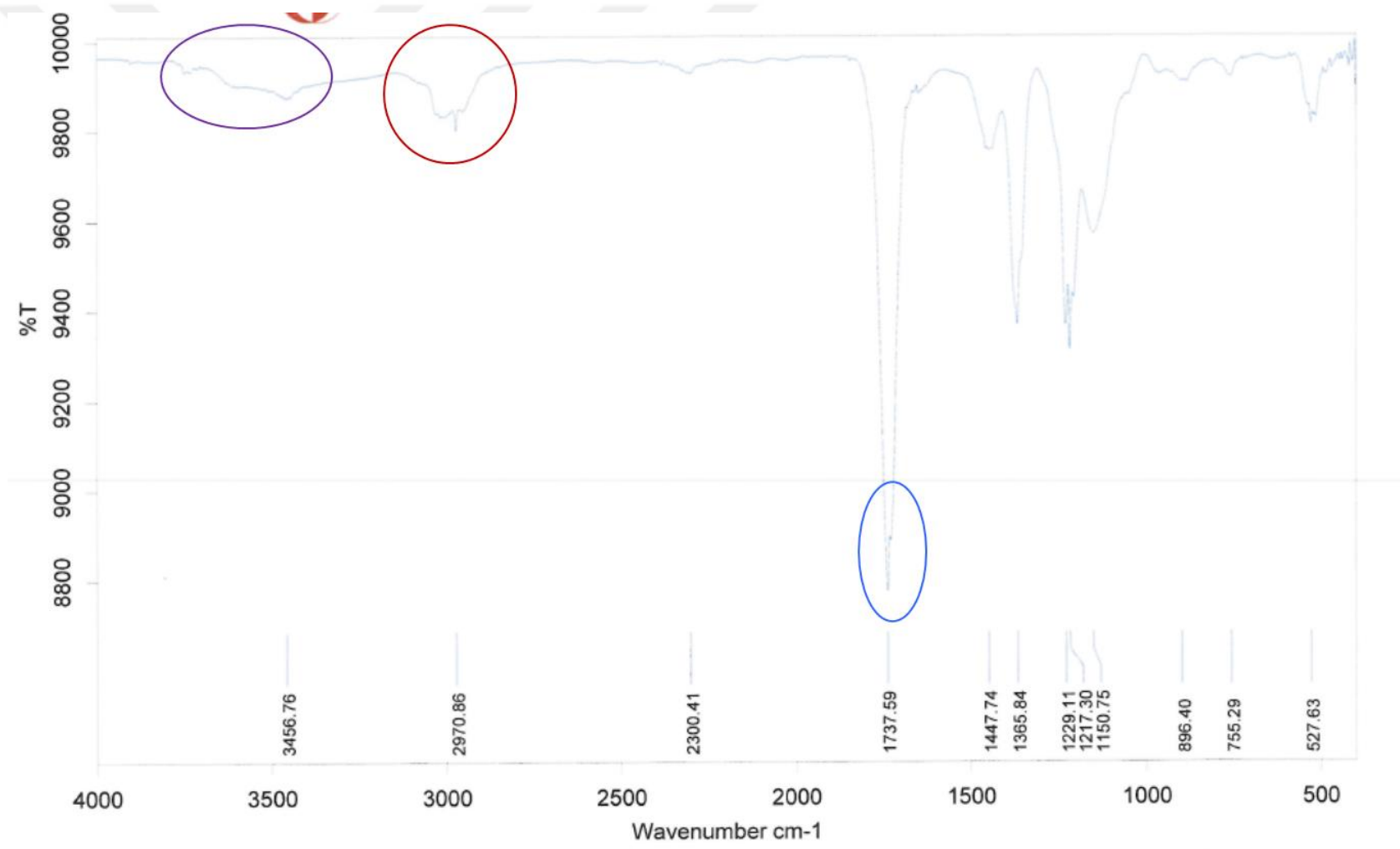
Şekil 4.67 D4NIP0



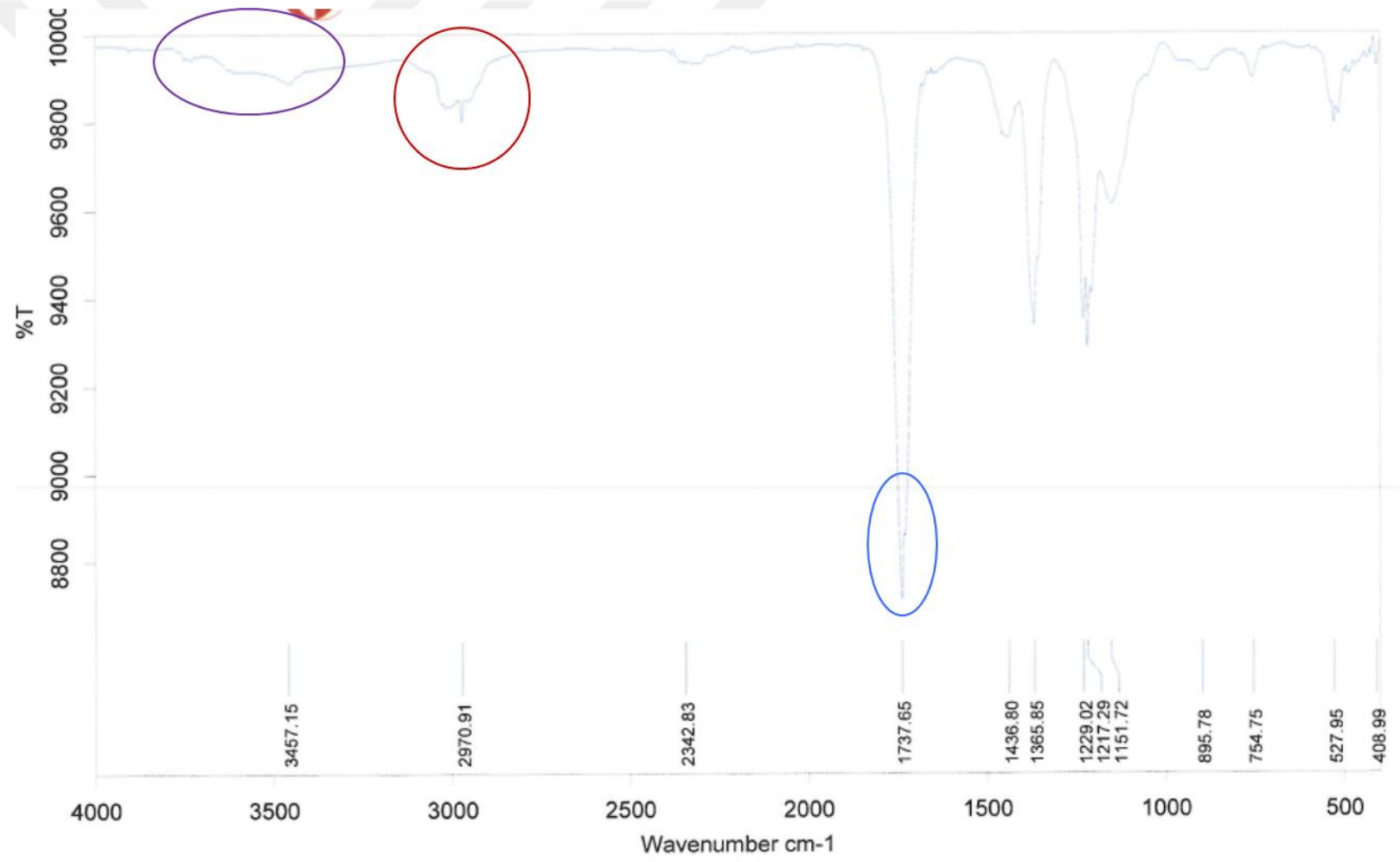
Şekil 4.68 D4NIP



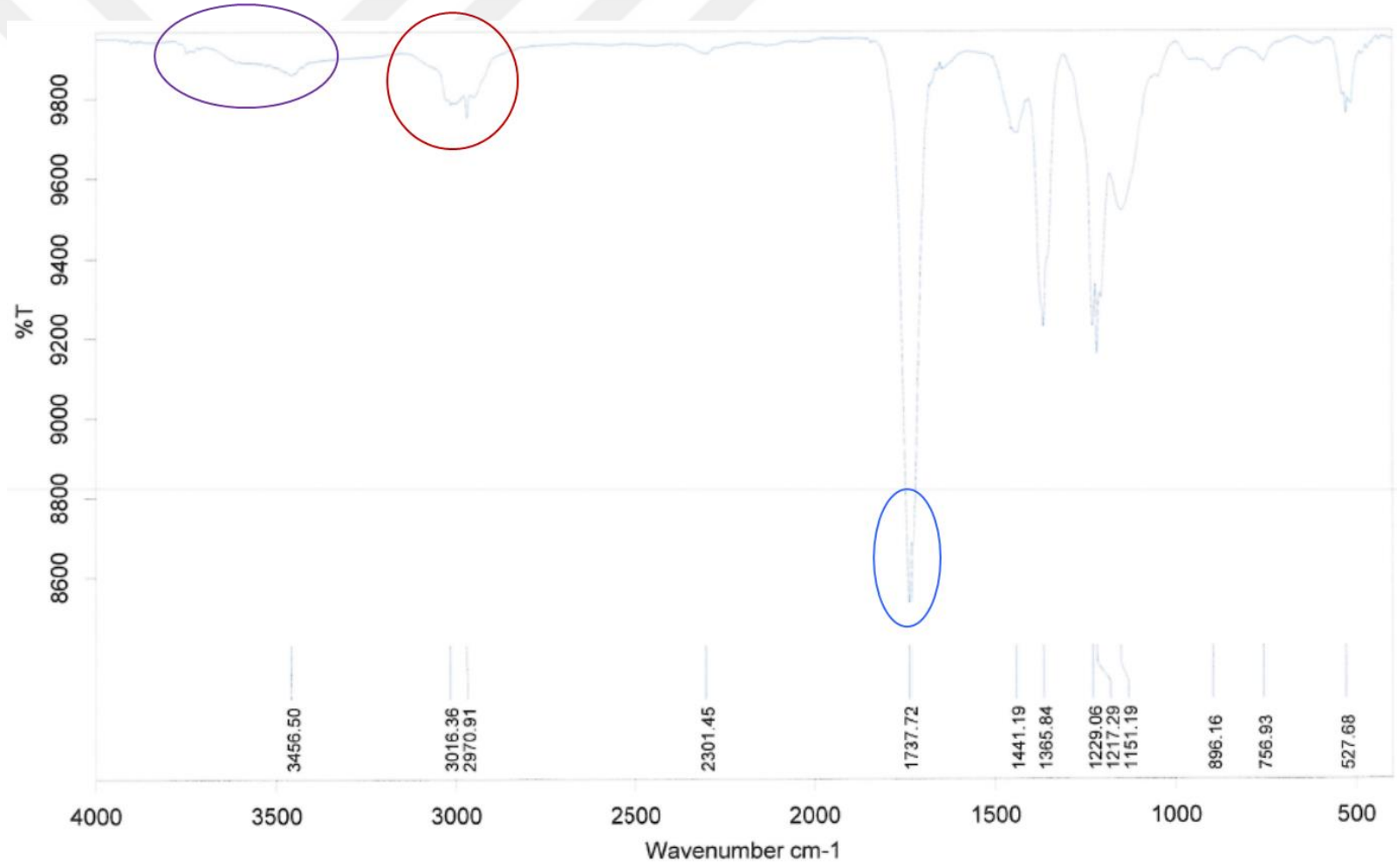
Şekil 4.69 D4MIP0



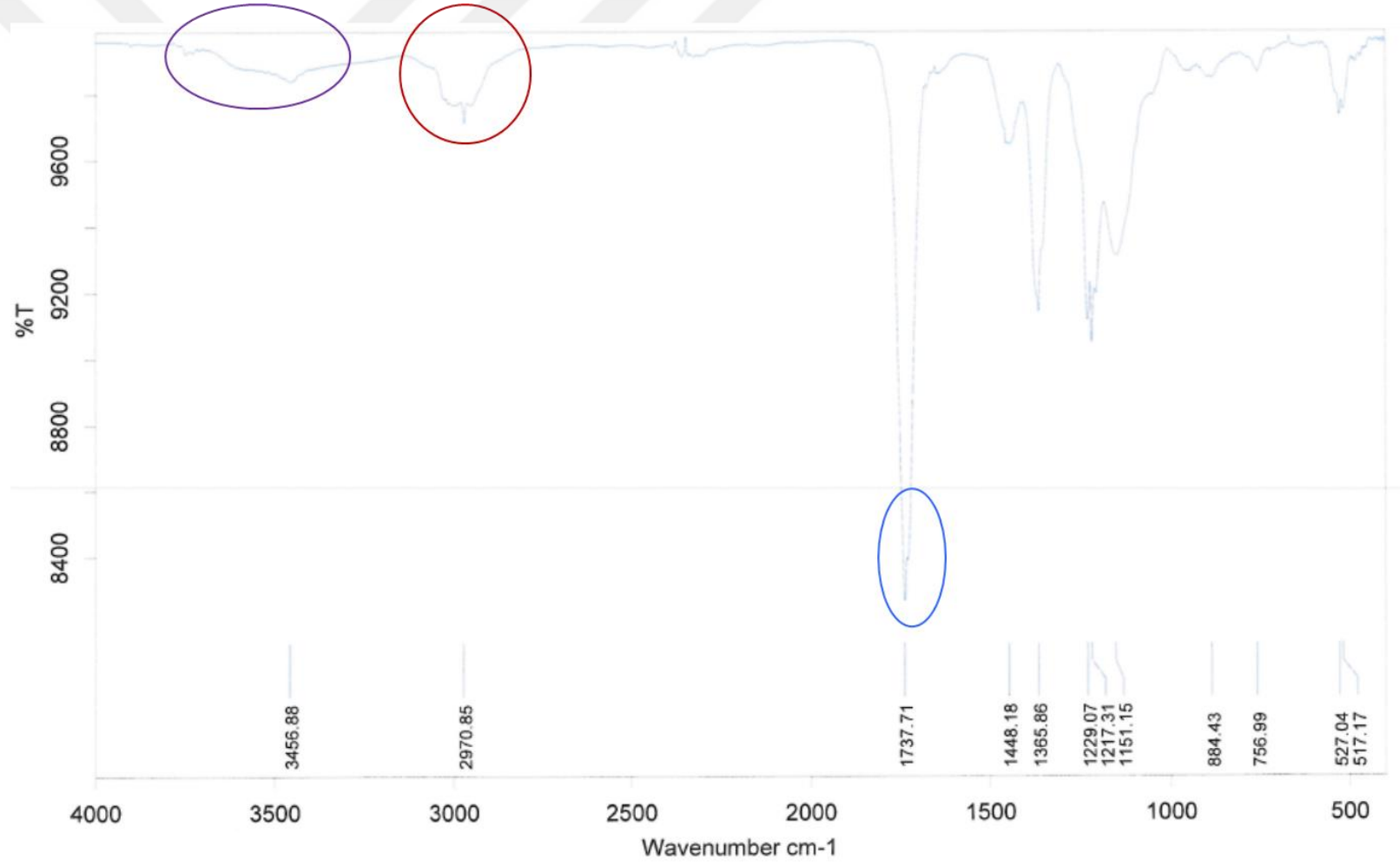
Şekil 4.70 D4MIP



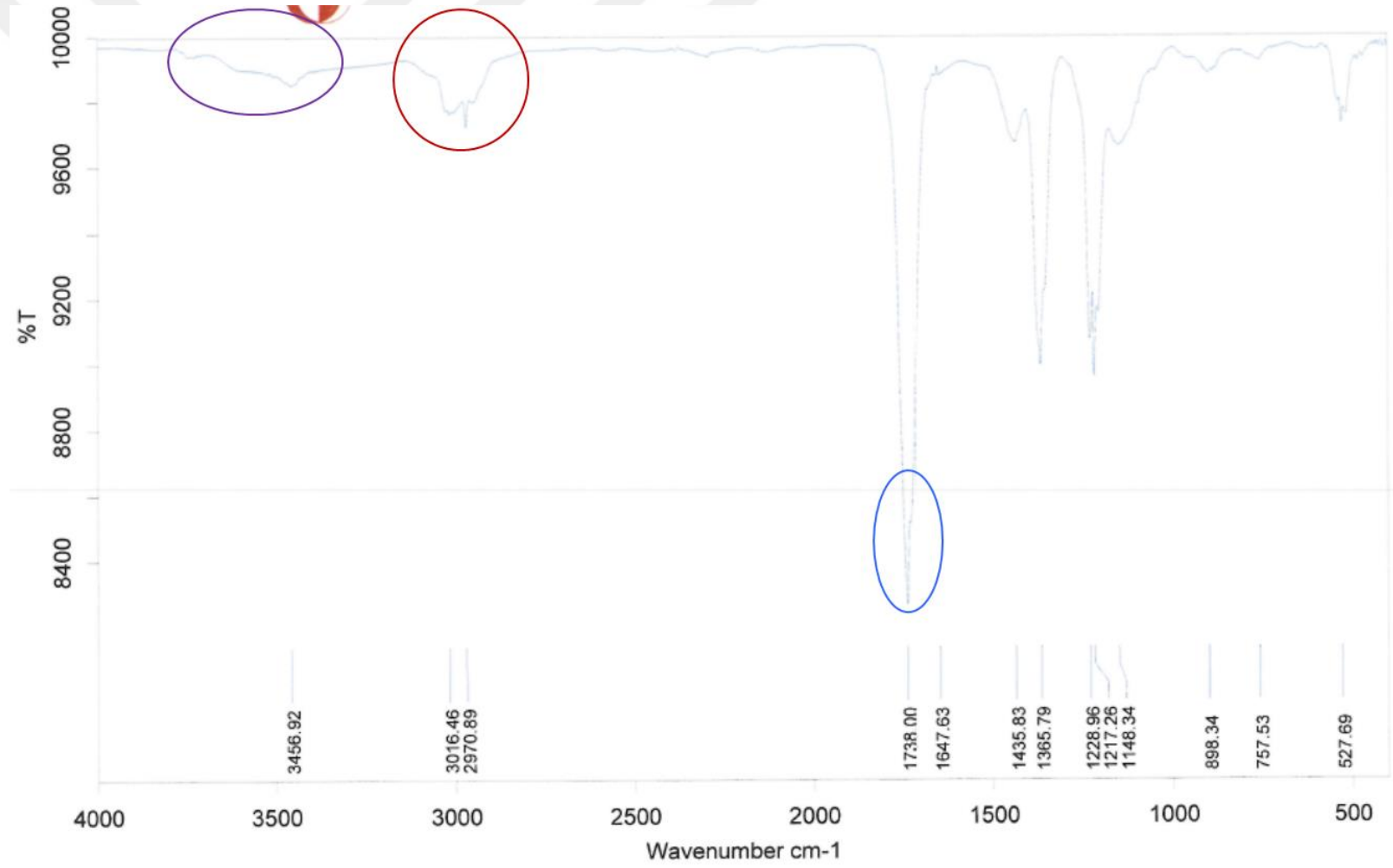
Şekil 4.71 D8NIP0



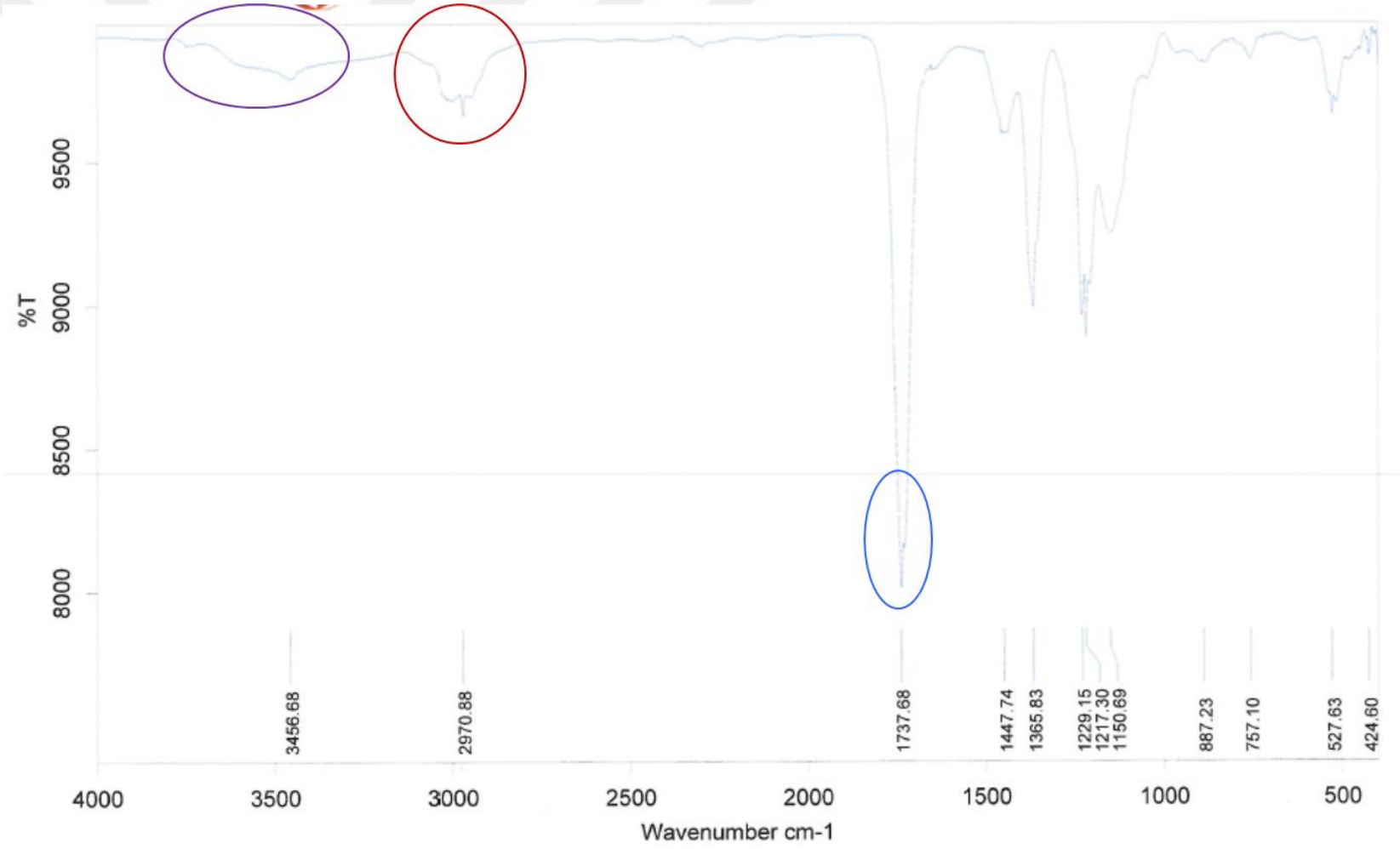
Şekil 4.72 D8NIP



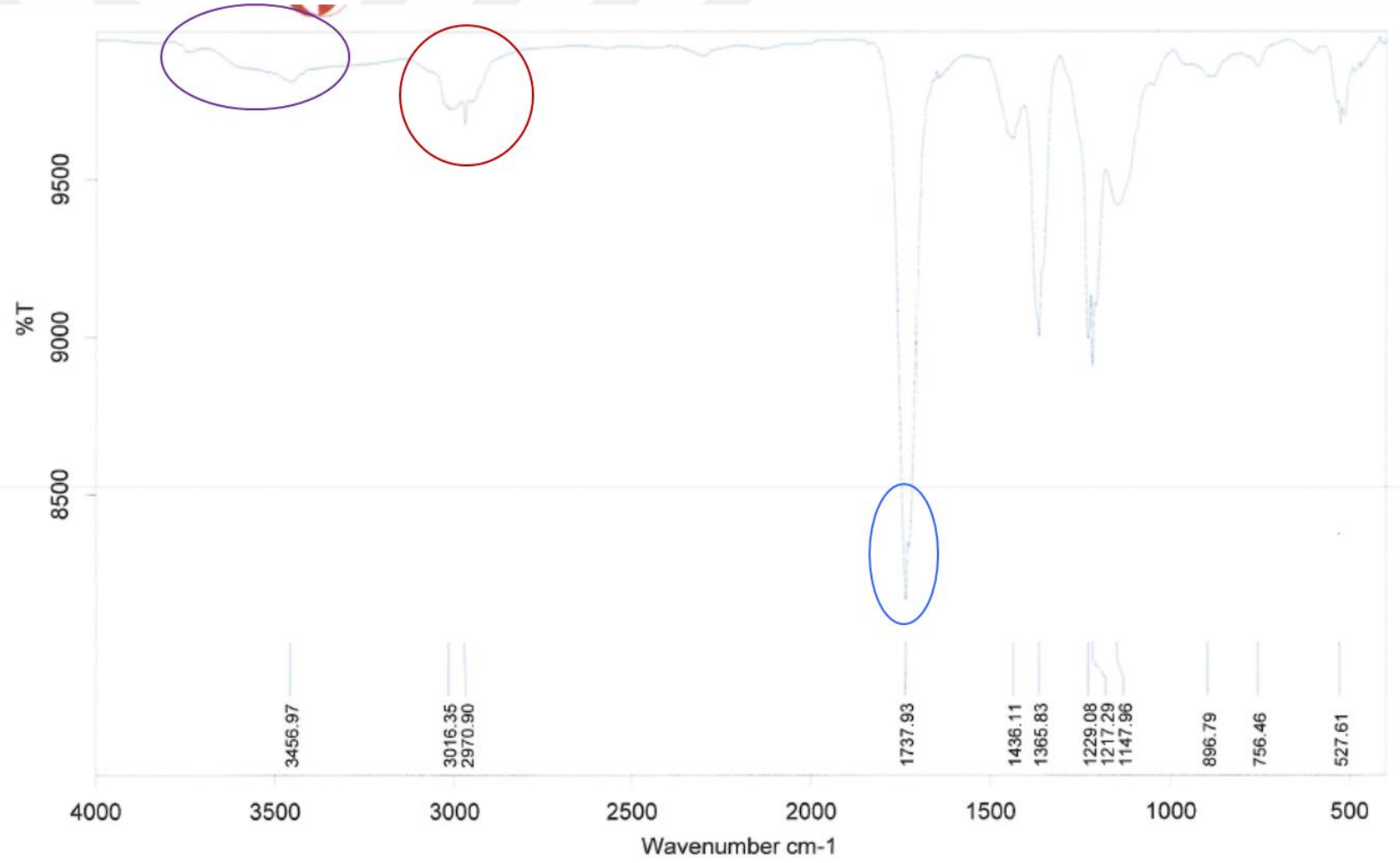
Şekil 4.73 D8MIP0



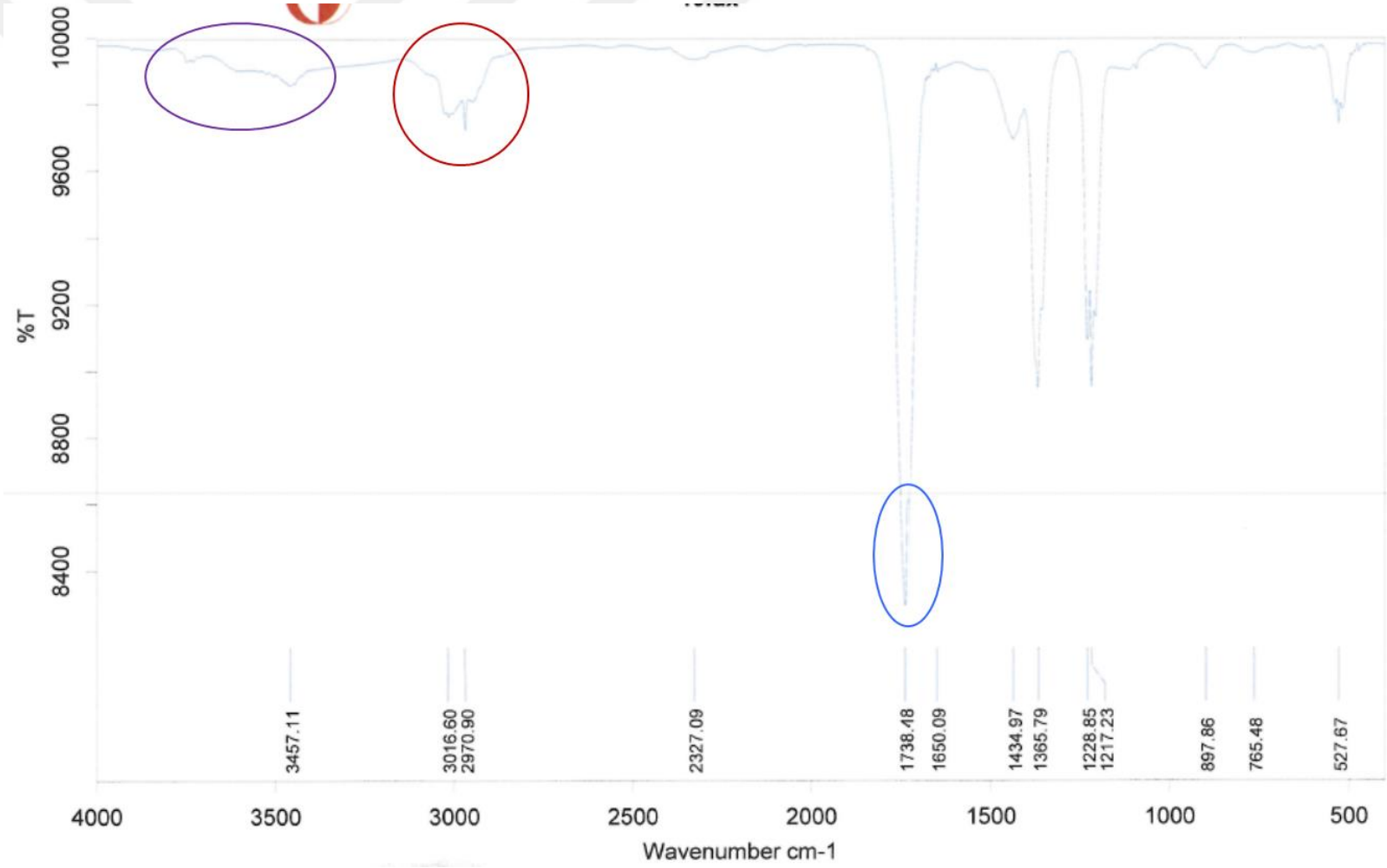
Şekil 4.74 D8MIP



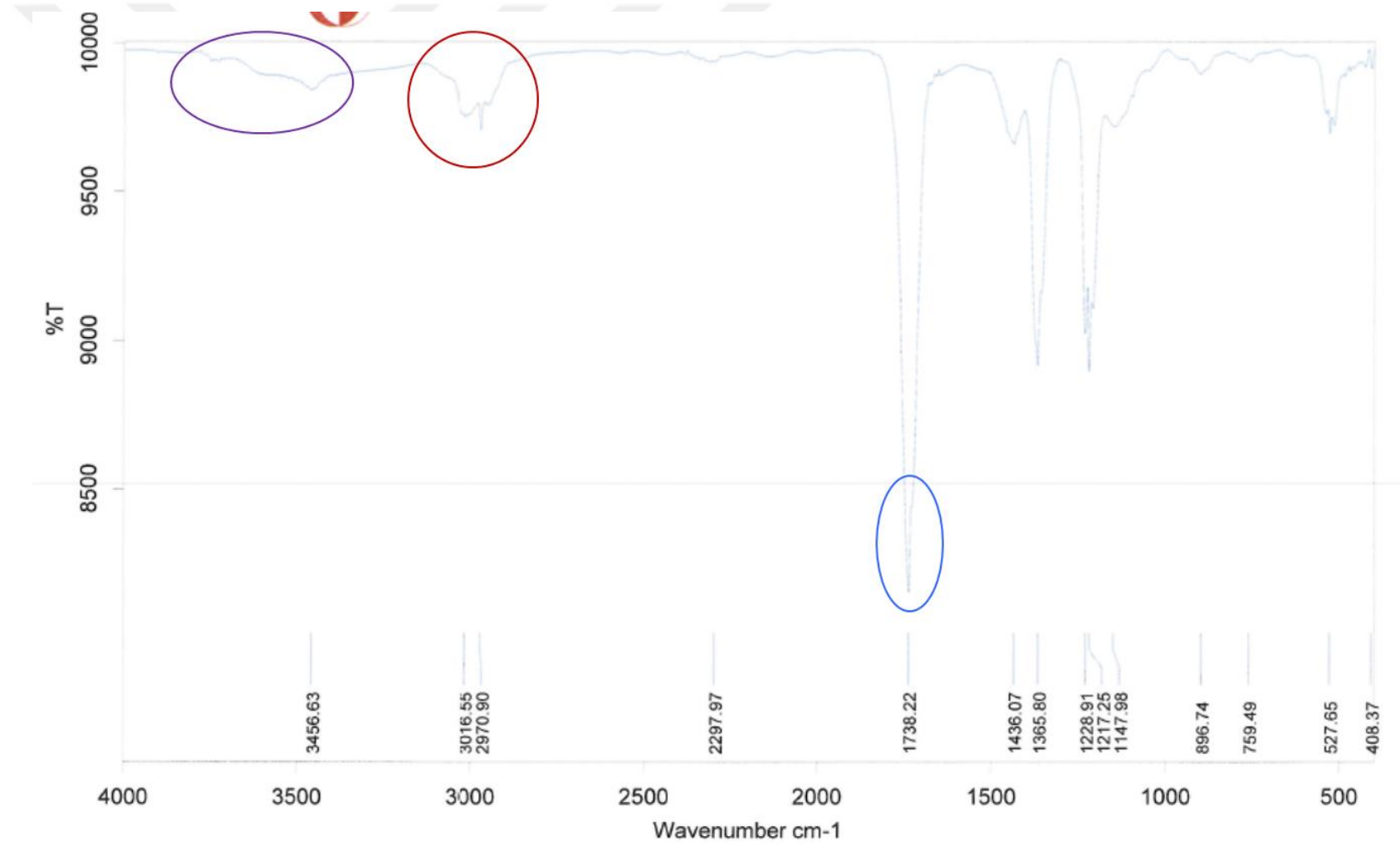
Şekil 4.75 D4YNIP



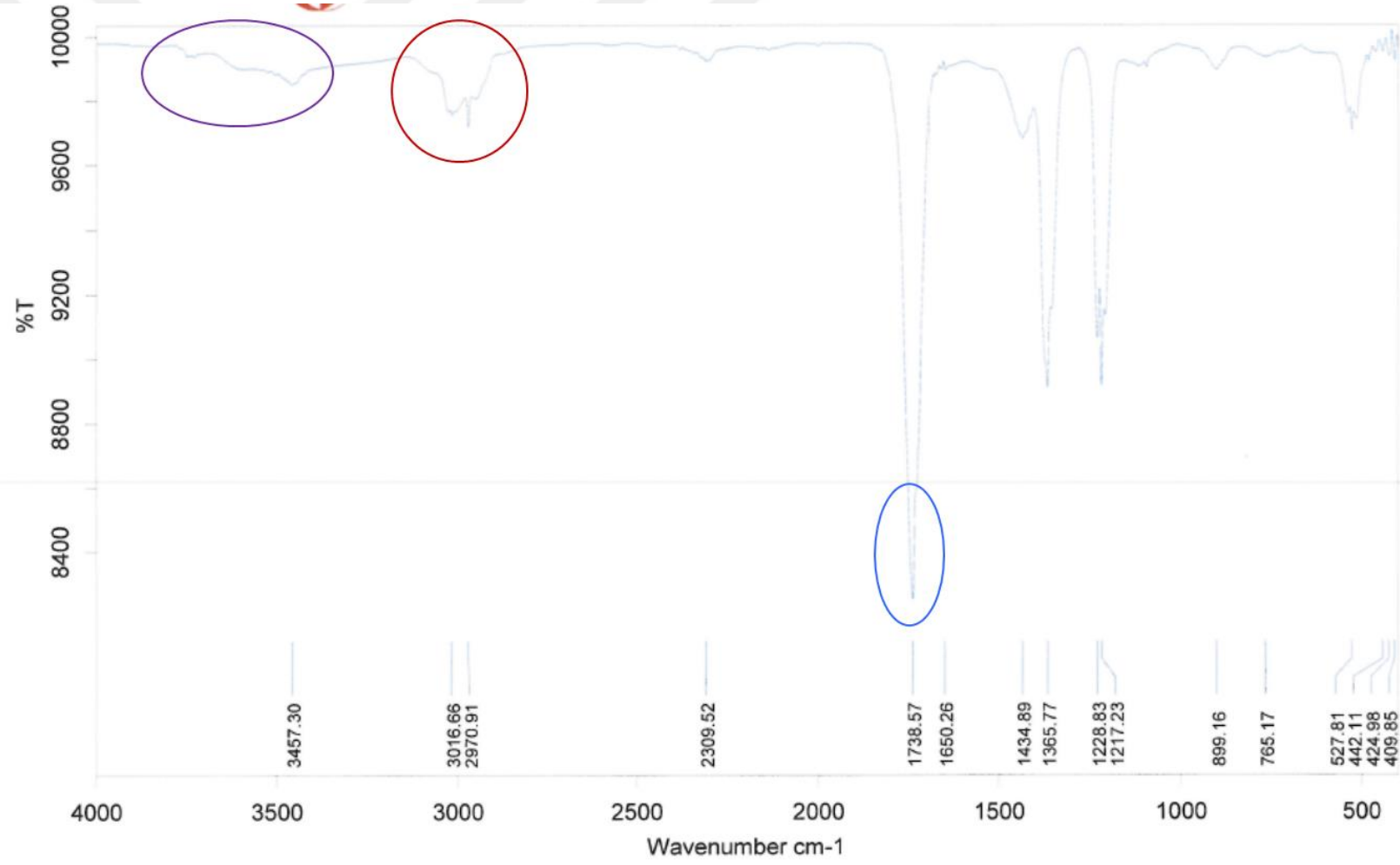
Şekil 4.76 D4YMIP



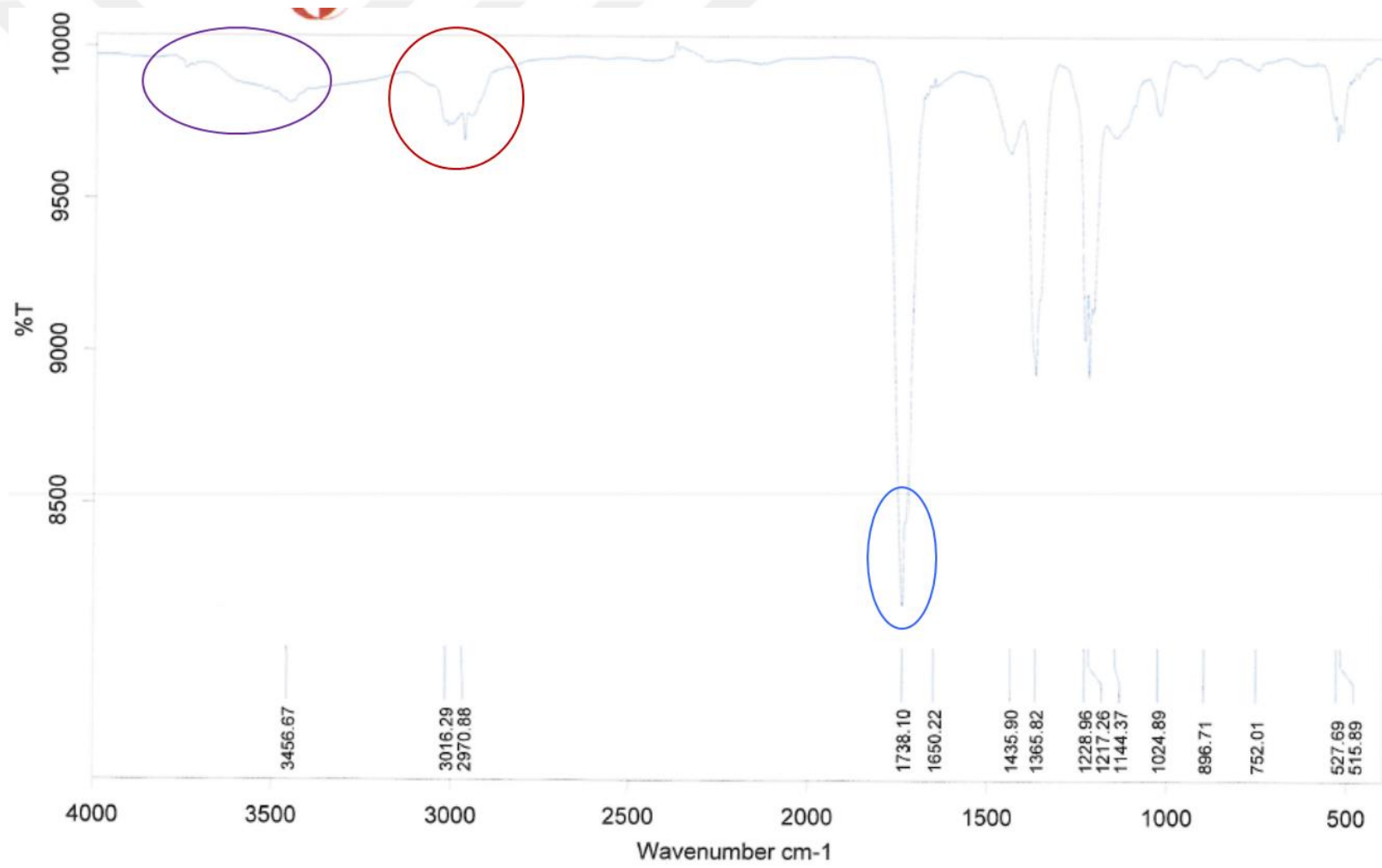
Şekil 4.77 D1-4-40-10NIP0



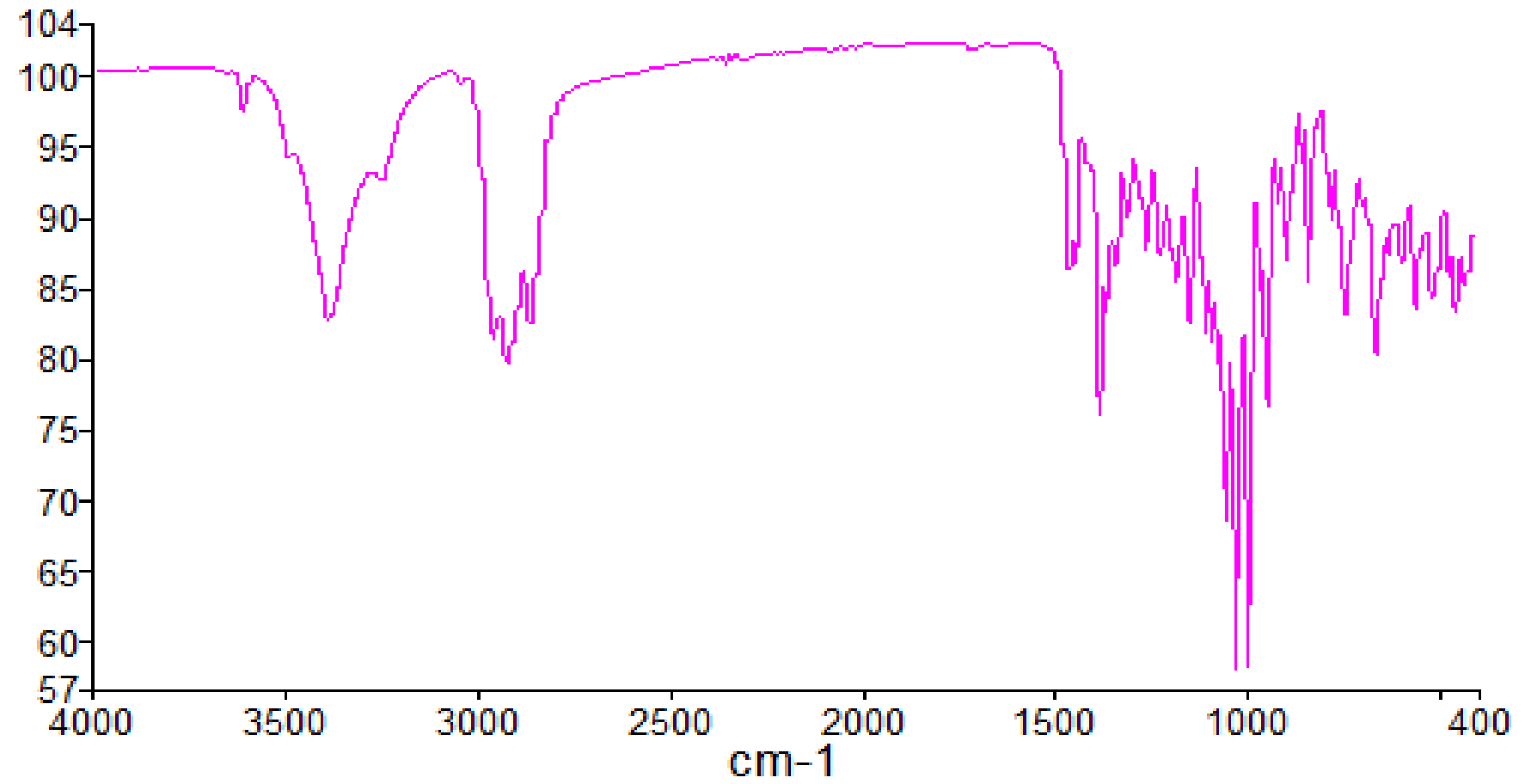
Şekil 4.78 D1-4-40-10NIP



Şekil 4.79 D1-4-40-10MIP0



Şekil 4.80 D1-4-40-10MIP



Şekil 4.81 CG

4.11 Elementel Analiz Sonuçları

D4-NIP ve D4-MIP polimerlerinin kimyasal karakterizasyonu için elementel analiz çalışması yapılmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.21’de verilmiştir.

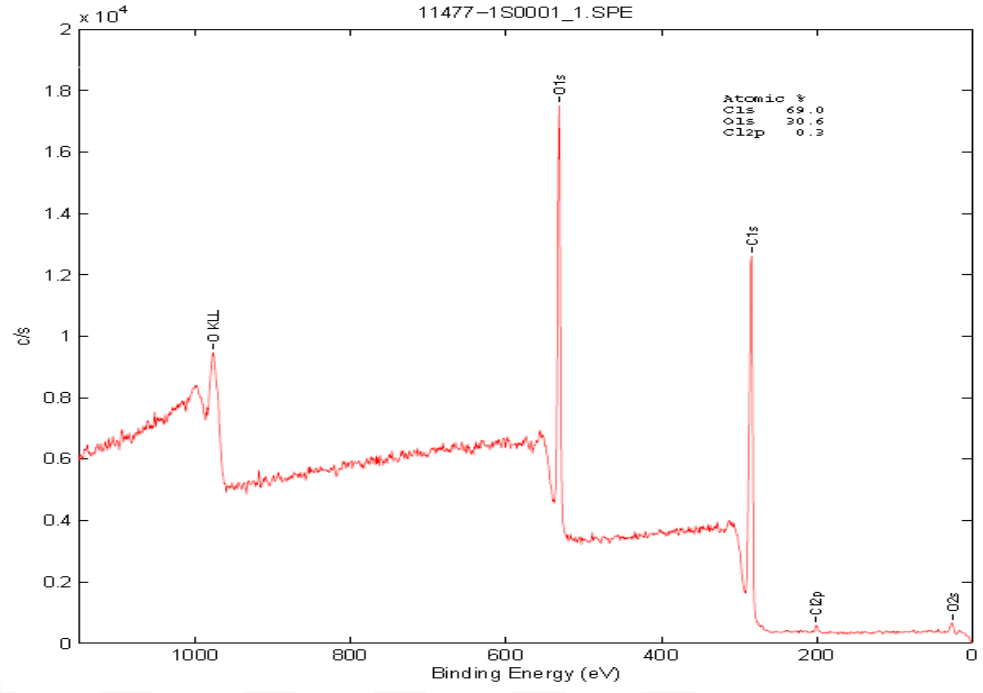
Çizelge 4.21 D4 polimerleri için elementel analiz sonuçları.

Polimer	%C	%H
D4-NIP	42.04	8.39
D4-MIP0	58.08	7.87
D4-MIP	53.86	7.55

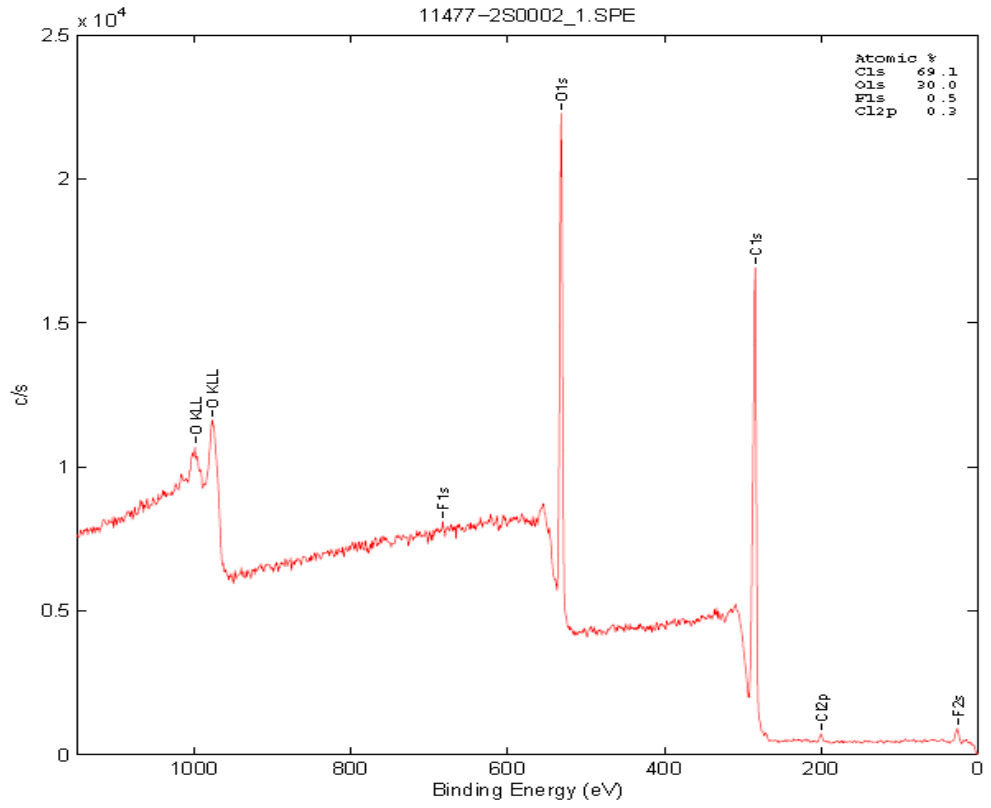
Çizelge 4.21 incelendiğinde verilen oranlar dışında kalan yüzdenin de oksijene ait olduğu düşünülürse yıkama öncesi CG içeren (MIP0) MIP’teki oksijen oranı %34.05, MIP’teki oksijen oranı %38.59, NIP’teki oksijen oranı %49.57 olarak bulunmaktadır. CG 30 karbonlu bir bileşik olduğundan yıkama öncesi MIP’te karbon oranının yüksek olması beklenen bir durumdur. NIP ve MIP’in arasındaki bu fark ise sikloastragenolün polimerizasyon reaksiyonundaki varlığının sentez aşamasında polimer zincirlerinin oluşumuna etki ettiğini ifade etmektedir.

4.12 XPS – X-Işını Fotoelektron Spektroskopi Analizleri

D4-NIP ve D4-MIP polimerlerinin kimyasal karakterizasyonu için XPS analizi yapılmıştır. Sonuçlar Şekil 4.82 ve 4.83’te verilmiştir. XPS analizi polimerin yüzeyindeki elementleri ortaya koyan bir yöntemdir. Şekil 4.82 ve 4.83’teki sonuçlar karşılaştırıldığında D4-NIP’te %69 oranında karbon %30.6 oranında oksijen, D4-MIP’te ise %69.1 oranında karbon ve %30 oranında oksijene sahip olduğu görülmektedir. Aradaki fark çok az da olsa bu analiz sonucunda D4-MIP’in yüzeyindeki karbon miktarının oksijen miktarına göre daha fazla olduğu ortaya konmuştur. Bu sonuçların elementel analiz sonuçları ile uyumlu olduğu anlaşılmaktadır.



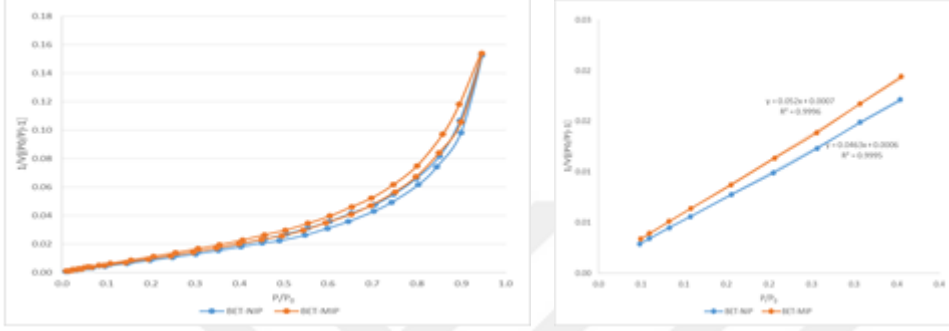
Şekil 4.82 D4-NIP'e ait XPS analizi sonucu.



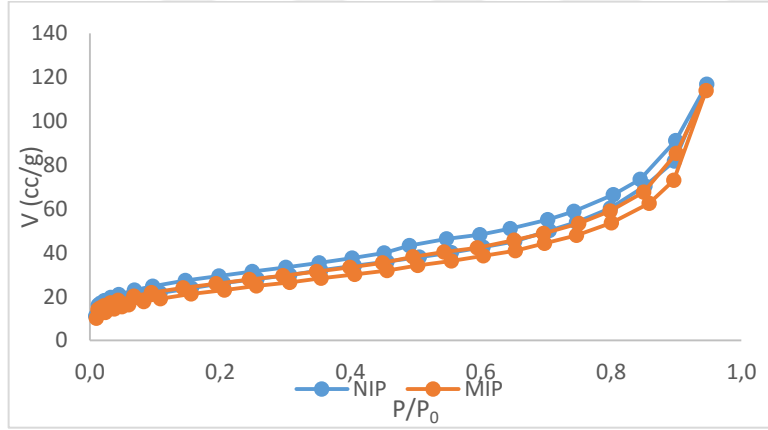
Şekil 4.83 D4-MIP'e ait XPS analizi sonucu.

4.13 BET Analizi ve Gözenek Boyutu Dağılımı Sonuçları

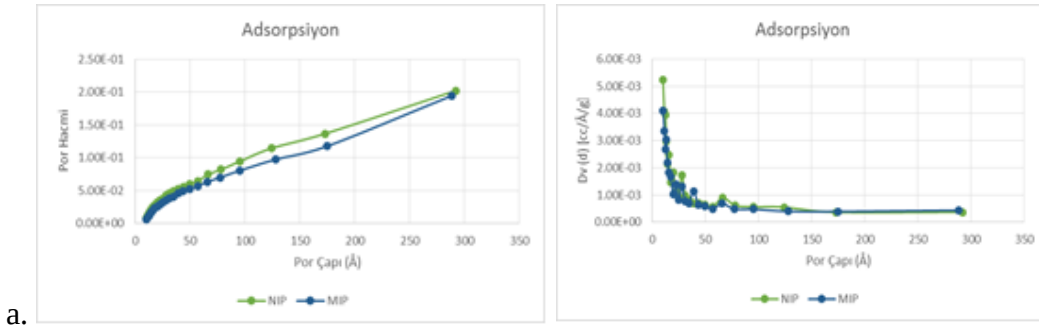
D4-NIP ve D4-MIP polimerlerinin morfolojik karakterizasyonu için BET analizi gerçekleştirilmiştir. Çalışmada çok noktalı BET alanı ve gözenek boyutu dağılımı ölçümü yapılmıştır. Şekil 4.84-4.88’de BET analizi sonucunda elde edilen grafikler verilmiştir. Bu grafikler Çizelge 4.22 ve 4.23’te mevcut olan verilerin eldesi sırasında kullanılan cihaz çıktılarının görsel olarak ifadesidir.



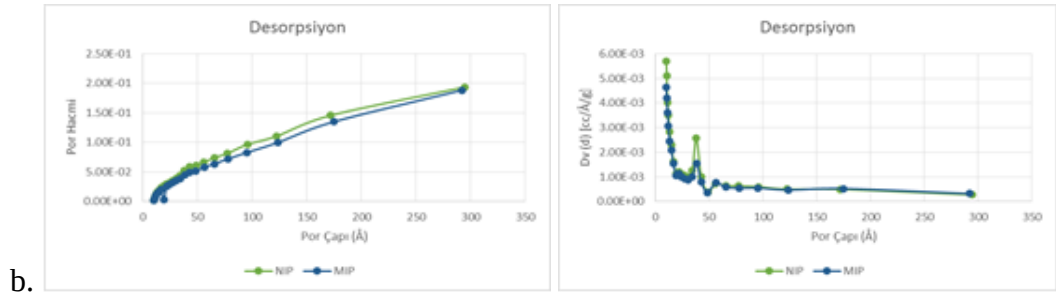
Şekil 4.84 D4-NIP ve MIP için BET analizi sonuçları. a. Tüm analiz b. $0.05 < P/P_0 < 0.35$.



Şekil 4.85 Hacime karşı P/P_0 grafiği.



a.



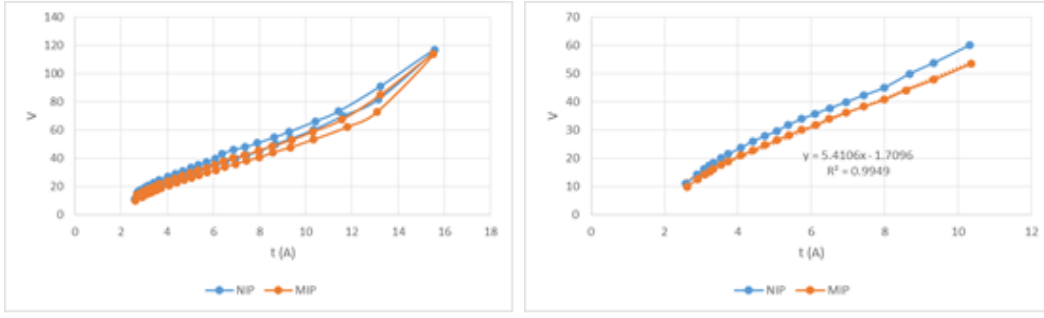
Şekil 4.86 Por çapına bağlı olarak değişim ($Dv(d)$: hacim grafiğinin türevi) a. Adsorpsiyon b. Desorpsiyon.

Çizelge 4.22 BET analizi sonucunda D4-NIP ve MIP için elde edilen adsorpsiyon verileri [BJH: Barrett-Joyner-Halenda Method, DH: Dollimore Heal Method, HK: Horvath-Kawazoe Method, SF: Saito-Foley Method, DR: Dubinn-Radushkevich Method, DA: Dubinin-Astakhov Method].

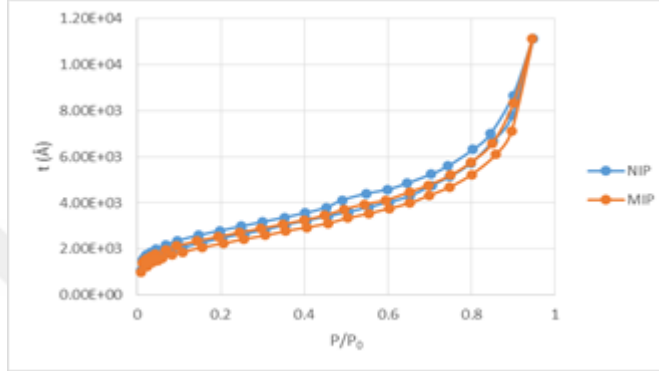
Adsorpsiyon	Yöntem	NIP	MIP
Yüzey alanı (m^2/g)	BJH	173.20	147.80
	DH	179.50	152.50
	Çok noktalı BET	93.61	83.36
	Mikrogözenek	105.50	92.24
Gözenek hacmi (cc/g)	BJH	0.2023	0.1944
	DH	0.1982	0.1901
	HK	0.0367	0.0326
	SF	0.0378	0.0335
	DR-Mikrogözenek Hacmi	0.0376	0.0329
Gözenek Boyutu (nm)	BJH-Gözenek Çapı	1.000	1.015
	DH-Gözenek Çapı	1.000	1.015
	DR-MikroGözenek Genişliği	2.962	2.964
	DA-Gözenek çapı	1.900	1.920
	HK-Gözenek genişliği	0.3675	0.3635
	SF-Gözenek Çapı	0.4477	0.4477

Çizelge 4.23 BET analizi sonucunda D4-NIP ve MIP için elde edilen desorpsiyon verileri [BJH: Barrett-Joyner-Halenda Method, DH: Dollimore Heal Method].

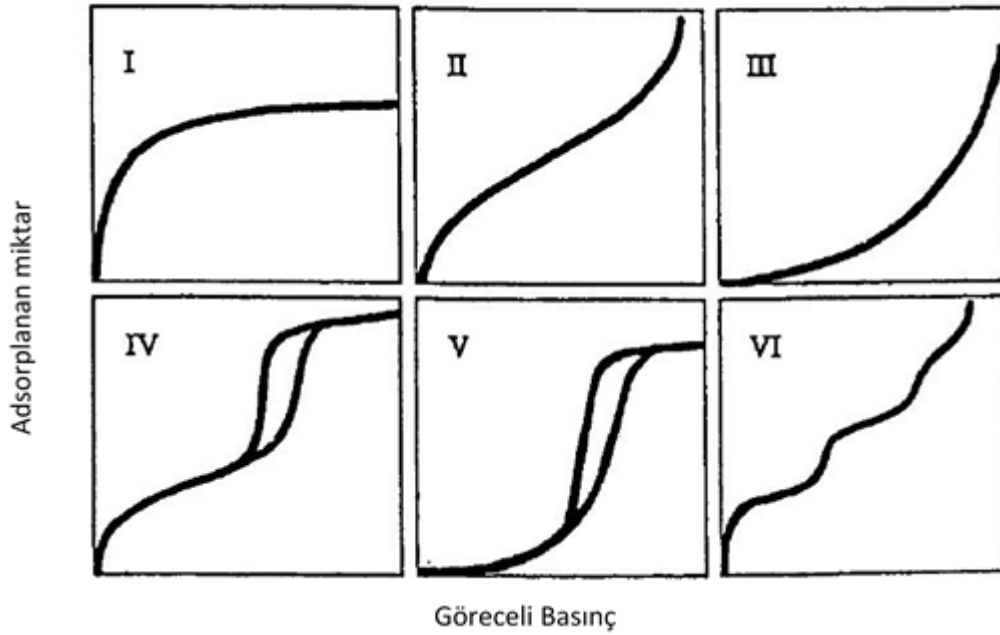
Desorpsiyon	Yöntem	NIP	MIP
Yüzey alanı (m^2/g)	BJH	160.6	144.1
	DH	163.6	146.7
Gözenek hacmi (cc/g)	BJH	0.1936	0.1884
	DH	0.1891	0.1839
Gözenek Boyutu (nm)	BJH-Por Çapı	1.001	0.9929
	DH-Por Çapı	1.001	0.9929



Şekil 4.87 T-grafigi.



Şekil 4.88 P/P_0 'a karşı istatistiksel kalınlık grafiği.



Şekil 4.89 Adsorpsiyon türleri.

Şekil 4.89'da ise geliştirilmiş olarak verilen adsorpsiyon türleri detaylı olarak incelenerek bu çalışma sonucunda elde edilen veriler karşılaştırılmıştır. Şekil 4.84-4.85 ve Çizelge 4.22, D4 polimeri için Tip 2 türü bir adsorpsiyon gerçekleştiğini ortaya koymaktadır. Tip 2'nin genellikle gözeneksiz (fiziksel adsorpsiyonlarda bazen mikrogözenekli) polimerlerde geçerli olan bir adsorpsiyon

türü olduğu bilinmektedir. Çizelge 4.22’de görüleceği üzere D4-NIP ve MIP mikrogözenekli polimerlerdir ($d < 2$ nm).

Çizelge 4.22 ve 4.23’te adsorpsiyon ve desorpsiyon için farklı yöntemlerle hesaplanan yüzey alanı, gözenek hacmi ve gözenek boyutu sonuçları verilmiştir. BJH yöntemine göre NIP ve MIP arasında gözenek boyutu farkı çok az olmasına rağmen bu durum hacim ve yüzey alanı hesabına dönüştürülünce aradaki fark açılmıştır. D4-MIP yüzey alanı olarak NIP’e göre $25.4 \text{ m}^2/\text{g}$, hacimce ise 0.0079 cc/g daha küçüktür. Moleküler baskılanma sonucu MIP’in gözenek boyutu 0.015 nm genişlemiştir. Dolayısıyla yüzey alanı ve hacim olarak MIP daha düşük değerlere sahiptir. Kromatografik izolasyonlarda yüzey alanı azalan bir polimerin adsorpsiyon kapasitesinin azalması beklenmektedir. Çalışmadaki katı faz ekstraksiyonu sonuçları göz önüne alındığında kalıp molekül olan sikloastragenolün izolasyonu için MIP ile daha yüksek geri kazanım oranları elde edilmektedir. Dolayısıyla bu sonuçlar, izolasyonun adsorpsiyon ile değil moleküler baskılama sonucunda gerçekleştiğini kanıtlamaktadır.

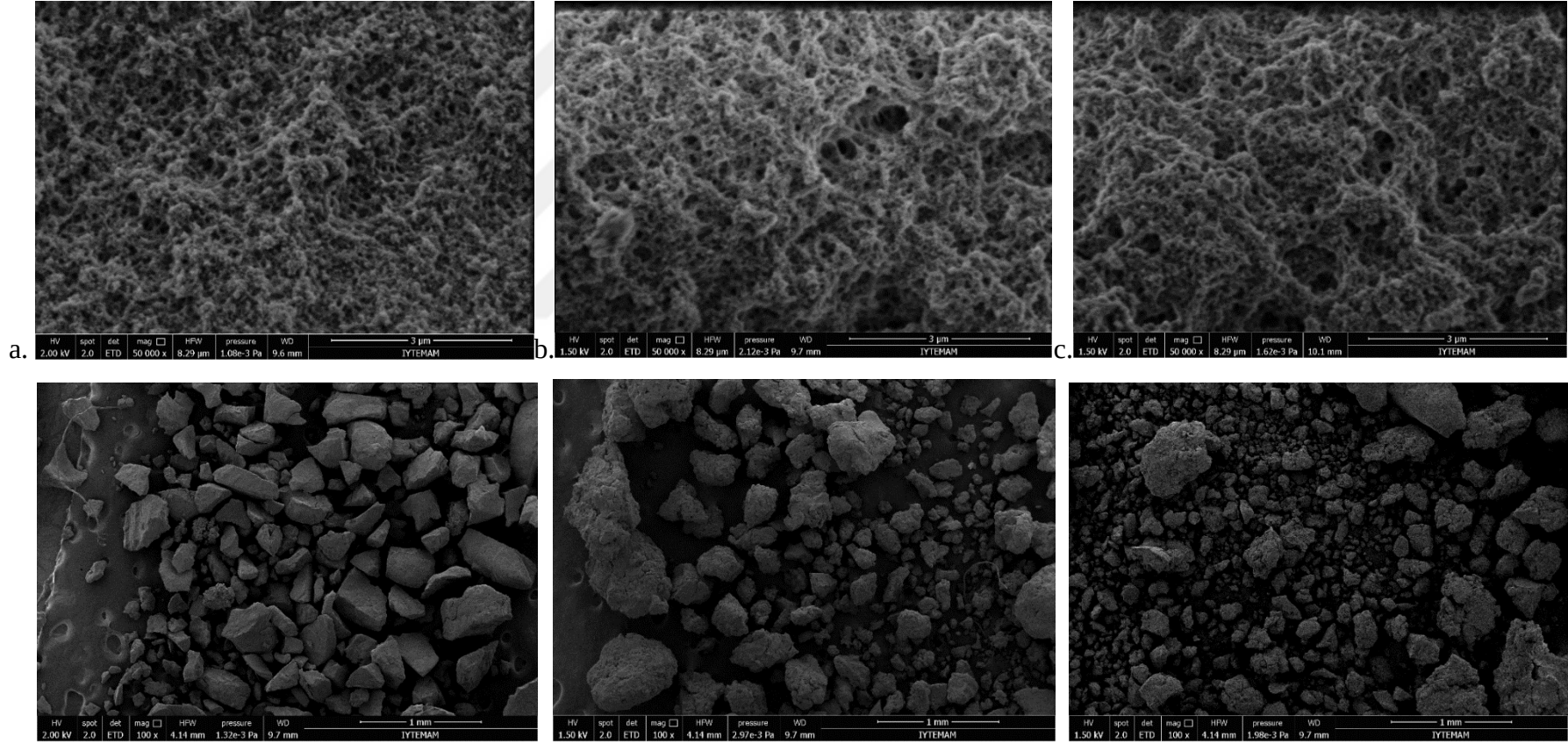
4.14 SEM Analizleri

Proje boyunca sentezlenen polimerlerin morfolojisinin incelenmesi için SEM analizleri gerçekleştirilmiştir.

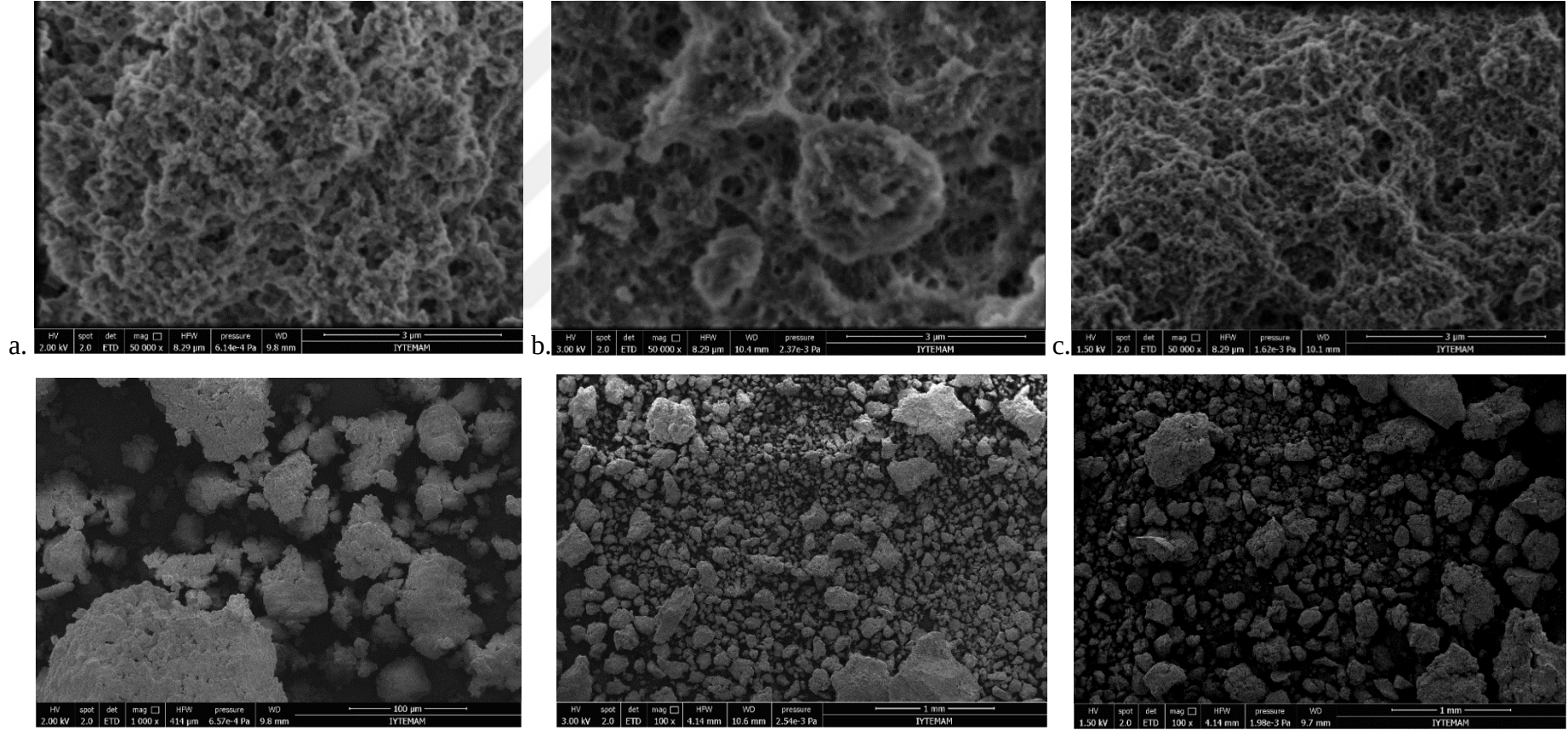
Şekil 4.90’da 1:4:40 (kalıp molekül:monomer:çaprazbağlayıcı) çöktürme polimerizasyonu protokolü ile sırasıyla 10, 20 ve 30 mL porojen kullanılarak sentezlenen polimerler $50000\times$ ve $100\times$ büyütmede karşılaştırılmıştır. Şişme denemeleri sonucunda 10 mL kloroform ile sentezlenen polimerin daha az şişme gösterdiği belirlenmiştir. Şekil 4.90a’da görülen polimerlerin diğerlerine göre daha büyük partiküllere sahip olduğu bu durumda daha az şişme gerçekleşeceği düşünülmektedir. Bölüm 4.9 incelendiğinde bu sonucun doğruluğu görülmektedir. SEM görüntüleri polimerizasyon sırasında kullanılan porojen miktarının beklenildiği üzere partikül boyutunda etkili olduğunu ortaya koymuştur. $50000\times$ büyütme görüntüleri incelendiğinde polimerlerin oluştuktan sonra aglomere halinde kaldığı, gözenekli yapısını koruduğu ancak porojen miktarına göre aglomer boyutlarının değişkenlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Şekil 4.91’de farklı çapraz bağlayıcı oranlarına sahip polimerler 50000x ve 100x büyütmede karşılaştırılmıştır. Şekilde sırasıyla 1:4:20, 1:4:30 ve 1:4:40 (kalıp molekül:monomer:çaprazbağlayıcı) oranlarında çöktürme polimerizasyonu (30 mL CHCl_3) ile sentezlenen polimerler görülmektedir. 50000x büyütme görüntüleri incelendiğinde, 1:4:40 oranı ile sentezlenen polimerlerin daha yoğun bir ağ yapısına ve gözenekliliğe sahip olduğu görülmektedir. Nitekim, bölüm 4.9’da şişme oranlarının 1:4:40’da daha yüksek olduğu belirlenmiştir.





Şekil 4.90 SEM görüntüleri a. D1-4-40-10 NIP b. D1-4-40-20 NIP c. D1-4-40-30 NIP [50000x ve 100x büyütme].

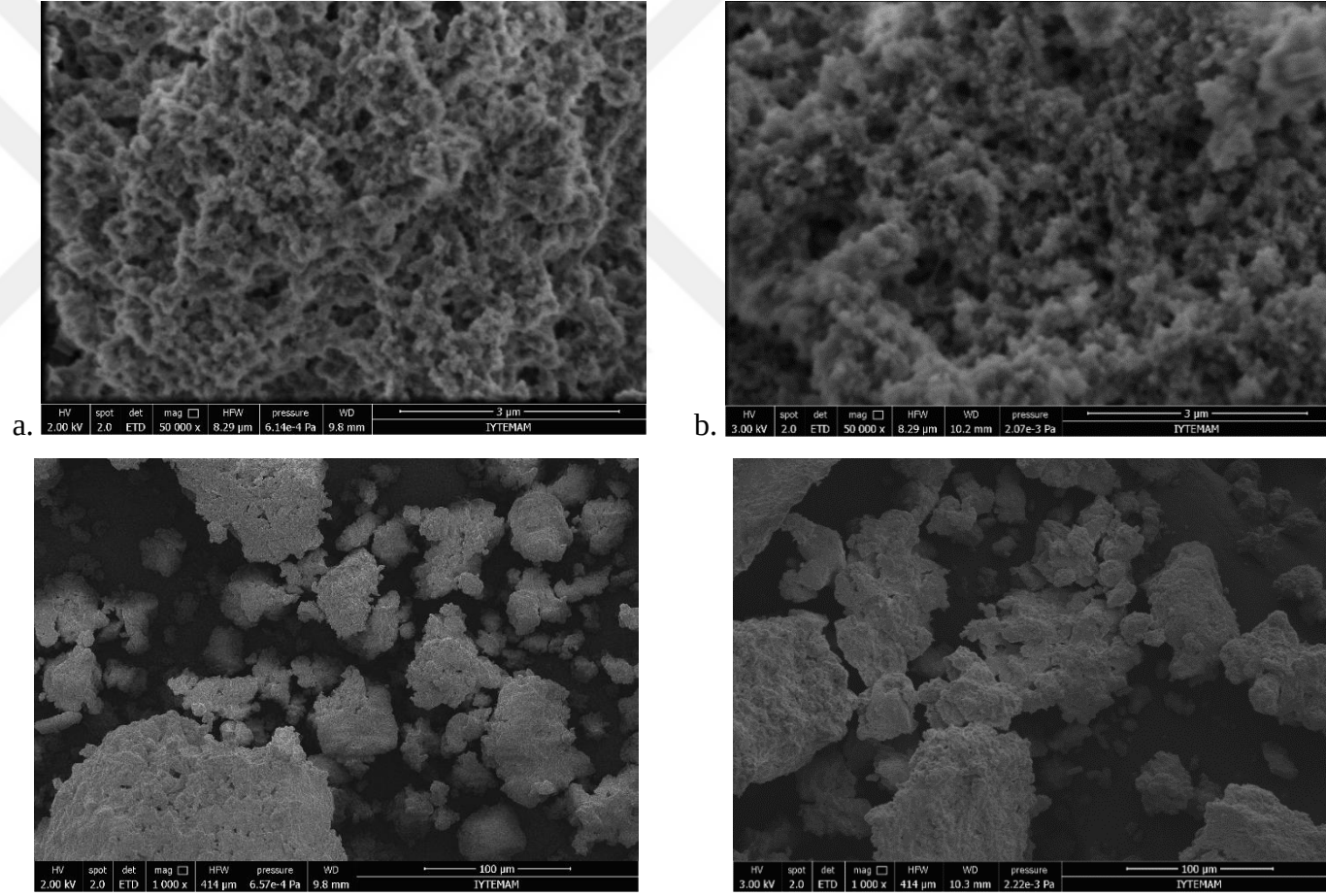


Şekil 4.91 SEM görüntüleri a. D1-4-20-30 (D4) NIP b. D1-4-30-30 NIP c. D1-4-40-30 NIP [50000x ve 100x büyütme].

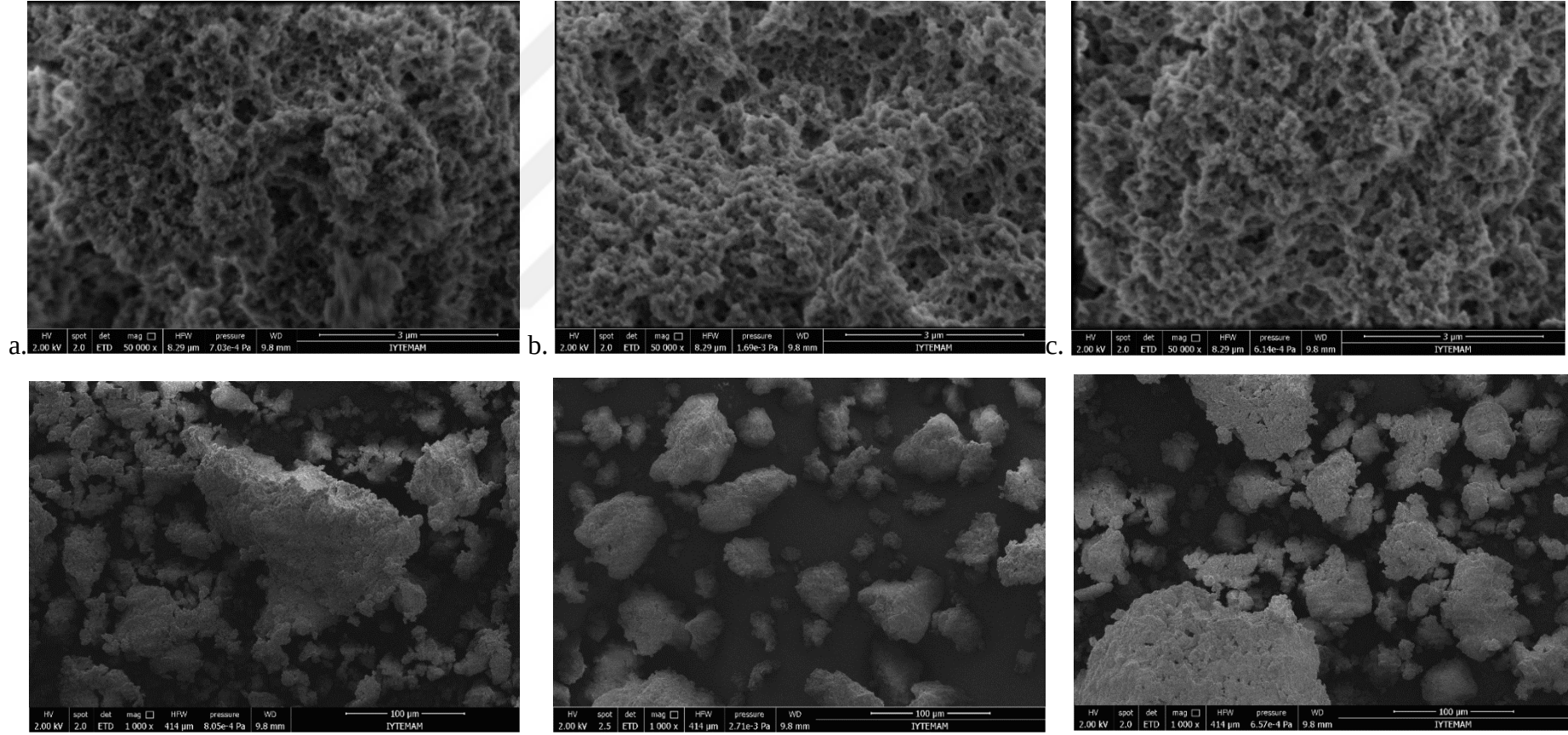
Şekil 4.92’de 1:4:20 (kalıp molekül:monomer:çaprazbağlayıcı) çöktürme polimerizasyonu protokolü ile sırasıyla 30 ve 10 mL porojen kullanılarak sentezlenen polimerler 50000x ve 1000x büyütmede karşılaştırılmıştır. Şişme denemeleri sonucunda 10 mL kloroform ile sentezlenen polimerin daha az şişme gösterdiği belirlenmiştir. Şekil 4.92b’de görülen polimerlerin diğerlerine göre daha büyük partiküllere sahip olduğu ve sonuç olarak da daha az şişme görülmesine neden olduğu ortaya konmuştur.

Şekil 4.93’te 1:4:20 (kalıp molekül:monomer:çaprazbağlayıcı) çöktürme polimerizasyonu protokolü ile sırasıyla yıkama öncesi baskılanmış polimerler ve yıkama sonrası baskılanmış ve baskılanmamış polimerler 50000x ve 1000x büyütmede karşılaştırılmıştır. SEM görüntüleri incelendiğinde baskılanmış polimerlerin baskılanmamış polimerlere göre daha çok gözenekliliğe sahip olduğu görülmektedir.

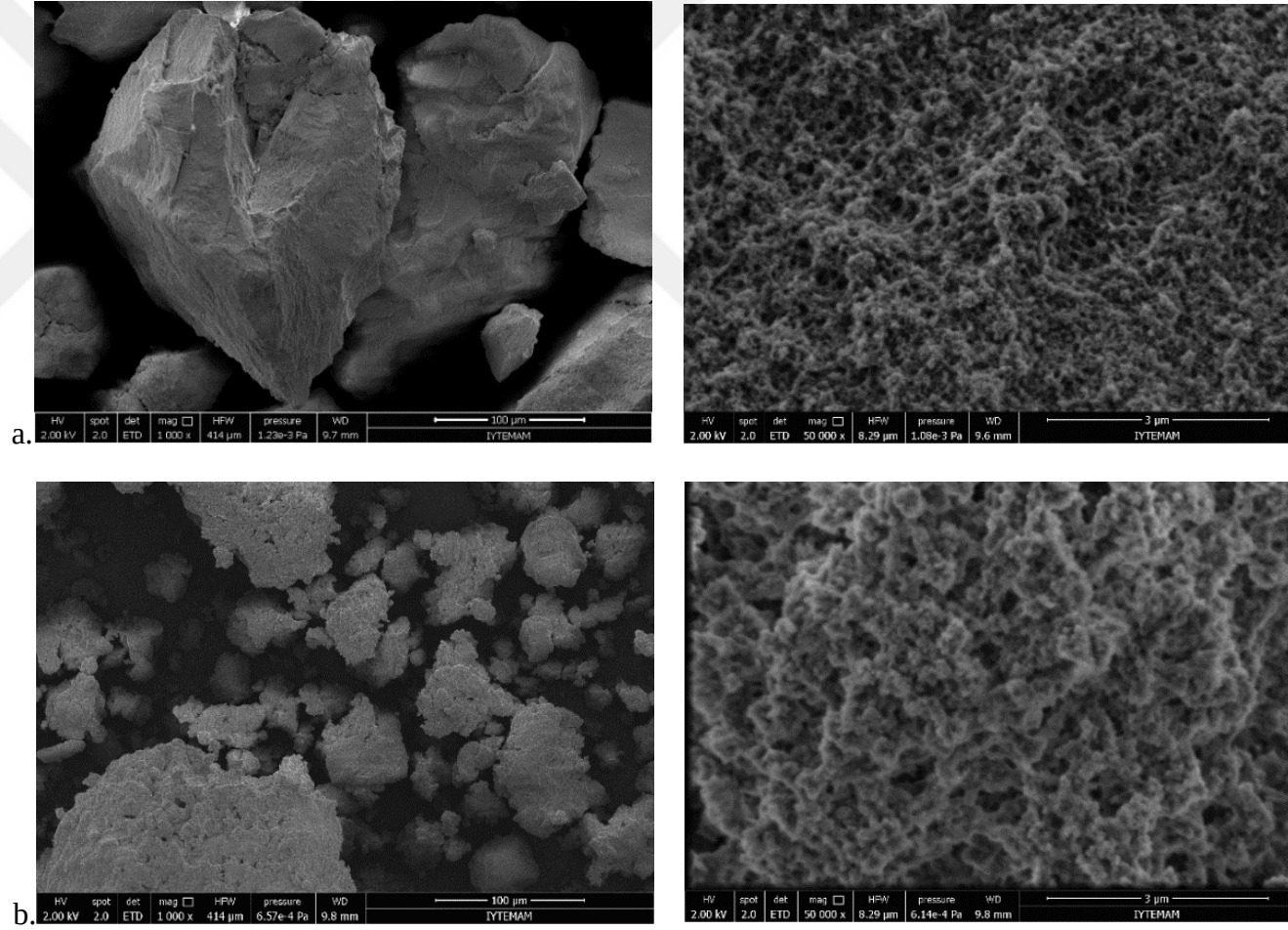
Şekil 4.94’te ise D1-4-40-10 NIP ve D1-4-20-30 (D4) NIP karşılaştırılmıştır. D1-4-40-10 NIP 1:4:40 çöktürme polimerizasyonu protokolü kullanılarak 10 mL porojen ile D4 NIP ise 1:4:20 çöktürme polimerizasyonu protokolü kullanılarak 30 mL porojen ile sentezlenmiştir. SEM görüntüleri incelendiğinde D4 NIP’in daha aglomere bir yapıya sahip olduğu, D1-4-40-10 NIP’in ise daha gözenekli bir yapıya sahip olduğu görülmektedir.



Şekil 4.92 SEM görüntüleri a. D1-4-20-30 (D4) NIP b. D1-4-20-10 NIP [50000x ve 1000x büyütme].



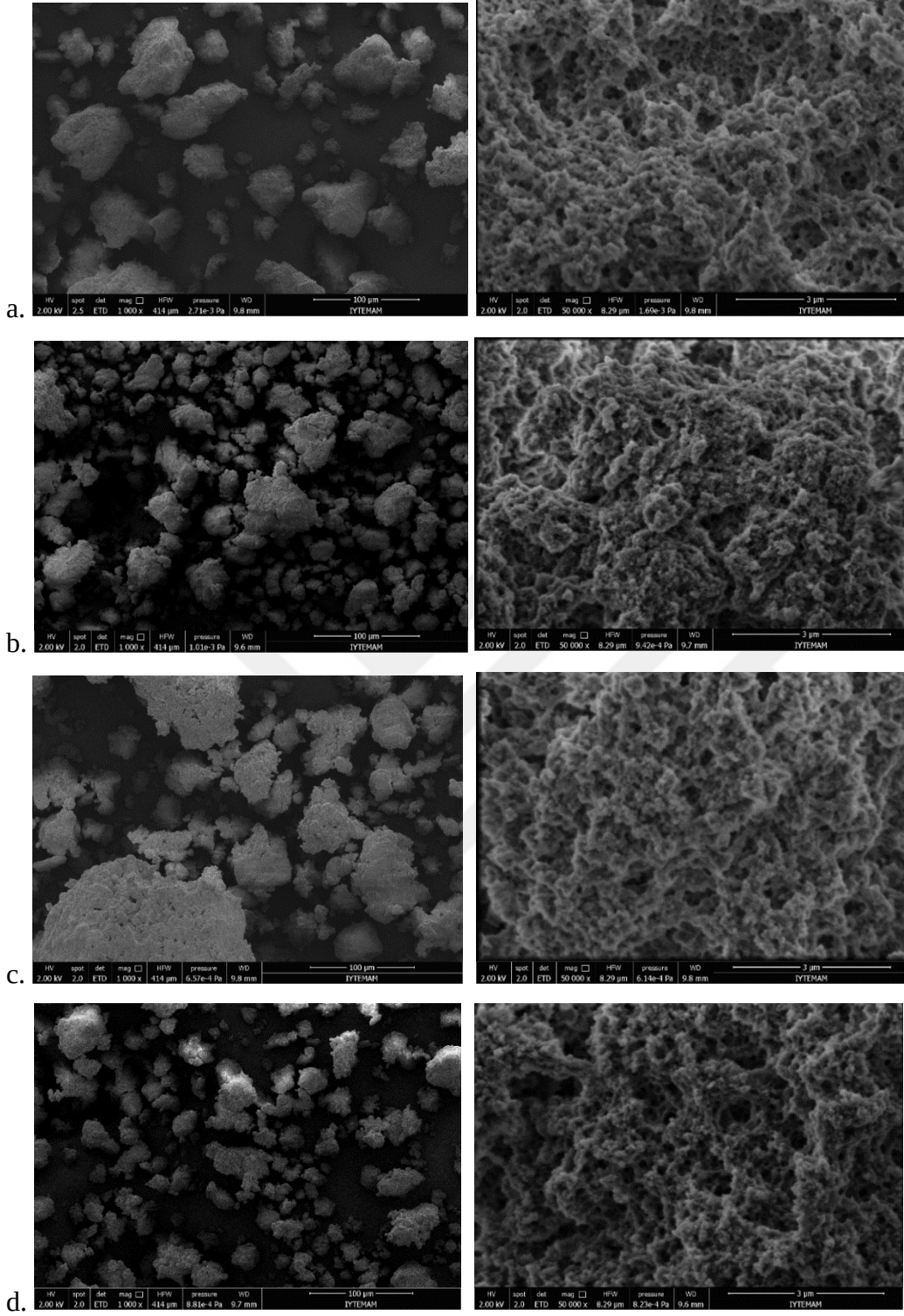
Şekil 4.93 SEM görüntüleri a. D1-4-20-30 (D4) MIP yıkama öncesi b. D1-4-20-30 (D4) MIP c. D1-4-20-30 (D4) NIP [50000x ve 1000x büyütme].



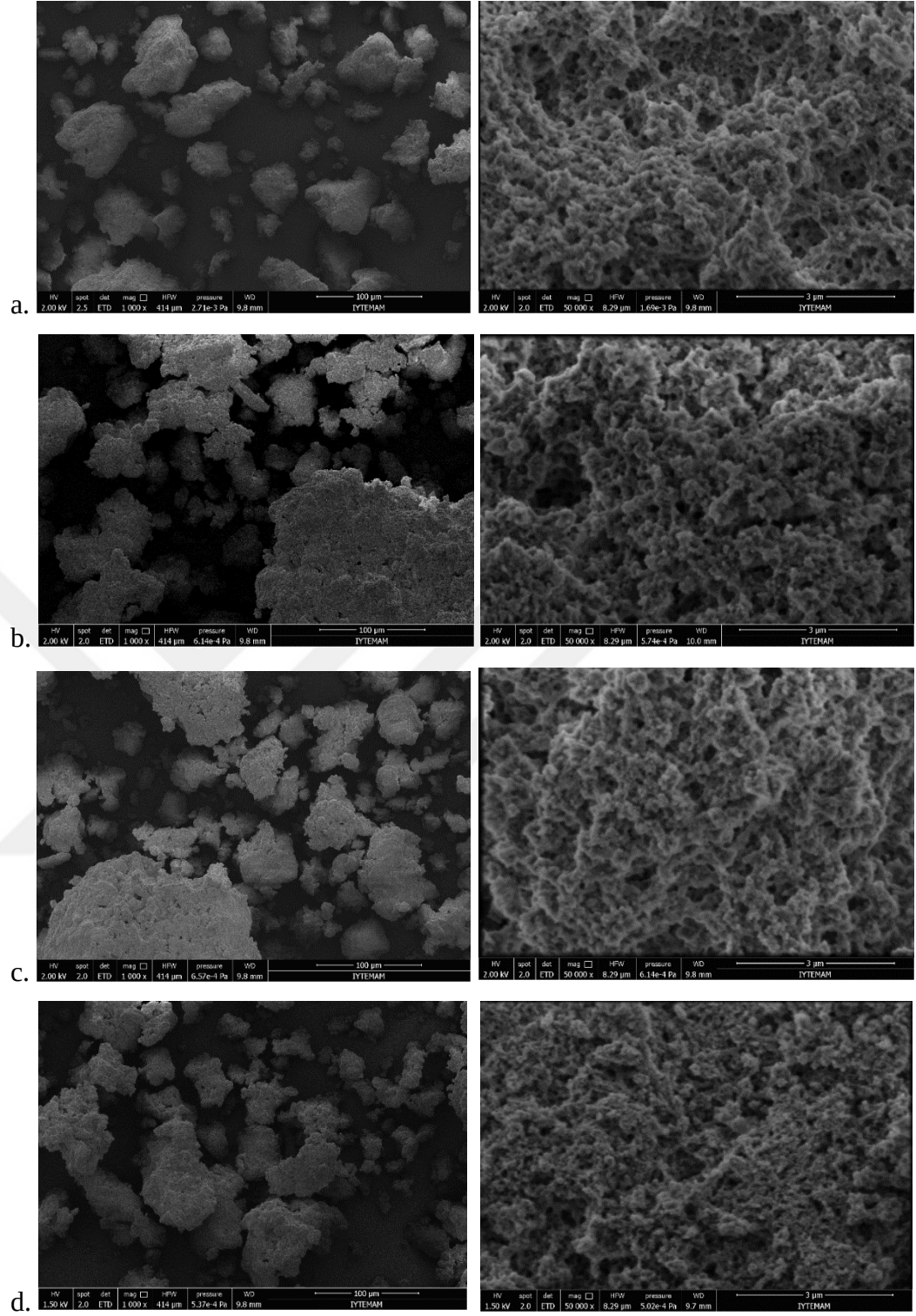
Şekil 4.94 SEM görüntüleri a. D1-4-40-10 NIP b. D1-4-20-30 (D4) NIP [50000x ve 1000x büyütme].

Şekil 4.95’de verilen D1-4-20-30 ve D1-4-20-30 Y polimerleri 1:4:20 (kalıp molekül:monomer:çaprazbağlayıcı) çöktürme polimerizasyonu protokolü kullanılarak 30 mL porojen ile sentezlenmiştir. Aralarındaki fark sentez aşamasındaki sıralamadır (Bölüm 3.2.1.3-3.2.1.4). SEM görüntülerinden morfolojileri karşılaştırıldığında D1-4-20-30 Y polimerlerinin daha gözenekli bir yapıya sahip olduğu görülmektedir. Ayırma performansları karşılaştırıldığında ise saf CG ile yapılan denemelerde D1-4-20-30 Y (D4Y) polimerleri başarılı olmamıştır. Şişme oranları kontrol edildiğinde ise D4Y’nin daha fazla şişme gösterdiği görülmektedir (Bölüm 4.9).

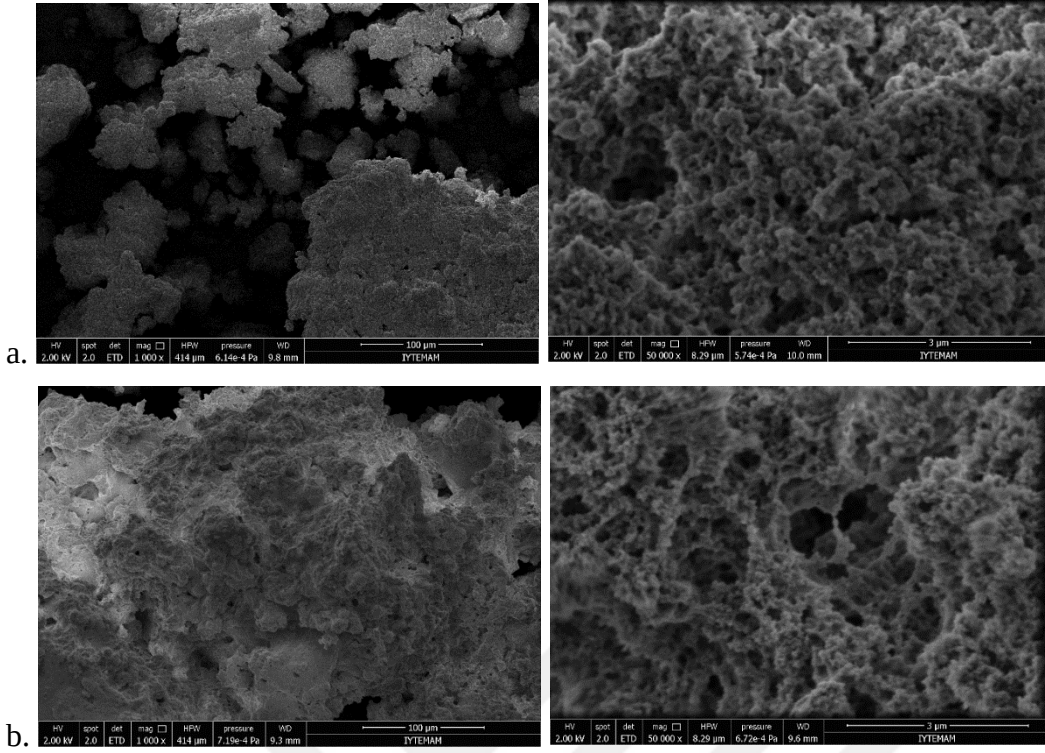
Şekil 4.96’da verilen D1-8-20-30 (D8), 1:8:20 (kalıp molekül:monomer:çaprazbağlayıcı) çöktürme polimerizasyonu protokolü kullanılarak 30 mL porojen ile, D1-4-20-30 (D4) polimeri ise 1:4:20 (kalıp molekül:monomer:çaprazbağlayıcı) çöktürme polimerizasyonu protokolü kullanılarak 30 mL porojen ile sentezlenmiştir. SEM görüntüleri karşılaştırıldığında D8 polimerleri daha belirgin taneciklere sahiptir. Ancak o da D4 polimerleri gibi aglomere formdadır. Şekil 4.97’de ise SEM görüntülerinde ise yıkama öncesi ve yıkama sonrası D8 polimerleri görülmektedir.



Şekil 4.95 SEM görüntüleri a. D1-4-20-30 (D4) MIP b. D1-4-20-30 (DY4) Y MIP c. D1-4-20-30 (D4) NIP d. D1-4-20-30 Y (DY4)NIP [50000x ve 1000x büyütme].

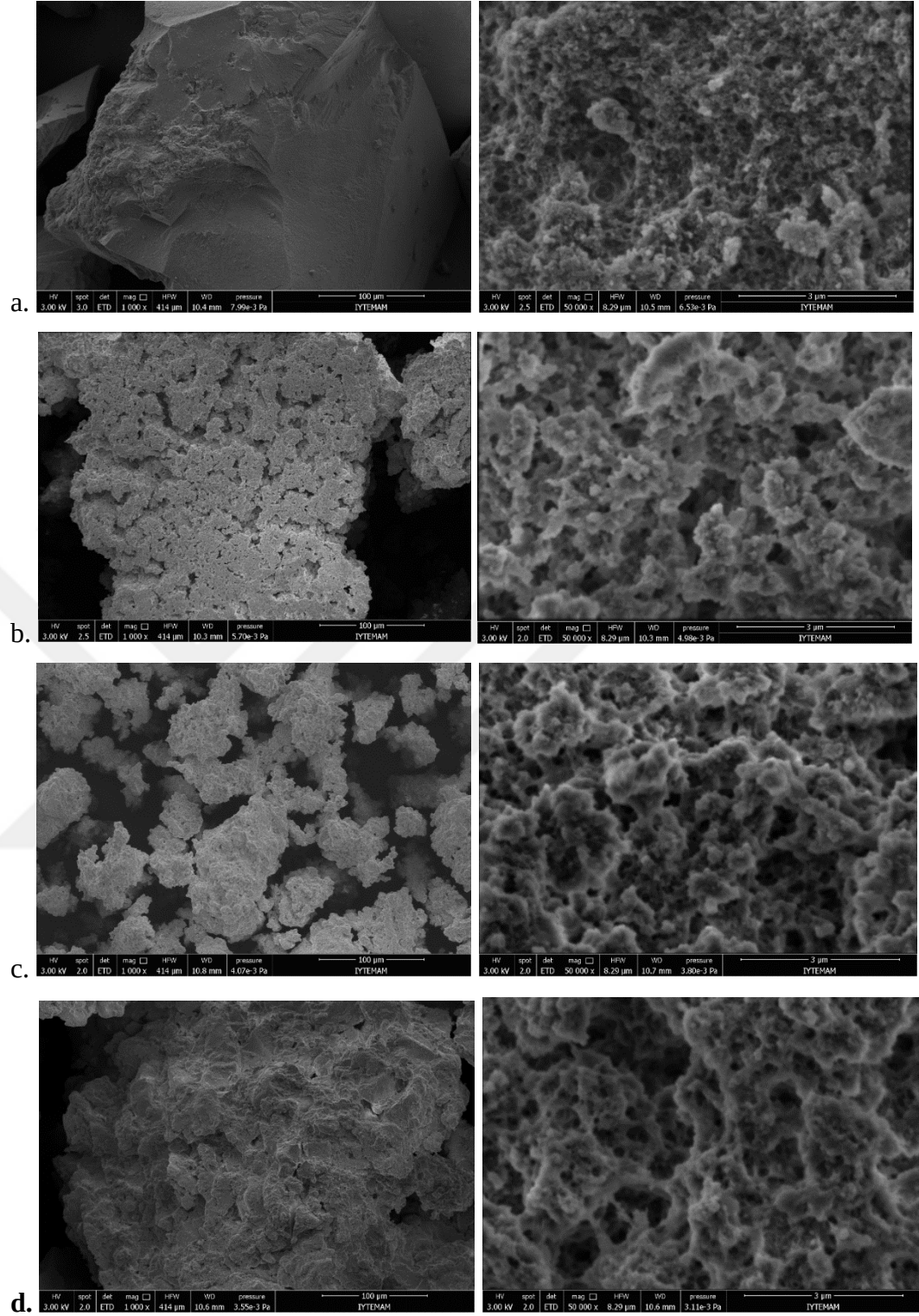


Şekil 4.96 SEM görüntüleri a. D1-4-20-30 (D4) MIP b. D1-8-20-30 (D8) MIP c. D1-4-20-30 (D4) NIP d. D1-8-20-30 (D8) NIP [50000x ve 1000x büyütme].

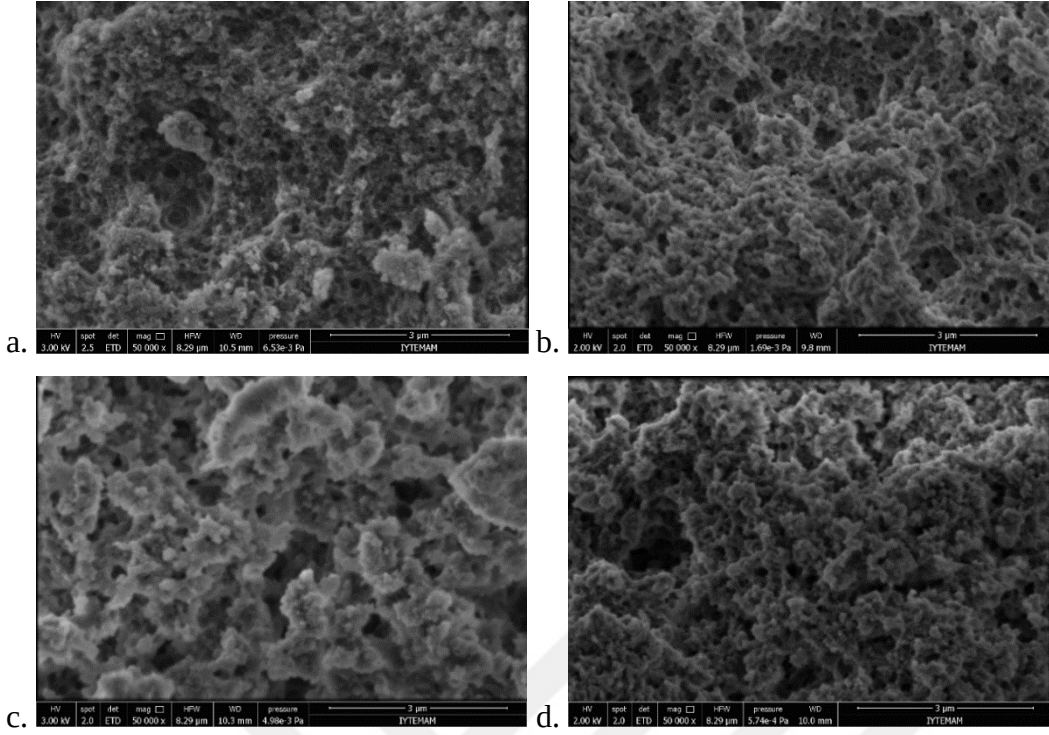


Şekil 4.97 SEM görüntüleri a. D1-8-20-30 (D8) MIP b. D1-8-20-30 (D8) MIP yıkama öncesi [50000x ve 1000x büyütme].

Şekil 4.98’de D3 1:3:20 ve D6 polimerinin SEM görüntüleri verilmiştir. Bölüm 4.9 incelendiğinde D3 polimerinin şişme oranının çok yüksek olduğu göze çarpmaktadır. D3’ün yapısında görülen gözenekler yüksek şişme oranını açıklamaktadır. Şekil 4.99’da ise 4 farklı monomer konsantrasyonuna göre hazırlanmış moleküler baskılanmış polimerlerin SEM görüntüleri verilmiştir. 50000x büyütme oranında yapılar arasında farklılıklar görülebilmektedir.

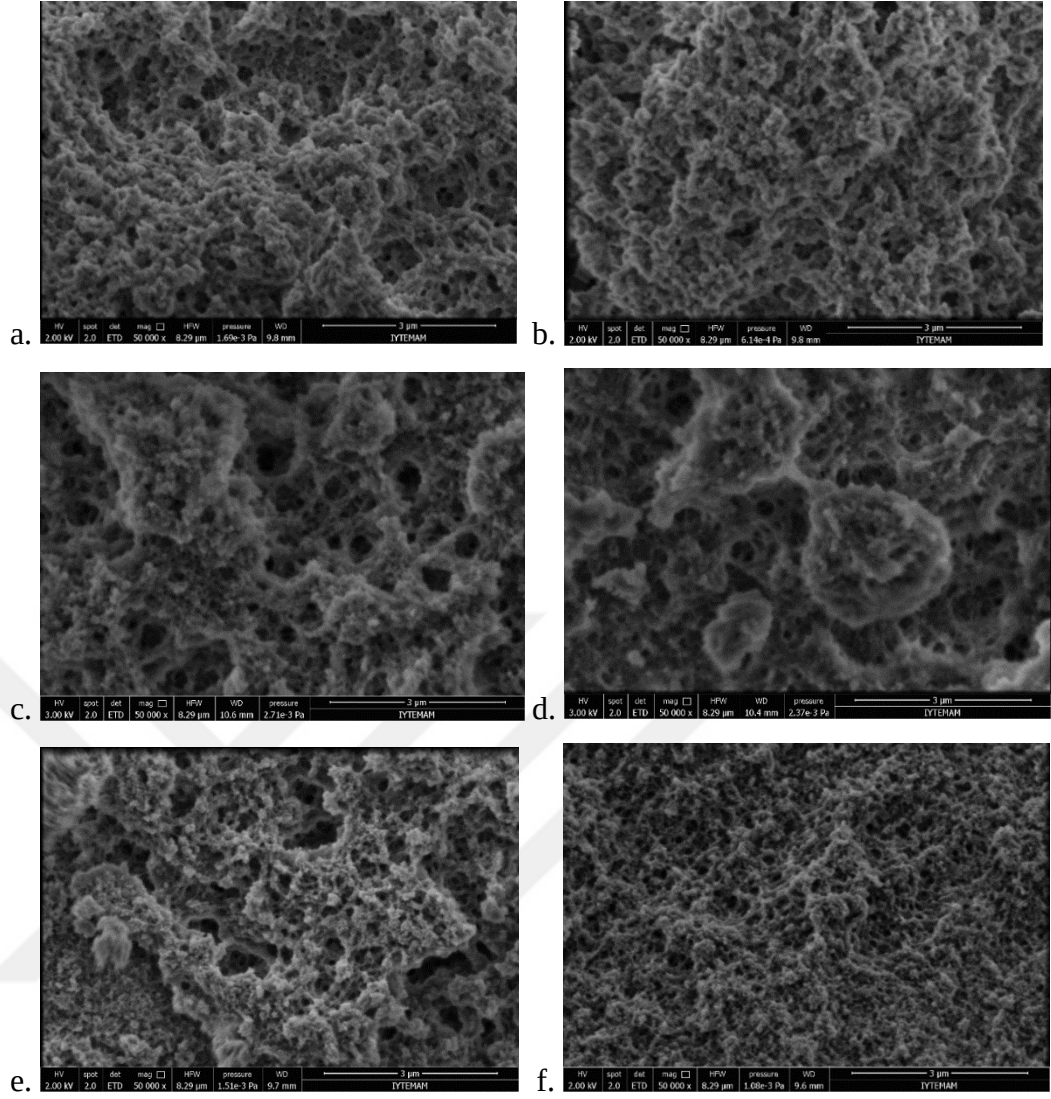


Şekil 4.98 SEM görüntüleri a. D1-3-20-30 (D3) MIP b. D1-6-20-30 (D6) MIP c. D1-3-20-30 (D3) NIP d. D1-6-20-30 (D6) NIP [50000x ve 1000x büyütme].



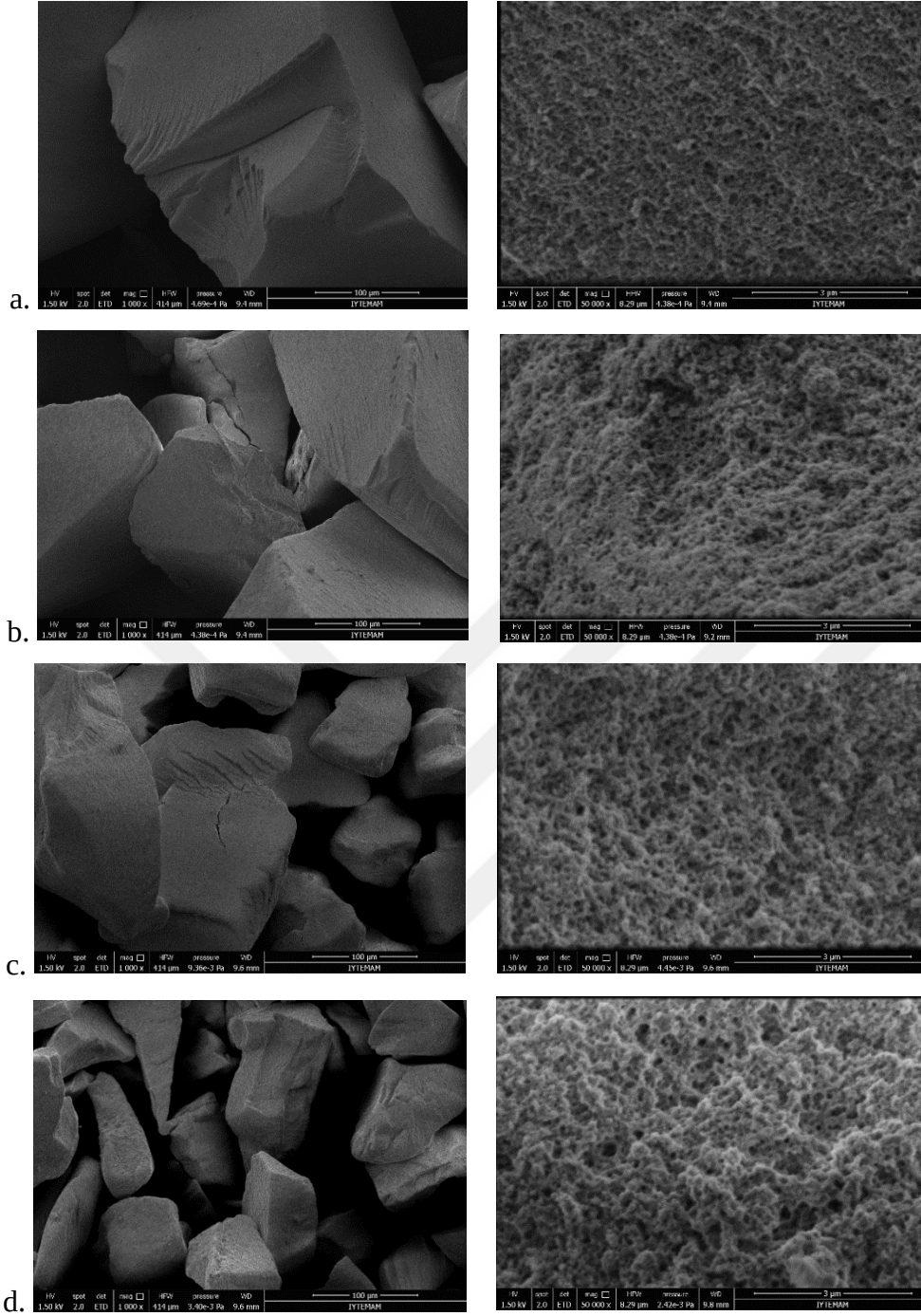
Şekil 4.99 SEM görüntüleri a. D1-3-20-30 (D3) MIP b. D1-4-20-30 (D4) MIP c. D1-6-20-30 (D6) MIP d. D1-8-20-30 (D8) MIP [50000x ve 1000x büyütme].

Şekil 4.100 farklı çapraz bağ oranlarında çalışılan polimerleri bir araya toplamıştır. Görüntüler incelendiğinde çapraz bağın belirgin bir etkisi olmadığı kanaatine varılmıştır.

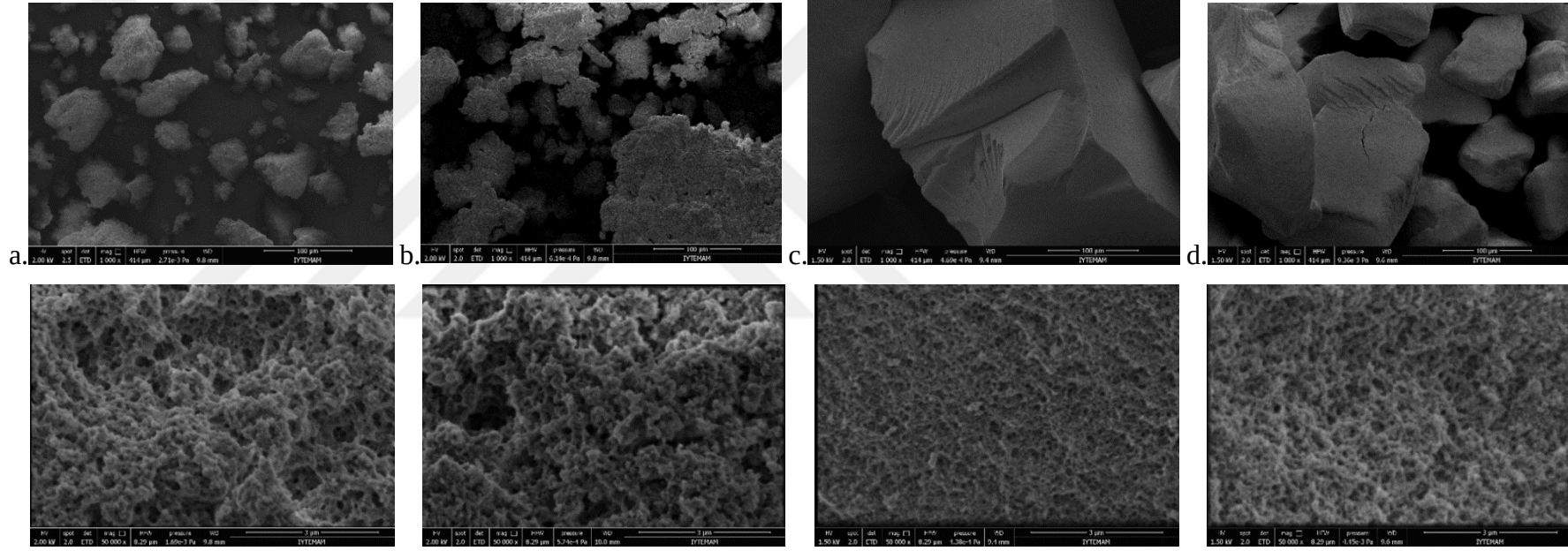


Şekil 4.100 SEM görüntüleri a. D1-4-20-30 (D4) MIP b. D1-4-20-30 (D4) NIP c. D1-4-30-30 MIP d. D1-4-30-30 NIP e. D1-4-40-10 MIP f. D1-4-40-10 NIP [50000x ve 1000x büyütme].

Şekil 4.101’de Y4 polimeri ile Y8 polimerinin SEM görüntüleri verilmiştir. Beklendiği gibi monomer oranı arttıkça partikül çapı azalmıştır. Şekil 4.102 ise çöktürme polimerizasyonu ve yığın polimerizasyonu ile elde edilen polimerlerin arasındaki morfolojik farkları ortaya koymaktadır.



Şekil 4.101 SEM görüntüleri a. Y4 MIP b. Y4 NIP c. Y8 NIP d. Y8 Y NIP [50000x ve 1000x büyütme].



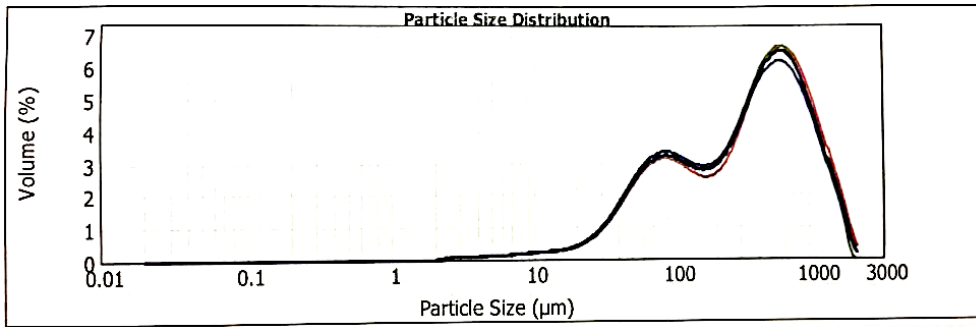
Şekil 4.102 SEM görüntüleri a. D1-4-20-30 (D4) MIP b. D1-8-20-30 (D8) MIP c. Y1-4-20 (Y4) MIP d. Y1-8-20 (Y8) MIP

SEM görüntüleri incelendiğinde D4-MIP polimerinin 50000x büyütmesinde ortalama gözenek boyutu yaklaşık 114 nm olarak ölçülmektedir. D4-NIP için ise ortalama gözenek boyutu yaklaşık 55 nm olarak ölçülmektedir. BET sonuçlarına bakıldığında ise gözenek boyutu D4-MIP için 1.015 nm D4-NIP için ise 1.000 nm'dir. Sikloastragenol ise yaklaşık 14 bağ uzunluğundadır yani yaklaşık 2 nm uzunluğa sahiptir. Bu durumda BET analizleri ile polimerin yapı bütünlüğü konusunda bilgi sahibi olunduğu, SEM analizleri ile ise daha yüzey morfolojisi ile ilgili bilgi edinildiği görülmektedir. Heterojen yapıya sahip olduğu adsorpsiyon izotermiyle de belirlenen bu polimerlerde CG için gerekli boşlukların yer aldığı ancak mikrogözeneklere komple yerleşemeyeceği sadece bazı noktalarından tutunabileceği bu analizler sonucunda ortaya konmuştur.

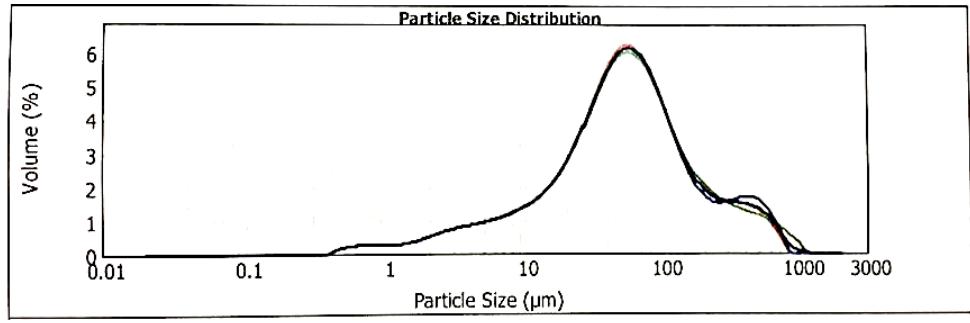
4.15 Parçacık Boyutu Analizi

Çalışma kapsamında lazer yöntemiyle parçacık boyutu analizi gerçekleştirilmiştir. Analizler suda gerçekleştirilmiştir.

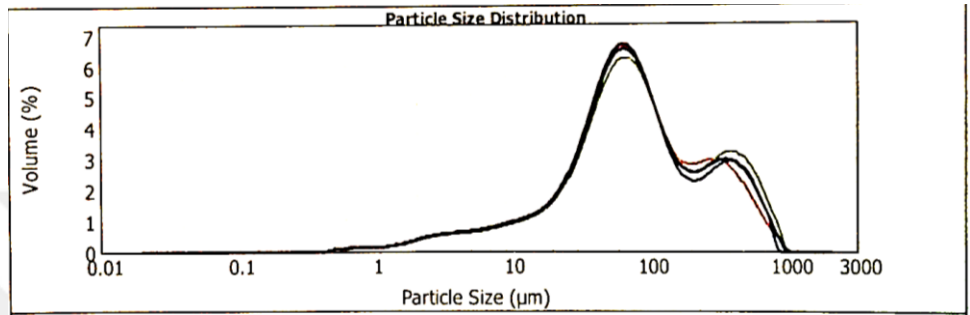
D4NIP ve D4MIP ve de D8NIP ve D8MIP parçacık boyutu bakımından karşılaştırıldığında baskılanmamış polimerlerin daha küçük partikül boyutuna sahip olduğu anlaşılmaktadır (Şekil 4.103-4.106). Moleküler baskılanmış polimerler D4MIP ve D8MIP karşılaştırıldığında ise D8MIP'in genel dağılımının daha küçük partiküllerden oluştuğu görülmektedir (Çizelge 4.24). Benzer şekilde SEM görüntülerinde de D8MIP'in D4MIP'e göre daha gözenekli ve daha küçük tanecikli bir yapısı olduğu ortaya konmuştur (Şekil 4.96).



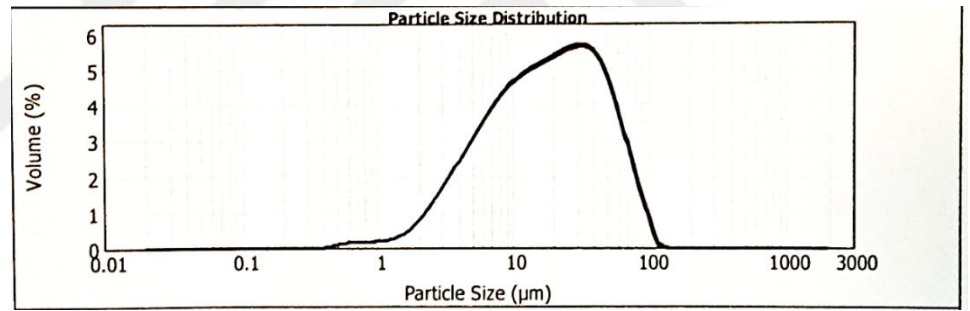
Şekil 4.103 D4MIP



Şekil 4.104 D4NIP

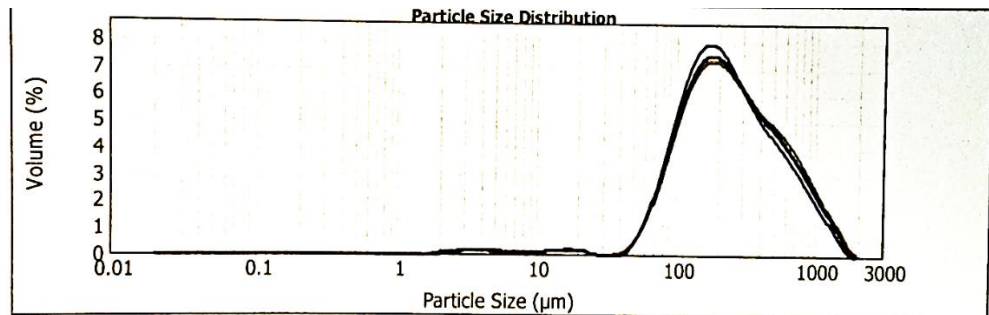


Şekil 4.105 D8MIP

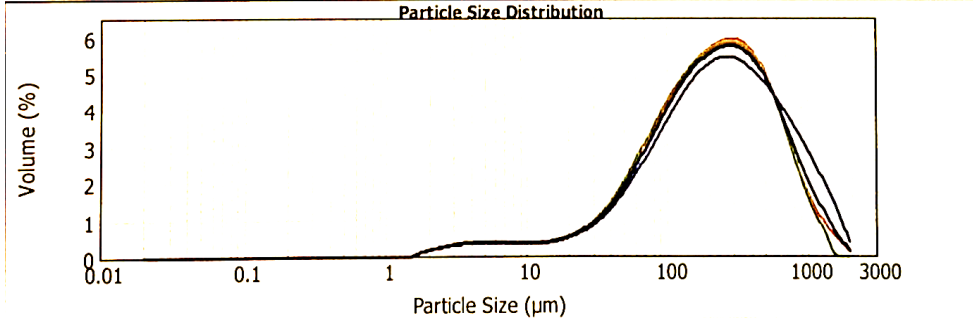


Şekil 4.106 D8NIP

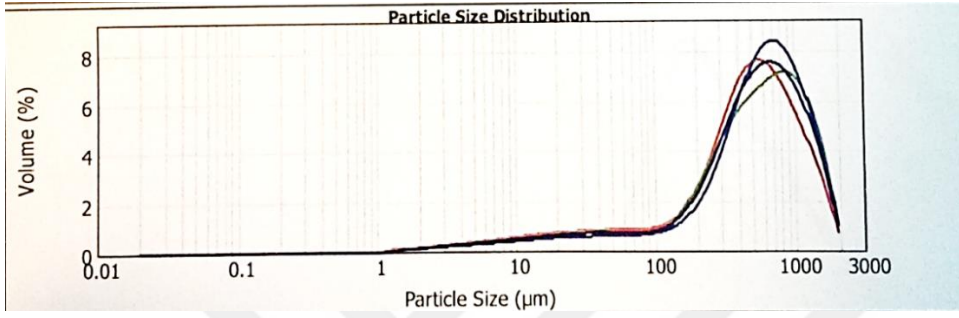
Y4 ve Y8 polimerleri yığın polimerizasyonu ile sentezlendikleri ve havanda dövülerek küçük partiküllere parçalandıkları için benzer profil göstermişlerdir (Şekil 4.107-4.110).



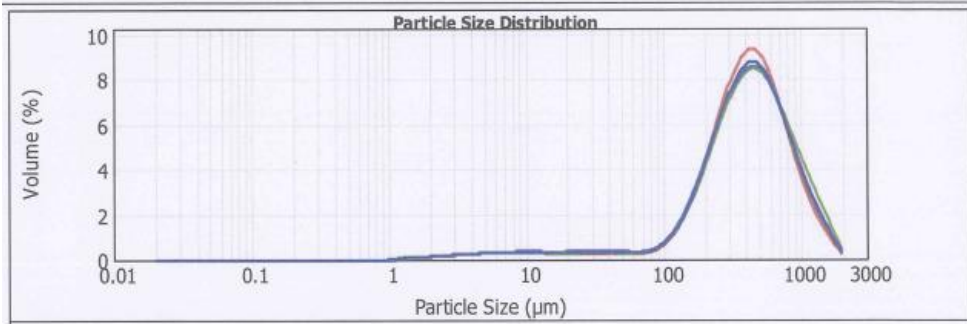
Şekil 4.107 Y4MIP



Şekil 4.108 Y4NIP

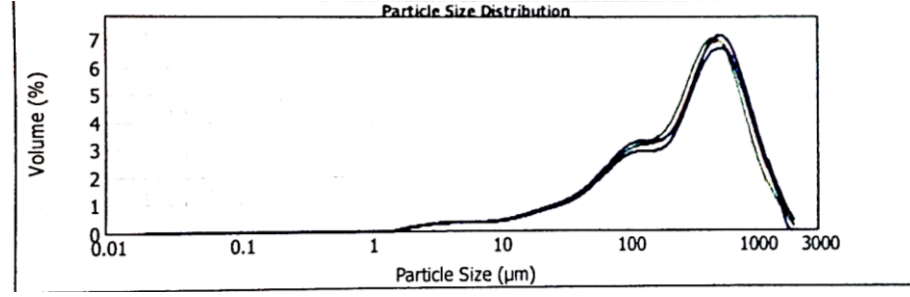


Şekil 4.109 Y8NIP

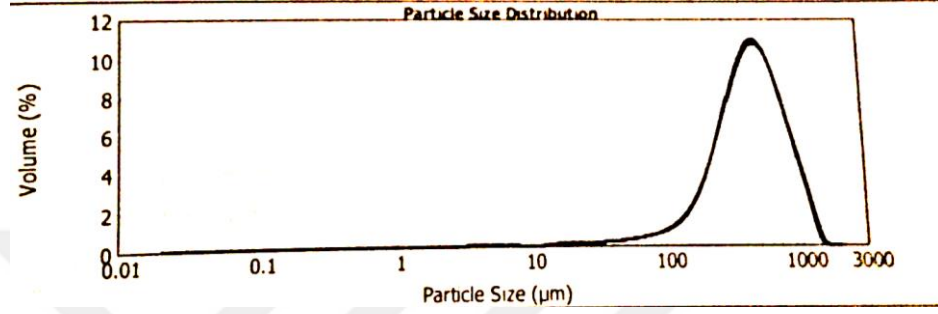


Şekil 4.110. Y8MIP

D1-4-40 ile D4 polimerleri arasında yalnızca çapraz bağlayıcı miktarı (sırasıyla 1:4:40 ve 1:4:20) farkı bulunmaktadır. İki polimer birbiriyle karşılaştırıldığında MIP'lerde benzer profil görülse de NIP'ler arasında farklılık göze çarpmaktadır. D1-4-40 daha homojen bir dağılıma sahiptir. Hem NIP hem de MIP için D1-4-40 polimerlerinin daha büyük partiküllü olduğu söylenebilmektedir (Şekil 4.111-4.112).



Şekil 4.111. D1-4-40MIP



Şekil 4.112. D1-4-40NIP

Çizelge 4.24 incelendiğinde partikül boyutları arasındaki farklılıklar açıkça görülmektedir. D8 polimerinde tıkanma yaşanması hacime bağlı ortalama çapın D4'e göre daha küçük olması olarak yorumlanabilmektedir.

Çizelge 4.24. Örneklerde çap dağılımı.

	Yüzeye bağlı ortalama çap (μm)	Hacime bağlı ortalama çap (μm)
D4MIP	109.349	441.856
D4NIP	14.234	97.047
D8MIP	23.009	139.191
D8NIP	9.291	24.837
Y4MIP	121.055	335.756
Y4NIP	60.985	318.465
Y8MIP	76.970	490.698
Y8NIP	74.412	604.174
D1-4-40-MIP	74.297	435.585
D1-4-40-NIP	292.486	496.737

4.16 Basınç Düşmesi ve Ölçek Büyütme Verileri

Bölüm 3.2.4'te de belirtildiği gibi excel programında durum çözümlemesi fonksiyonu kullanılarak lineer akış hızı ve basınç düşmesi sabitlenen kolonlarda ölçek büyütmesi gerçekleştirilmiştir. Ancak yapılan denemelerde akış hızları değişiklik gösterdiğinden hesaplamalarda kullanılan lineer akış hızına ve basınç farkına ulaşılamamıştır. Sonuç olarak kolon boyunca basınç farkı 0.40 ± 0.01 Pa olacak şekilde kolonlar tekrar yüklenmiş ve kullanılması gereken polimer miktarları tespit edilmiştir. Basınç farkı hesapları Bölüm 3.2.4'te verilen Ergun denklemi kullanılarak yapılmıştır. Çizelge 4.25'te ölçek büyütme için hesaplanan değerler ile uygulama sırasında ortaya konan çalışma koşulları verilmiştir.

Çizelge 4.25. Ölçek büyütme hesaplarında elde edilen değerler ile çalışma koşulları.

Hesaplama				Çalışma Koşulları				Polimer Miktarı (g)
D (cm)	H (cm)	v (cm/s)	ΔP (Pa)	D (cm)	H (cm)	v (cm/s)	ΔP (Pa)	
1.8	1.8	13.11	0.40	1.8	1.8	13.11	0.40	1
2.7	2.2	13.11	0.39	2.7	3	6.83	0.41	2.5
4	4.1	13.11	0.40	4	4.4	11.06	0.40	10
12	5.8	13.11	0.40	12	6.5	10.72	0.41	100

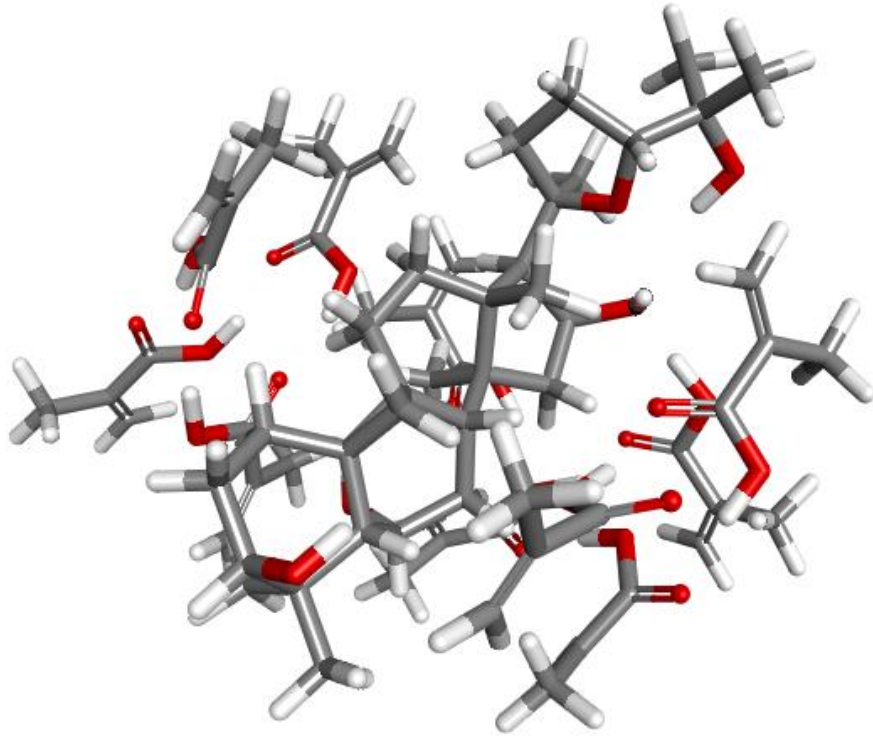
4.17 Hesapsal İnceleme

Bu çalışma kapsamında, CG ile MAA monomerleri arasındaki etkileşimler incelenmiştir. Buradaki amaç, CG ile MAA monomerlerinin etkileşim noktalarını tespit etmektir. Olası etkileşimleri tespit etmek amacı ile bölüm 3.2.6'da da belirtildiği gibi öncelikle Spartan programında moleküler mekanik yöntem kullanılarak 10 MAA molekülü ve CG arasındaki konformasyonlar elde edilmiştir.

Çizelge 4.26'da 1:10 CG:MAA oranı ile elde edilen konformasyonlardan en düşük enerji seviyesine sahip 10 yapı verilmiştir. Çizelge 4.26 incelendiğinde M0134 ve M0054 kodlu konformasyonların en düşük enerji seviyelerine sahip olduğu anlaşılmaktadır. En kararlı yapılardan yarı-ampirik çalışmalarında en hızlı sonuç veren yapı M0054 kodlu konformasyon olmuştur. Bu noktadan itibaren hesapsal çalışmalar M0054 konformasyonu baz alınarak devam ettirilmiştir. Şekil 4.113'te M0054 görülmektedir.

Çizelge 4.26 1:10 kalıp molekül:MAA oranı için PM6-DH2 hesaplamaları sonucuna göre en kararlı 10 yapı.

Konformasyon kodları	HF(kcal/mol)	Erelatif
M0134	-1348.27	0.00
M0054	-1347.77	0.50
M0052	-1346.69	1.58
M0125	-1345.82	2.45
M0142	-1344.14	4.13
M0105	-1342.42	5.85
M0178	-1342.17	6.10
M0011	-1341.41	6.86
M0038	-1341.34	6.93
M0180	-1341.22	7.05



Şekil 4.113 M0054 kodlu konformasyon.

Katı faz ekstraksiyonu çalışmalarına göre en iyi sonuç elde edilen kalıp molekül:monomer oranı 1:4 olarak belirlendiğinden, M0054 molekülü için 1:10 konformasyonunda CG ile etkileşimi görülmeyen 6 MAA monomeri çıkartılarak hesapsal tasarım 1:4 kalıp molekül:monomer oranı (M0054_4) ile sürdürülmüştür.

Çizelge 4.27’de M0054 konformasyonuna göre 1:4 oranında hesaplanan yarı-ampirik çalışmanın sonuçları yer almaktadır.

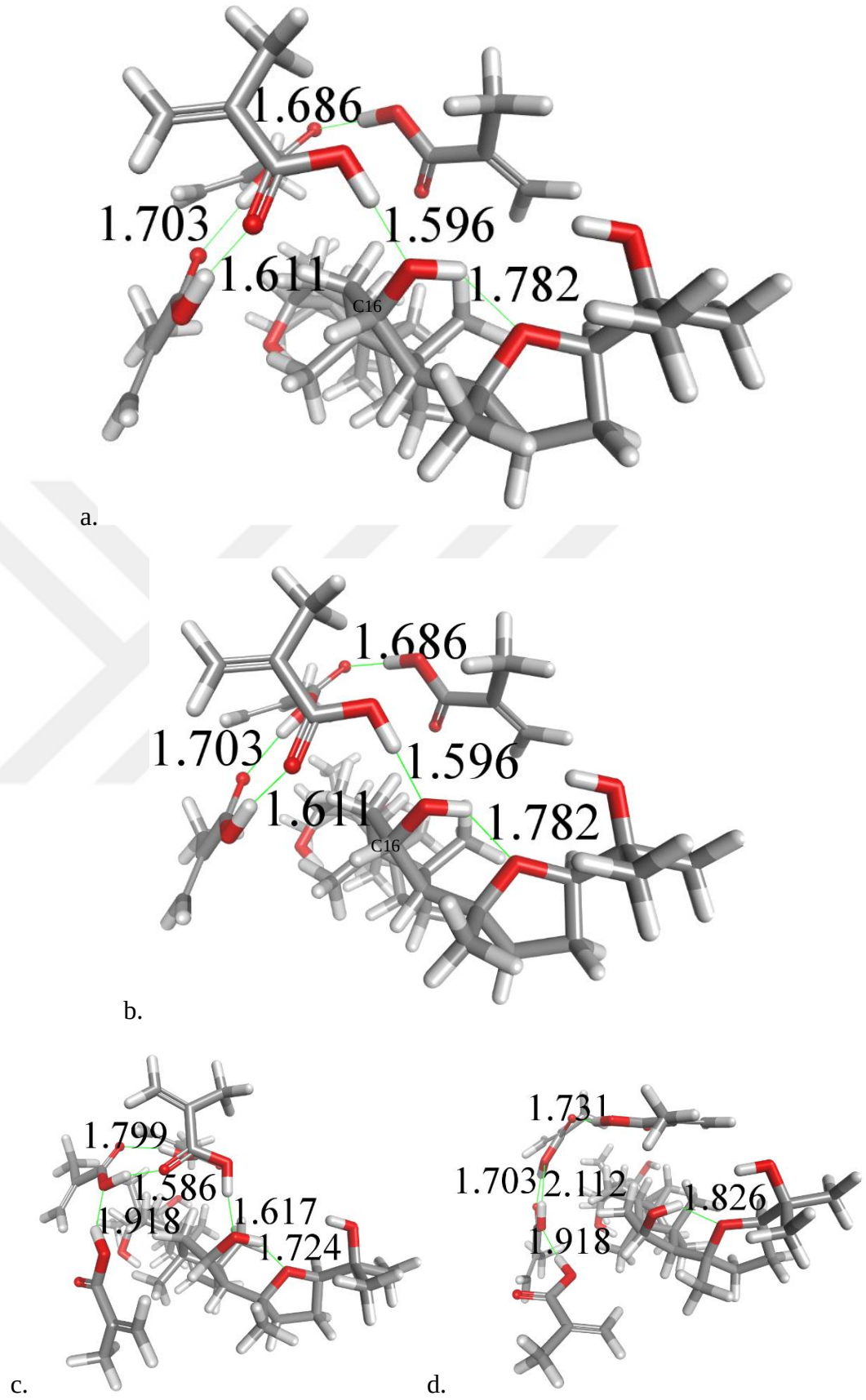
Çizelge 4.27 En kararlı dörtlü için PM6-DH2 hesaplamaları sonuçları.

Konformasyon kodları	HF(kcal/mol)	E _{relatif}
M0054_4_4	-736.65	0.00
M0054_4_2	-732.77	3.87
M0054_4_1	-730.17	6.48
M0054_4_3	-725.25	11.40
M0054_4_5	-720.81	15.84

Bölüm 3.2.6’da belirtildiği gibi en kararlı yapılardan yoğunluk fonksiyoneli teorisi (DFT) yöntemi ile ω B97xD fonksiyoneli 6-31g(d,p) baz setinde optimizasyonu ve frekans analizi çalışmaları yürütülmüştür. Çizelge 4.28’de M0054_4 konformasyonunun farklı kombinasyonları için DFT hesaplamalarının sonuçları yer almaktadır. Şekil 4.114’te ise bu sonuçlara ait yapılar verilmiştir.

Çizelge 4.28 En kararlı yapılardan M0054’ün (1:4) DFT hesaplamalarının sonuçları (1 Hartree 627.5095 kcal).

Konformasyon kodları	HF (Hartree)	ZPE (Hartree)	Dipole (Debye)	E _{relatif} (kcal/mol)
M0054_4_3	-2774.7695	1.1738	8.62	0.00
M0054_4_4	-2774.7695	1.1740	8.62	0.11
M0054_4_2	-2774.7606	1.1738	5.49	5.54
M0054_4_5	-2774.7421	1.1736	9.04	17.05

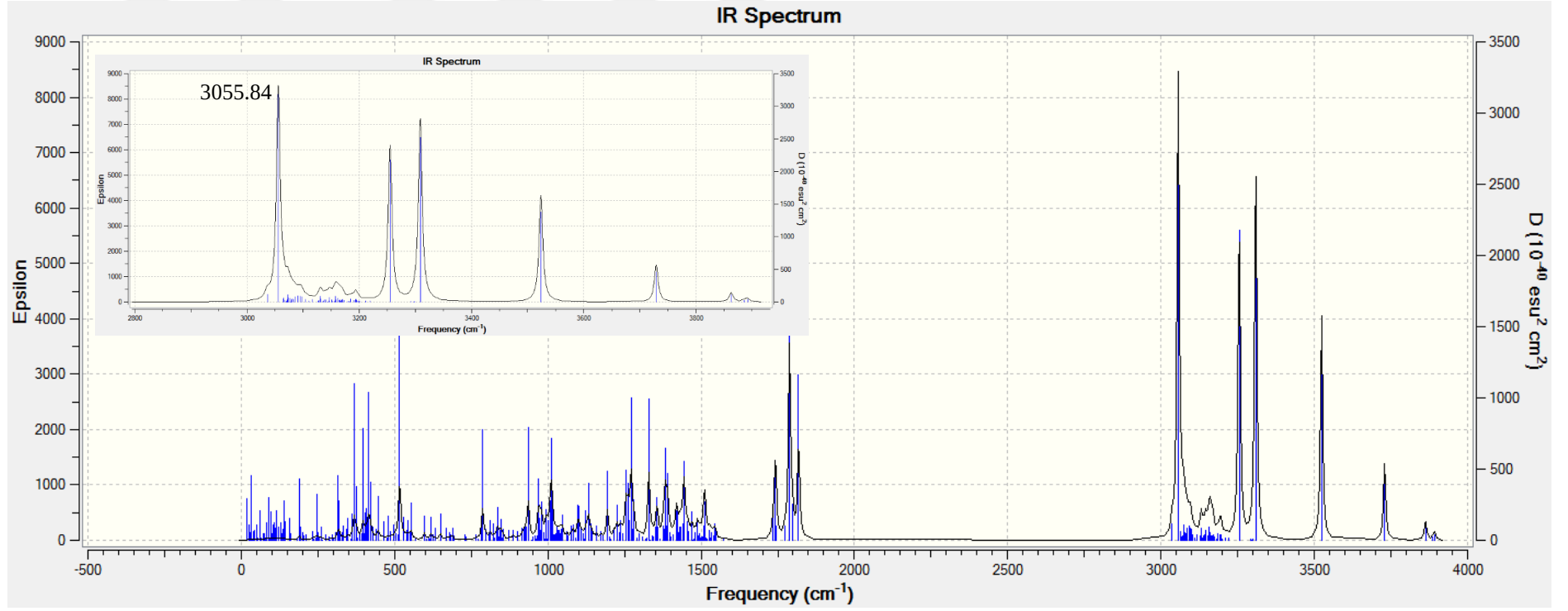


Şekil 4.114 M0054_4'ün farklı kombinasyonları için DFT metodu ile elde edilen yapılar a. M0054_4_3 b. M0054_4_4 c. M0054_4_2 d. M0054_4_5.

Yapılar incelendiğinde en kararlı iki yapıda CG ile MAA monomerlerinin tek bir noktadan, C-16'ya bağlı olan hidroksil grubunun oksijeni ile metakrilik asit monomeri arasındaki 1.596 Å uzunluğunda bir hidrojen bağı aracılığıyla bir etkileşim tespit edilmiştir.

Şekil 4.115'te ise frekans analizi sonucu elde edilen hesapsal IR spektrumu verilmiştir. GaussView programı ile incelendiğinde spektrumda MAA ile etkileşime giren hidroksil grubunu işaret eden pikin 3055.84 cm^{-1} frekansına %85 geçirgenliğe sahip olduğu ortaya konmuştur. Şekil 4.69'da verilen D4MIP0 FTIR spektrumu ile karşılaştırıldığında ise 2970.88 cm^{-1} frekansına sahip pikin bu etkileşimi ifade eden pik olduğu anlaşılmaktadır.





Şekil 4.115 M0054_4_3 molekülünün DFT yöntemi ile yapılan frekans analizi sonucu elde edilen hesapsal IR spektrumu.

Bölüm 3.26’da belirtildiği gibi hesapsal tasarım çalışmasının bir sonraki aşamasında, direkt olarak en iyi sonuç veren 1:4 kalıp molekül:monomer oranında konformasyonların alınması kararlaştırılmıştır. Çizelge 4.29’da 1:4 oranında hesaplanan yarı-ampirik çalışmasının sonuçları yer almaktadır.

Çizelge 4.29 1:4 kalıp molekül:MAA oranı için PM6-DH2 hesaplamaları sonucuna göre en kararlı 20 yapı.

Konformasyon kodları	HF(kcal/mol)	E _{relatif}
M0003*	-745.03	0.00
M0054*	-744.40	0.63
M0034*	-743.94	1.09
M0102*	-743.43	1.60
M0069*	-743.09	1.94
M0004*	-742.35	2.68
M0029*	-742.17	2.85
M0074*	-741.55	3.48
M0110*	-741.27	3.76
M0022*	-741.26	3.77
M0005*	-740.71	4.32
M0053*	-740.56	4.47
M0130*	-740.23	4.80
M0158*	-740.12	4.91
M0012*	-739.86	5.17
M0001*	-739.76	5.27
M0036*	-739.53	5.49
M0038*	-739.26	5.76
M0007*	-739.07	5.95
M0037*	-738.70	6.33

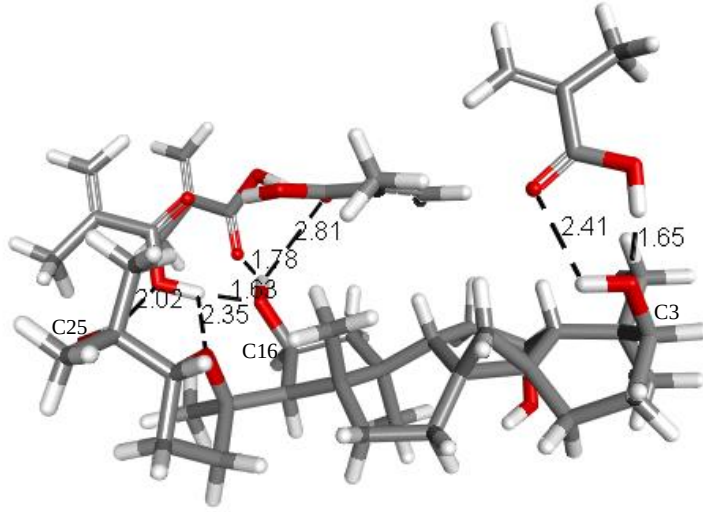
Yarı-ampirik çalışma sonrasında yoğunluk fonksiyoneli teorisi (DFT) yöntemi ile ω B97xD fonksiyoneli 6-31g(d,p) baz setinde optimizasyon ve frekans analizi çalışmaları yürütülmüştür. Çizelge 4.30’da her iki çalışma için elde edilen sonuçların bir karşılaştırması yer almaktadır.

Çizelge 4.30 1:4 kalıp molekül:monomer oranında elde edilen DFT sonuçları (1 Hartree 627.5095 kcal).

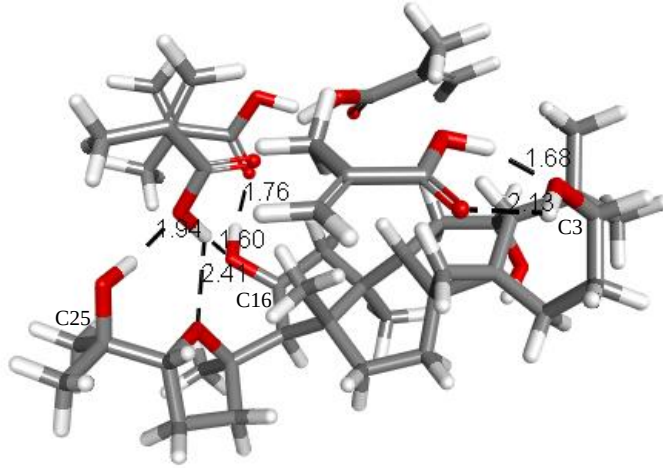
Konformasyon kodları	HF (Hartree)	ZPE (Hartree)	Dipole (Debye)	E _{relatif} (kcal/mol)
M0003*	-2774.78	1.18	1.61	0.00
M0001*	-2774.77	1.17	2.04	2.43
M0054*	-2774.77	1.17	5.93	4.64
M0054_4_3	-2774.77	1.17	8.62	5.95
M0054_4_4	-2774.77	1.17	8.62	6.06
M0058*	-2774.76	1.18	5.45	10.08
M0177*	-2774.76	1.17	1.64	11.44
M0054_4_2	-2774.76	1.17	5.49	11.49
M0189*	-2774.76	1.17	4.44	13.59
M0054_4_1	-2774.75	1.17	6.52	15.98
M0054_4_5	-2774.74	1.17	9.04	23.00

Çizelge 4.30 incelendiğinde en düşük üç enerji seviyesinin ikinci yapılan yöntem ile elde edildiği göze çarpmaktadır. Sikloastragenol molekülünün etrafına rastgele yerleştirilmiş 10 metakrilik asit molekülünden CG ile etkileşmediği düşünülen 6 monomerin çıkarılması ile gerçekleştirilen ilk modelde elde edilen en kararlı iki yapı enerji seviyesi olarak bu durumda 4. ve 5. sırada yer almaktadır. Yapılar arasındaki farklılıkların ortaya daha net koyulabilmesi için bu yapılar Şekil 4.116'da verilmiştir.

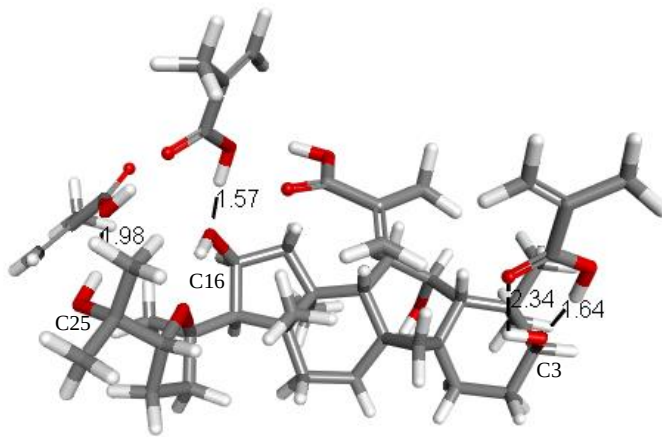
Şekil 4.116'da da görüleceği gibi M0003* ve M0001* kodlu moleküller sikloastragenol ile 4 noktadan etkileşmiştir: C-3'teki hidroksil, C-16'daki hidroksil, C-25'teki hidroksil ve furan yapısındaki oksijen. Bu çalışma ile en kuvvetli bağın her iki durumda da C-3 ile gerçekleştiği ortaya konmuştur. M0054* kodlu molekül ise sikloastragenol ile 3 noktadan etkileşmektedir: C-3'teki hidroksil, C-16'daki hidroksil, C-25'teki hidroksil. M0003*, M0001* ve M0054* kodlu moleküllerin, M0054_4_3 kodlu molekülden daha düşük enerji seviyesine sahip olması, MAA monomerlerinin daha fazla noktadan CG ile etkileşim sağlayabilmeleri ile açıklanabilmektedir. Bu moleküllere ait frekans analizi sonucunda elde edilen hesapsal IR spektrumları Şekil 4.117-4.119'da verilmiştir.



a.

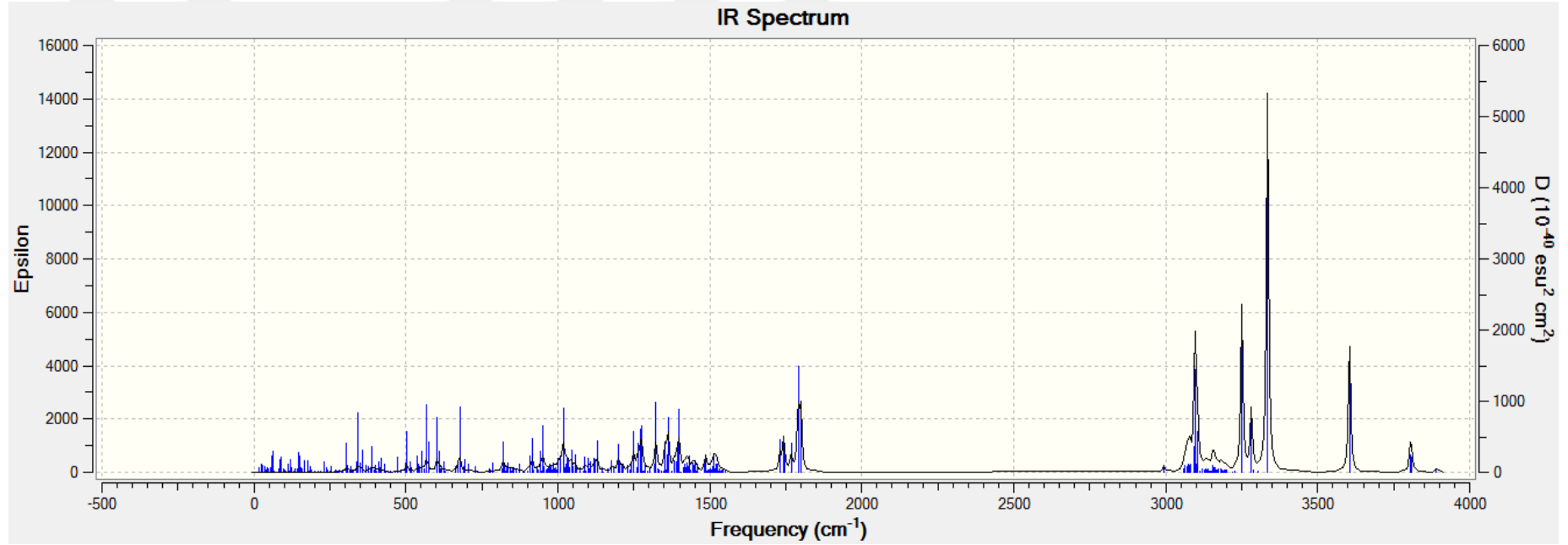


b.

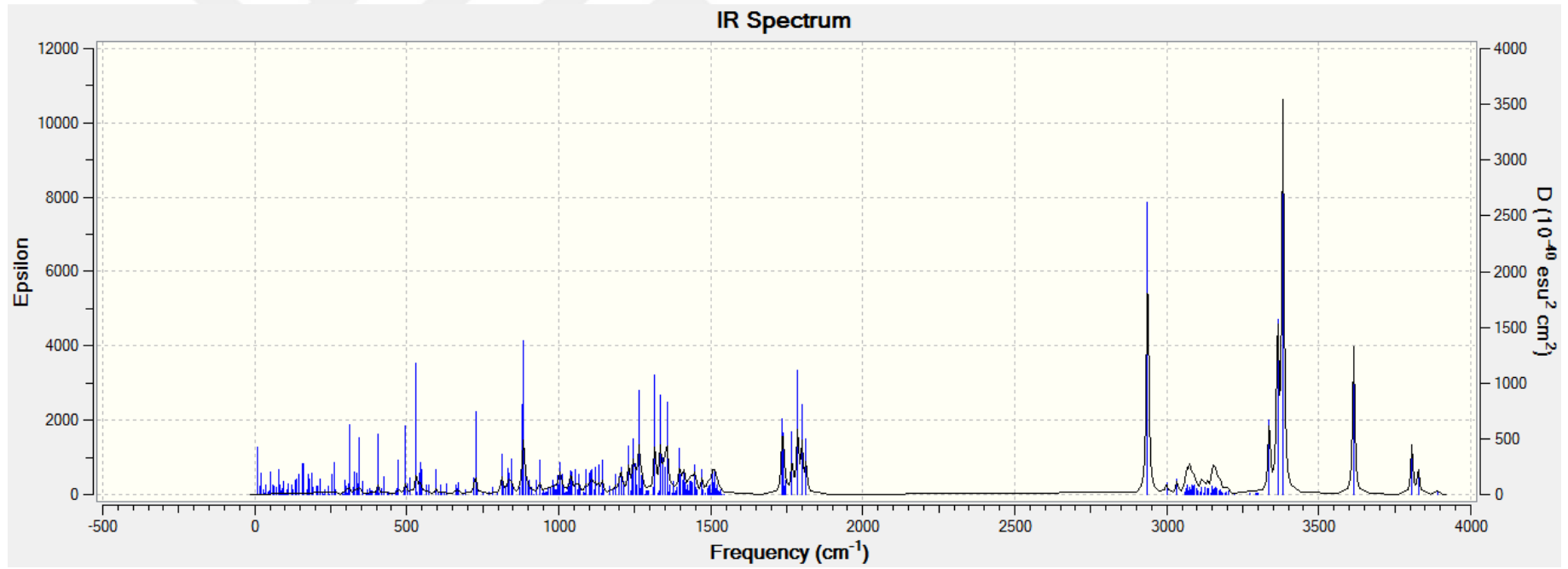


c.

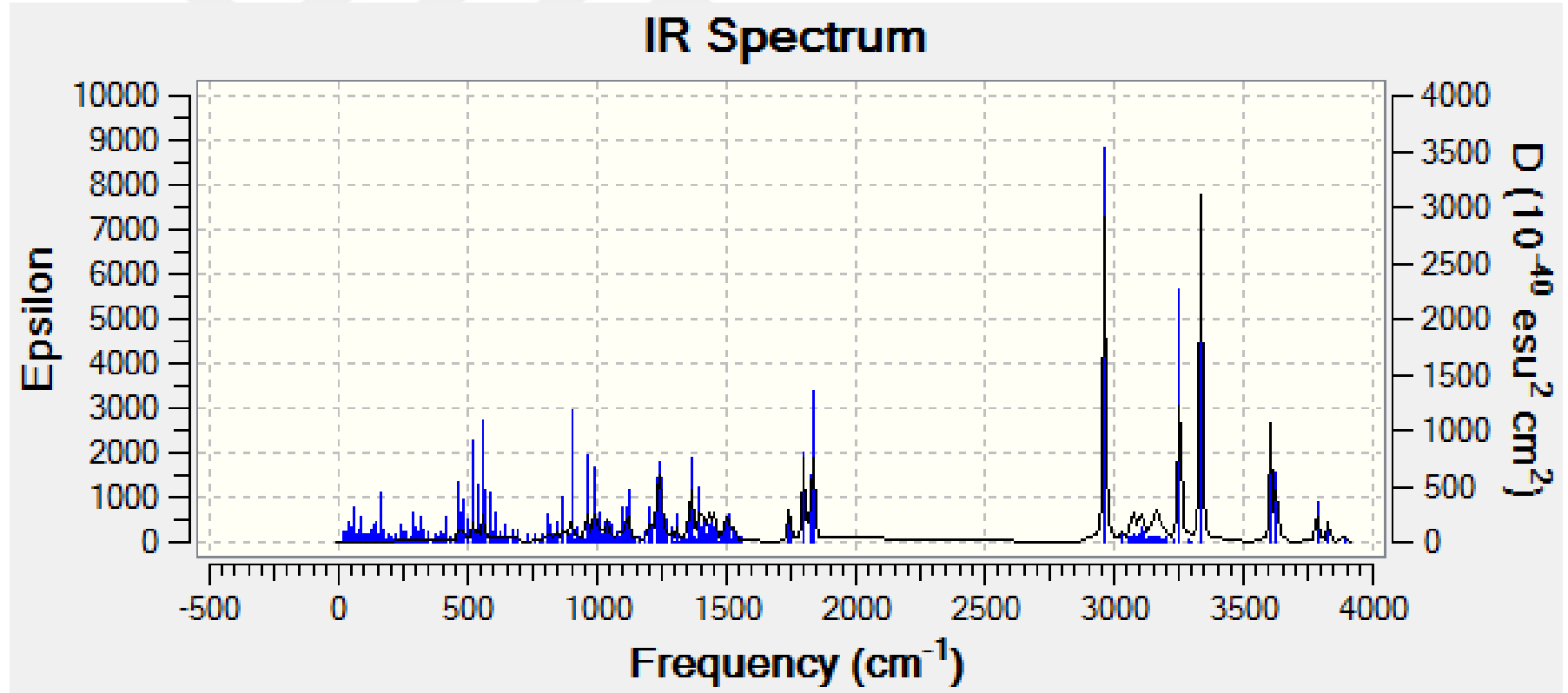
Şekil 4.116 1:4 oranında DFT metodu ile elde edilen en kararlı yapılar a. M0003* b. M0001* c. M0054*.



Şekil 4.117 M0003* molekülünün hesapsal IR spektrumu.



Şekil 4.118 M0001* molekülünün hesapsal IR spektrumu.



Şekil 4.119 M0054* molekülünün hesapsal IR spektrumu.

Şekil 4.117-4.119’da verilen hesapsal IR spektrumları birbirleriyle karşılaştırıldıklarında pikler arasında kaymalar göze çarpmaktadır. CG ile MAA monomerleri arasındaki etkileşimlerin $3000\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ frekans aralığında görülmesi beklenmektedir. Örneğin M0001* ve M0054* kodlu moleküller için ilk etkileşim 3000 cm^{-1} frekansının altında iken M0003* kodlu molekülde M0054_4_3’te olduğu gibi 3000 cm^{-1} ’in üzerinde bir kayma meydana gelmiştir. Şekil 4.69’da verilen D4-MIP0’a ait FTIR spektrumu ile karşılaştırıldıklarında ise deneysel verilere en yakın sonucun M0001* kodlu molekül ile ortaya konduğu görülmektedir.



5.0 SONUÇLAR

Biyoaktif moleküllerin herhangi bir bozunmaya uğramadan ayırma-saflaştırılması çoğu zaman zahmetli ve uzun bir süreçtir. Ayrıca doğada düşük miktarda bulunuyor olmaları bu moleküllerin eldesini yüksek maliyetli bir süreç kılmaktadır. Bu tezin amacı kısa zamanda ve daha kolay bir yöntemle, seçilen bir biyoaktif molekülün ayırma-saflaştırmasını sağlamaktır. Katma değeri yüksek biyoaktif moleküller arasından kalıp molekül olarak belirlenen sikloastragenolün ayırma saflaştırması için moleküler baskılama teknolojisi kullanılarak hızlı ve kolay bir izolasyon yöntemi geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu çalışma ile hem büyük ölçek üretimleri yapılan biyoaktif moleküller için hem de yapı olarak benzer moleküllerin eldesini amaçlayan küçük ölçekte tarama çalışmaları için kolay ve hızlı bir saflaştırma sağlanması için bir adım atılmıştır.

Çalışmada 3 farklı monomer:çapraz bağlayıcı ikilisi denenmiştir. Sty-DVB ve 4-VP-EGDMA polimerleri kloroformda jelleşerek çalışmayı imkansız hale getirmişlerdir. Metanol:su sistemlerinde ise istenilen başarı elde edilememiştir. MAA-EGDMA monomer çapraz bağlayıcı ikilisi de organik çözümlerle jelleşen polimer olmasına rağmen, CG'ye seçimli bir moleküler baskılanmış polimeri sağlamıştır.

Çalışma boyunca MAA:EGDMA monomer:çapraz bağlayıcı ikilisiyle, 2 farklı sentez mekanizması, 4 farklı kalıp molekül:monomer oranı, 3 farklı çapraz bağlayıcı oranı ve 3 farklı porojen miktarı ile sentezlenen polimerler karşılaştırılmıştır. Bu polimerlerden kalıp molekül:monomer oranı 1:4 olan çöktürme polimerizasyonu ile üretilmiş D4 polimeri ile diğer polimerlerden daha iyi izolasyon sonuçları elde edilmiştir. Dolayısıyla polimerin karakterizasyonu ile ilgili ileri çalışmalar D4 polimerleri ile sürdürülmüştür.

Bulgular bölümünde de görüleceği üzere çalışmalar önce bağlanma denemeleri ile başlatılmış, ardından katı faz ekstraksiyonu denemeleri ile devam etmiştir. Bu polimerleri sentezlemedeki amaç katı faz ekstraksiyonu ile biyoaktif kalıp molekülün izolasyonunu kolaylaştırmaktır. Dolayısıyla katı faz ekstraksiyonundan alınan sonuçlar esas alınmıştır. Polimerlerin katı faz ekstraksiyonundaki performanslarını iyileştirmek için farklı çaplarda kolonlar, farklı miktarlarda dolgu maddeleri, dolayısıyla farklı yükseklikteki kolonlar ile

çalışmalar sürdürülmüş ve en iyi çalışma koşulları belirlenmiştir. Küçük ölçek sonuçlarına göre 1 cm çapında, 1 cm yüksekliğinde, 150 mg D4-MIP ile doldurulan kolonlarda elde edilen baskı faktörü diğer çalışmalarda alınanların 10 katına ulaşmıştır. Bu koşullarda, %97.41 CG geri kazanılırken CG baskılanmayan eş polimerinde (D4-NIP) %14.79 geri kazanım elde edilmiştir. D4-MIP ve NIP arasındaki farkı ifade eden baskı faktörü ise 5.558 olarak hesaplanmıştır. 2008 yılında meyan kökü triterpenleriyle yapılan benzer bir çalışmada 18- β -glisirinitik asit için %97 geri kazanım sağlanırken elde edilen baskı faktörü 4.4'tür (Claude et al., 2008). Dolayısıyla sonuçlar, bu çalışmada yüksek geri kazanım oranına sahip iyi bir polimer sentezlendiğini göstermektedir.

Çalışmalar adsorpsiyon kinetiğinin çıkarılması için farklı denemelerle devam etmiştir. D4-MIP için en uygun izotermin Freundlich izotermi olduğu görülmektedir. Bu durumda D4-MIP'in heterojen bir yüzey alanına sahip olduğu anlaşılmaktadır. Parçacık boyutu analizleri ve SEM analizleri incelendiğinde de benzer sonuçlar görülmektedir. Scatchard eğrisi sonuçlarına bakıldığında ise D4-MIP'in D4-NIP'e göre daha küçük bölge sayısına ve ayrışma sabitine sahip olduğu anlaşılmaktadır. CG izolasyonu açısından D4-MIP sonuçları D4-NIP sonuçlarına göre çok daha iyi olduğundan Scatchard eğrisi sonuçları D4-MIP'in iyi bir adsorban olmaktan öte baskılanmış bir polimer olduğunu kanıtlamaktadır. Elementel analiz sonuçlarına bakıldığında da yıkama öncesi D4-MIP ile sonrasındaki karbon sayıları arasındaki fark CG'nin baskılandığının ve sonrasında ortamdan temizlendiğinin bir kanıtıdır. BET analizi sonucunda, Çizelge 4.23'te de sunulduğu üzere D4-NIP'in yüzey alanının D4-MIP'e göre çok daha büyük olduğu (sırasıyla 160.6 m²/g, 144.1 m²/g) görülmektedir. Adsorpsiyon kuralları gereği bu durumda D4-NIP ile daha iyi ayırmalar elde edilmelidir. Ancak D4-MIP CG izolasyonu için çok daha iyi sonuçlar veren bir polimer olarak karşımıza çıkmaktadır. Bütün bu analizlerden elde edilen bulgular ile bağlanma ve katı faz ekstraksiyonu sonuçlarından elde edilen deneysel veriler D4-MIP'in baskılanmış bir polimer olmadığı noktasındaki kuşkuları ortadan kaldırmaktadır.

D4 polimerleri ile tekrarlanabilirlik denemeleri de yapılmıştır. Saf CG ile yapılan çalışmalar polimerlerin ardışık iki kere kullanımına uygun olduğunu göstermiştir. Ancak denemeler arasında İTK yapılarak kolonda CG kalıp kalmadığının kontrol edilmesi gerekmektedir. *Astragalus* hidroliz ekstresiyle

gerçekleştirilen 10 g ve 100 g çalışmaları polimerler yenilenmeden tekrar tekrar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 100 g çalışmalarının sonuçları incelendiğinde birinci denemede %85.78'lik bir geri kazanım elde edilirken ikinci denemede %86.78'lik bir geri kazanım elde edilmiştir. Çalışmalar hem *Astragalus* ekstresinin hem de CG'nin polimerden kolayca ayrıldığını ortaya koymaktadır.

Projenin amacı CG'nin büyük ölçekte *Astragalus* ekstrelerinden izolasyonu olduğu için proje boyunca ölçek büyütme yönelik çalışmalar yapılmıştır. İzlenilen yolda karşılaşılan problemlerden biri elde edilen polimerlerin aglomere olarak farklı molekül boyutlarına sahip oluşudur. Çöktürme polimerizasyonu ile her ne kadar bu problem bir miktar çözülmüş olsa da vakum altında kururken kümeleşen polimer partikülleri kolonun yüklenmesi esnasında kanallaşma sorununa sebep olabilmektedir.

Kanallaşma, basınç düşmesi, tıkanma ve değişken akış hızı ölçek büyütme esnasında karşılaşılan diğer problemlerdendir. Bu sorunların hepsi aslında heterojen yapıdaki polimerin jelleşerek şişmesi kaynaklıdır. Şişme oranlarının kontrol altında tutulmasıyla daha iyi sonuçlar alınabileceği düşüncesiyle çalışmada farklı monomer, çapraz bağlayıcı ve porojen miktarında polimerler sentezlenmiştir.

Kanallaşma problemi vakum altında kolonu şartlama ve yükleme sırasında karşılaşılan bir sorundur. Bu sorun ölçek büyütülerek polimer miktarı arttırıldığında ve yükleme esnasında ekstrelerin daha seyreltik olarak kolona yüklenmesiyle çözülmüştür.

Değişken akış hızı hem jelleşmenin hem de kanallaşmanın sonucunda ortaya çıkan bir sorundur. Vakum sebebiyle kolonda kanallar açıldığından akış hızı da değişiklik göstermektedir. Dolayısıyla kolondaki alıkonma zamanı değişmektedir. Bazı durumlarda gözle görünür kanallaşma meydana gelmese de kolon duvarlarında oluşan hava kabarcıkları benzer bir etki yaparak akış hızını etkilemektedir. Bu sorun ise kolonun vakum altında kurummasına izin verilmeyerek çözülmüştür.

Tıkanma problemi şişen polimere aşırı yükleme yapılması durumunda veya kolon çapının dolgu maddesi miktarı için yetersiz gelmesi durumunda karşılaşılan bir sorundur. Basınç düşmesi sabit kalacak şekilde ölçek büyütme gerçekleştirilerek bu sorun aşılmıştır.

Bütün bu problemleri aşabilmek adına sentezlenen birbirinden farklı özellikte polimerlerin şişme oranları ve SEM görüntüleri karşılaştırılarak daha rahat kolona yüklenebilecek polimerler tespit edilmeye çalışılmıştır. Belirlenen polimerler ile katı faz ekstraksiyonu denemeleri yapılarak polimerlerin etkinliği saptanmıştır.

Bulgular bölümünde de görüleceği üzere şişme oranı düşük olmasına rağmen pek çok polimer katı faz ekstraksiyonunda başarı sağlayamamıştır. Çalışmalar İTK yapılarak takip edilmiştir. Optimizasyonların tamamlanmasının ardından ise elde edilen fraksiyonların HPLC kromatogramları alınarak kolondan geri kazanım ve saflık oranları hesaplanmıştır. Bütün polimerler karşılaştırıldıktan sonra ölçek büyütme değeri olarak görülen polimer 1:4:20 (kalıp molekül:monomer:çapraz bağlayıcı) oranına sahip D4 polimeri olarak tespit edilmiştir.

Ölçek büyütme çalışmaları ise klasik dolgulu kolon çalışmaları gibi sürdürülememiştir. Polimerler jelleşerek şişme gösterdiğinden ve dolayısıyla da vakum altında farklı akış hızlarına yol açtıklarından her kolonda basınç düşmesi hesabı yapılarak basınç düşmelerinin sabit kalacağı şekilde ölçek büyütme gerçekleştirilmiştir. 0.5 g polimer ile başlayan çalışmalar, 1, 2.5, 10 ve 100 g'lık katı faz ekstraksiyonu denemeleriyle sonuçlandırılmıştır.

10 g'lık katı faz ekstraksiyonu sonuçları incelendiğinde MIP için geri kazanım oranı ve saflık %70 iken, NIP için geri kazanım oranı %7.71 saflık ise %61.04 olarak bulunmuştur. 100 g'lık katı faz ekstraksiyonu sonuçları incelendiğinde ise MIP için geri kazanım oranı %86.78, saflık ise %52.64 iken NIP için geri kazanım oranı %41.29 saflık ise %17.74 olarak bulunmuştur. Sonuçlar incelendiğinde moleküler baskılanmış polimer, baskılanmamış olan polimere göre CG'ye daha seçimlidir. Ancak kolona yüklenen ekstre miktarı arttıkça elüsyon fraksiyonlarının saflığının azaldığı görülmektedir. *Astragalus* ekstresi CG'ye yapıcı benzer molekülleri yüksek miktarda içermektedir. Çalışılan polimer miktarı arttıkça yapıcı CG'ye benzer moleküller non-spesifik etkileşimler aracılığıyla polimere tutunabilmektedir. Bu sebeple iyileştirme çalışmalarıyla ortaya konan izolasyon protokolü ile elde edilen fraksiyonların saflığı azalmaktadır.

Küçük ölçekte elde edilen sonuçlar incelendiğinde 1 g polimer ile yaklaşık 1.6 mg CG izolasyonu gerçekleştirilebilmektedir. 100 g'lık çalışma incelendiğinde ise yaklaşık 150 mg CG (%86.78 geri kazanım oranı ile) izole edildiği görülmektedir. Büyük ölçek çalışmasının sonucu olarak 1 g polimer ile 1.5 mg CG izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İki sonuç karşılaştırıldığında sonuçların çok tutarlı olduğu polimerin ekstre ile yüklenmiş olsa da sabit miktarda CG izolasyonunu sağladığı açıktır.

CG izolasyonu normalde *Astragalus* ekstresinden silika bazlı dolgu maddeleriyle gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemle tek bir kolon kromatografi prosesi ile ekstreten CG izole etmek mümkün değildir. Ancak projede sentezlenen polimerin ticari olarak üretilen başka bir polimer ile de karşılaştırılması uygun görülmüştür. Ticari polimer D101 ile elde edilen sonuçlar ise %52.03 geri kazanım ve %100 saflık şeklindedir. Ancak D101 polimeri ile vakumsuz ortamda ve D4-MIP ile eş hacimdeki polimer miktarında (kütlece D4-MIP'in 4 katına denk gelmektedir) yapılan bir çalışmanın sonucudur. Yani kolon hacmi ve kolon akış hızı eşitlenerek yapılan bir çalışma sonucudur. Sonuç olarak daha çok miktarda ticari polimer kullanarak daha az geri kazanım oranında ancak daha yüksek saflıkta *Astragalus* hidroliz ekstresinden CG izolasyonu mümkün olabileceği sonucuna varılmaktadır.

Ekonomik analiz yapılmak istendiğinde 100 g D4-MIP'in üretimi yaklaşık 170 TL'ye denk gelmektedir (CG'nin geri kazanılabileceği düşünülerek maliyete dahil edilmemiştir). 100 g silika yaklaşık 170 TL'ye alıcı bulunmaktadır. D101 reçinesinin ise 100 g'ı yaklaşık 112 TL'ye denk gelmektedir. 100 g dolgu maddesi ile 1 g ekstreten sikloastragenol ayırma saflaştırma prosesinin ekonomik analizi yapıldığında ise D4MIP ile yaklaşık 50+170 TL, silika ile yaklaşık 100+170 TL, D101 ile ise D4MIP'e göre 4 kat polimer kullanılması gerektiğinden izolasyon maliyeti yaklaşık 50+336 TL olacaktır. Maliyet hesapları proje başlangıcında temin edilen kimyasal fiyatları kullanılarak yapılmıştır.

Bu tez, doğal ürünlerle yapılan moleküler baskılama çalışmalarına güzel bir örnek teşkil etmektedir. Bu çalışma ile baskılanmış polimerlerin büyük ölçek katı faz ekstraksiyonunda da kullanışlı olduğu ortaya konmuştur. D4-MIP polimerik dolgu maddeleriyle karşılaştırıldığında %100 saflığa ulaşamadığından dolayı

performans açısından düşük ancak daha az miktarda polimer sarfiyatı gerektirdiğinden daha ekonomik bir polimer olduğunu göstermektedir. Günümüzde daha yoğun olarak kullanılan silika bazlı diğer dolgu maddeleriyle karşılaştırıldığında ise sarf edilen çözümler bakımından çok daha çevreci, tekrar kullanılabilir olması bakımından ise çok daha ekonomik bir ayrıma olanak sağlamaktadır. İlerleyen projelerde HPLC kolonu dolgu maddesi gibi farklı alanlarda da kullanımı sağlanabilecektir.



6.0 ÖNERİLER

Moleküler baskılama günümüzde pek çok kullanım alanına sahip bir teknolojidir. Sikloastragenolün *Astragalus* ekstrelerinden izolasyonunu konu alan bu proje moleküler baskılamanın katı faz ekstraksiyonunda kullanımına iyi bir örnek teşkil etmektedir. Bu proje ile zorlu bir izolasyon sürecine çok daha kolay bir alternatif sunulmaktadır. *Astragalus* ekstresinin pek çok farklı molekül içermesi ve bu moleküllerin bir kısmının yapıcı CG'ye benzemesi baskılama tekniği ile çalışan bu polimerlerin CG'ye seçimliliğini azaltmaktadır. Gelecek çalışmalarda ön basamak olarak farklı bir ekstraksiyon yönteminin kullanılması ve ardından bu polimerler ile izolasyon çalışması yapılması veya tam tersi bu polimerlerin bir ön saflaştırma basamağı olarak kullanılmasının ardından farklı bir yöntemle devam edilen bir izolasyon metodunun geliştirilmesi daha yüksek saflıkta CG izolasyonuna imkan verecektir.

Uygulanabilecek başka bir metodoloji de D4 MIP ile yüklenmiş birden fazla kolonun seri halinde bağlanarak çalıştırılacağı bir sistem geliştirmek olacaktır. Bu sayede hem yüksek miktarda dolgu maddesi kullanıldığında kolonda yaşanan basınç düşmesi ve akış problemi giderilmiş olacak hem de her seferinde bir sonraki kolona daha temiz bir ekstre yüklemesi ile daha yüksek saflıkta ayırma saflaştırma gerçekleştirilebilecektir. Bir başka kullanım alanı ise HPLC kolonları için dolgu maddesi adayı olmalarıdır. Sentezlenen polimerlerin şişme sorunları üzerine bir miktar daha çalışma yapıldıktan sonra HPLC kolonuna yüklenerek CG'ye seçimli bir kolon eldesi mümkün olacaktır.

Bu projede sentezlenen polimerler için bir başka kullanım alanı ise yapıcı benzer CG'ye analog moleküllerin izolasyonu olacaktır. Bu projede sentezlenen polimerler kullanılarak bu moleküllerin izolasyonu için bir ayırma saflaştırma metodolojisi geliştirilerek küçük ölçekli çalışmalarda daha hızlı sonuç almak mümkün olabilecektir.

Moleküler baskılama sürekli gelişmeye devam eden ve her geçen gün kendine yeni kullanım alanları yaratan bir teknolojidir. Bu çalışmaya benzer çalışmalar yapıldıkça ve karşılaşılan problemler giderildikçe, moleküler baskılama endüstriyel alanda da kendine bir yer edinecektir.

EK AÇIKLAMALAR – A

A. CG Kalibrasyon Grafikleri

CG için kullanılan kalibrasyon grafikleri Şekil A.1 ve A.2’de verilmiştir.

Method: C:\ChromQuest\Enterprise\eski
dosyalar\Projects\Default\Method\melis_melis_12122012_3_offline.met
Print Time: 25.09.2013 18:19:13
User: System
Instrument: UPLC (Offline)

CG (Detector 1-205nm)

Average RF: 0,000137649 RF StDev: 2,72141e-005 RF %RSD: 19,7706

Scaling: None LSQ Weighting: None Force Through Zero: On

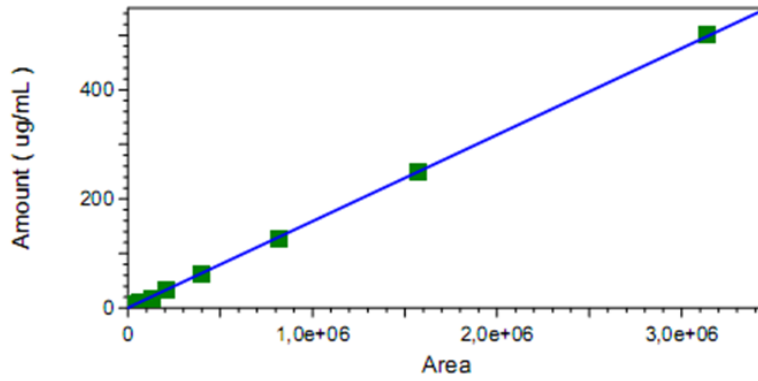
Replicate Mode: Wt Average (Weight: 100)

Fit Type: Linear

$y = 0,000158714x + 0,000000$

Goodness of fit (r^2): 0,999649

Peak: CG -- ESTD -- Detector 1-205nm



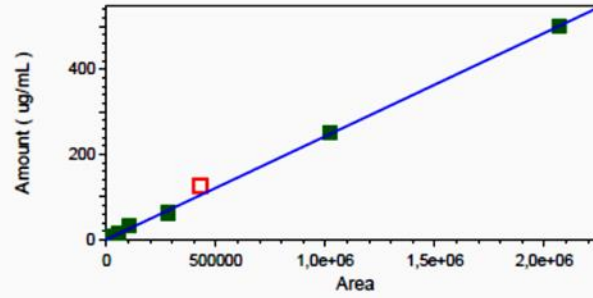
Şekil A.1 CG'nin kalibrasyon grafiği-1.

Method:
 C:\ChromQuest\Enterprise\Projects\Default\Method\26102015\melis_12122012_3_offline2.met
 Print Time: 15.12.2015 18:09:30
 User: System
 Instrument: UPLC (Offline)

CG (Detector 1-205nm)

Average RF: 0,000498125 RF StDev: 0,000450876 RF %RSD: 90,5146
 Scaling: None LSQ Weighting: None Force Through Zero: On
 Replicate Mode: Wt Average (Weight: 100)
 Fit Type: Linear
 $y = 0,000242292x + 0,000000$
 Goodness of fit (r^2): 0,999491

Peak: CG – ESTD – Detector 1-205nm

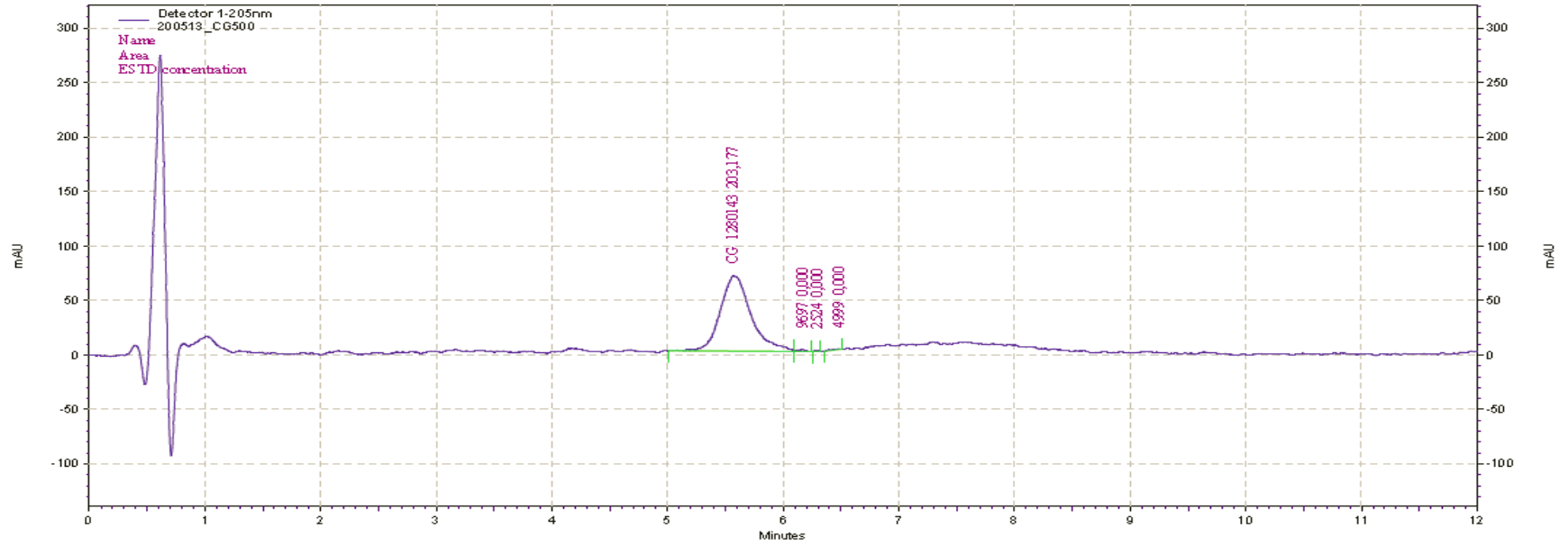


Şekil A.2 CG'nin kalibrasyon grafiği-2.

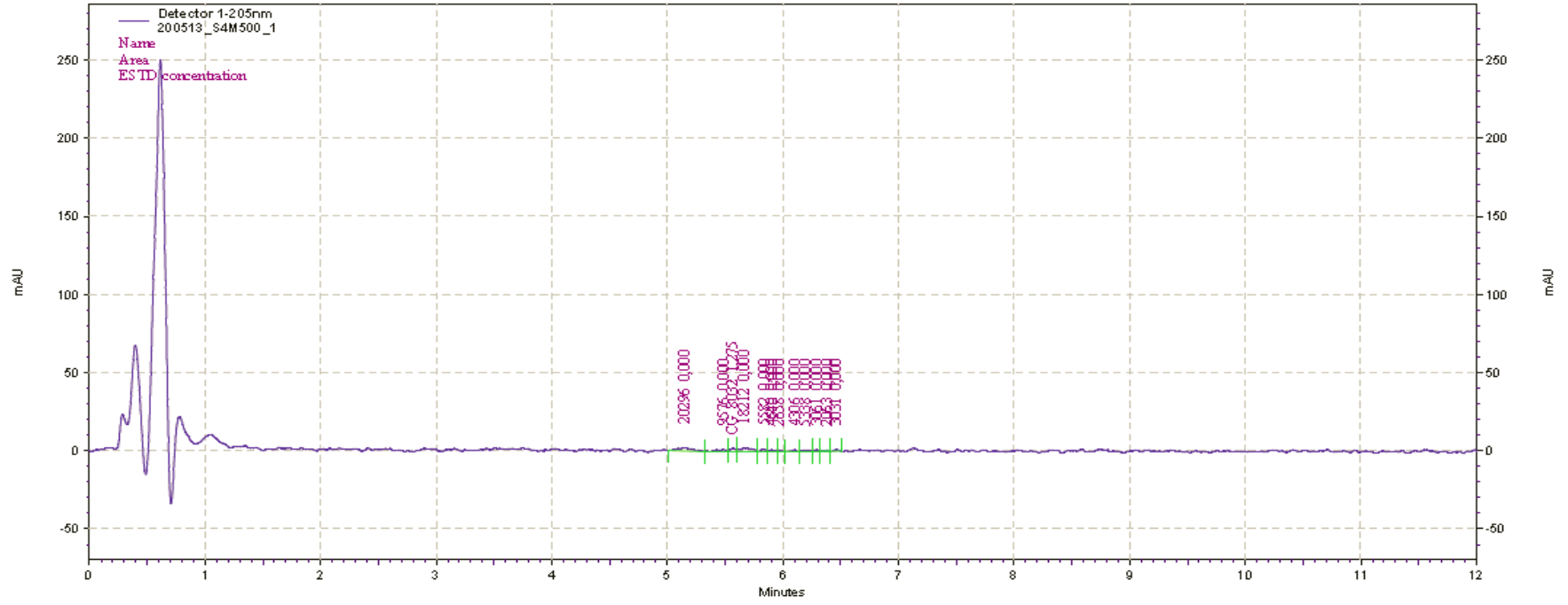
EK AÇIKLAMALAR - B

B. HPLC Analizleri

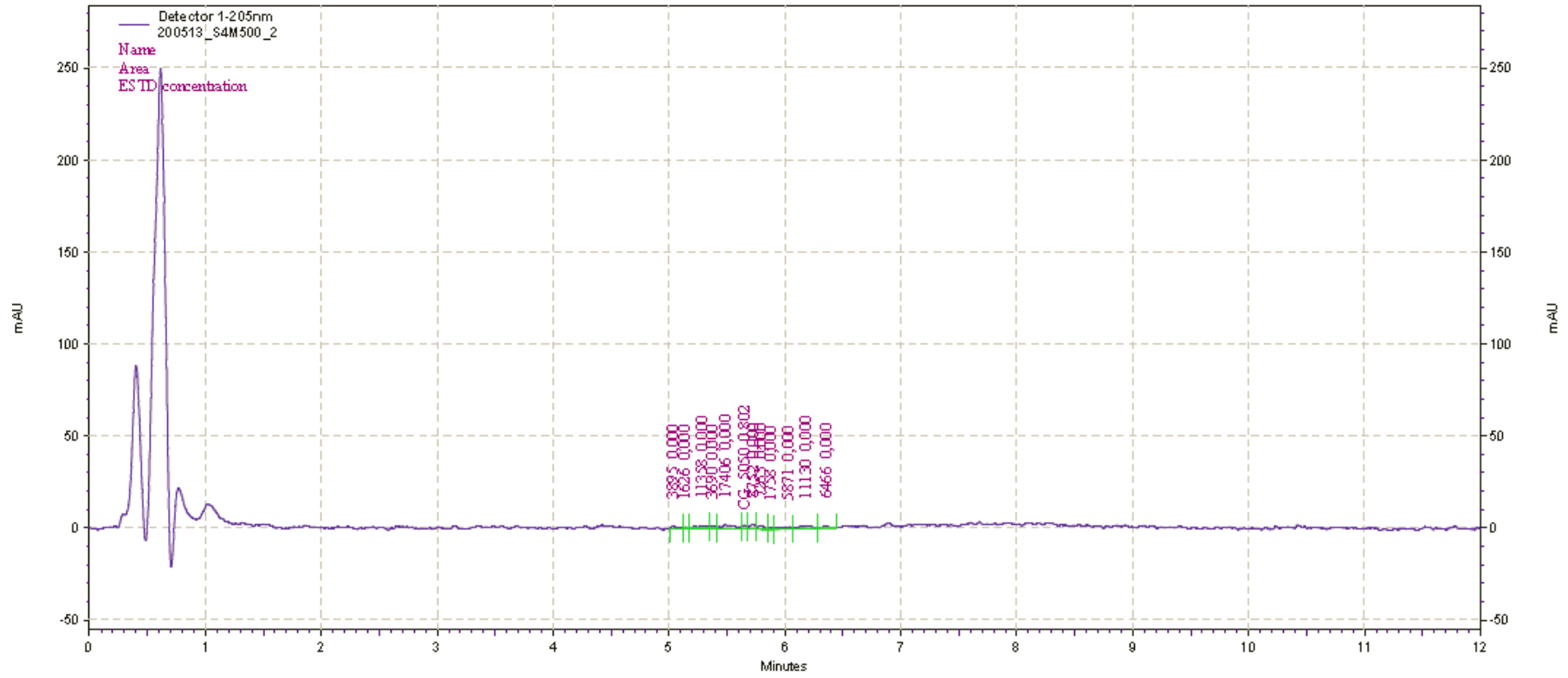
Bazı çalışmalara ait HPLC kromatogramları aşağıda verilmiştir.



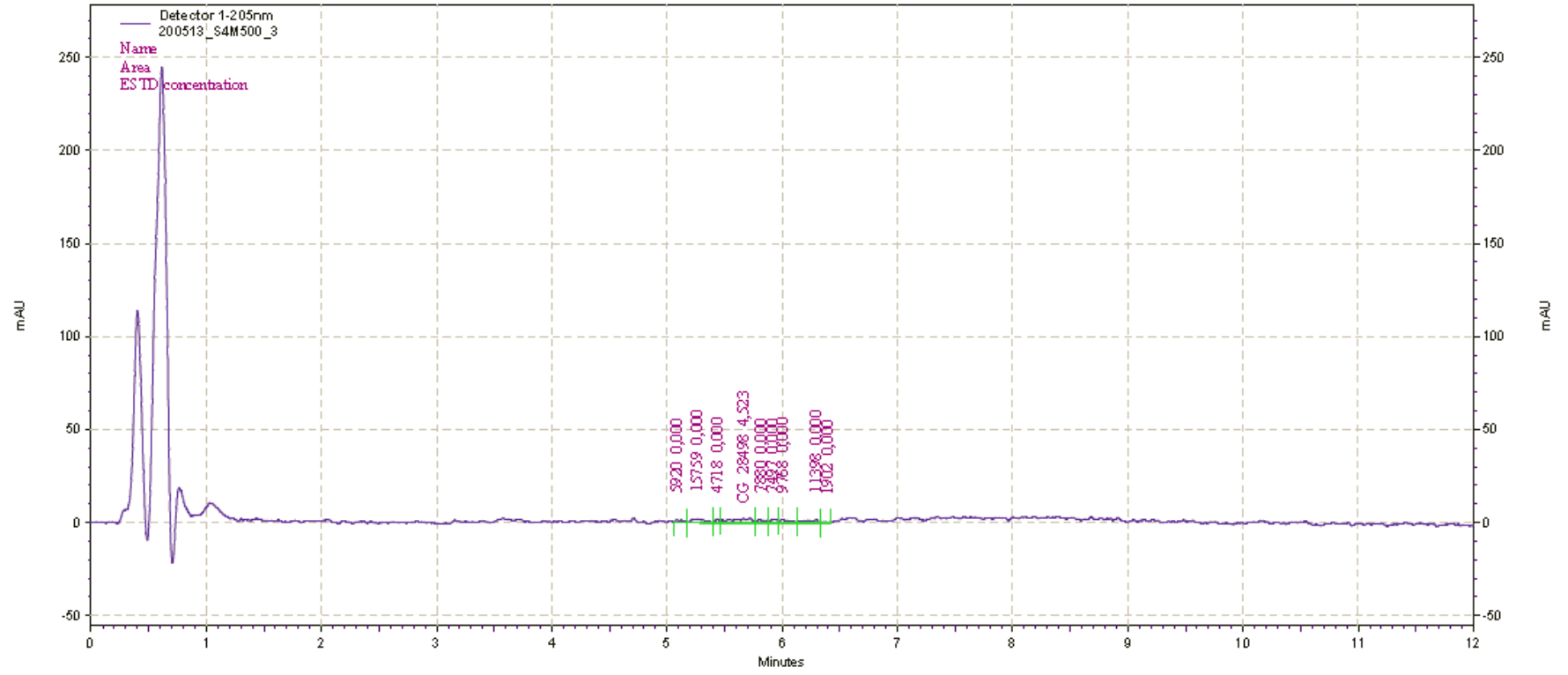
Şekil B. 1 CG500: D4 polimerinin breakthrough eğrisi çalışmasına ait yüklenen sikloastragenol konsantrasyonu.



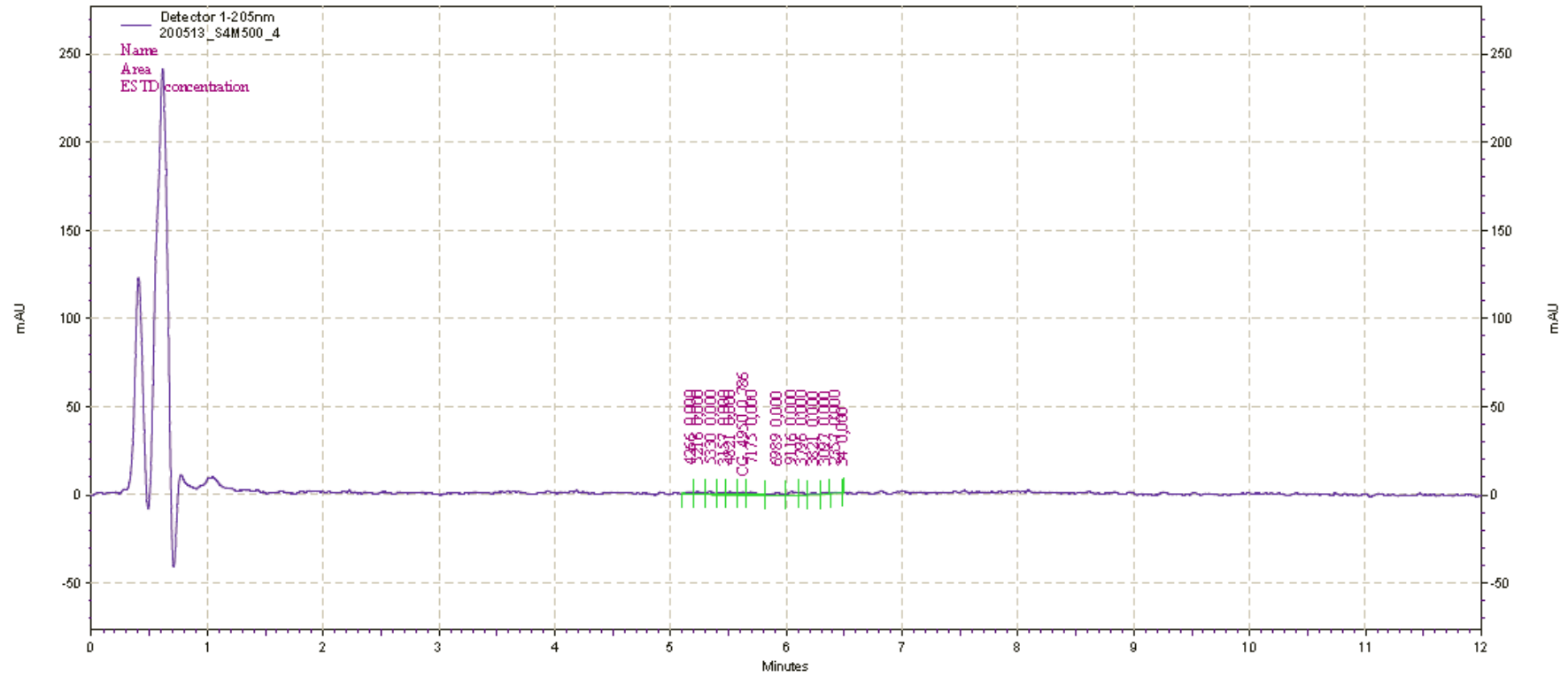
Şekil B. 2 D4M500_1: D4MIP'in breakthrough eğrisi çalışmasına ait 1. 2 ml'lik kloroform fraksiyonu.



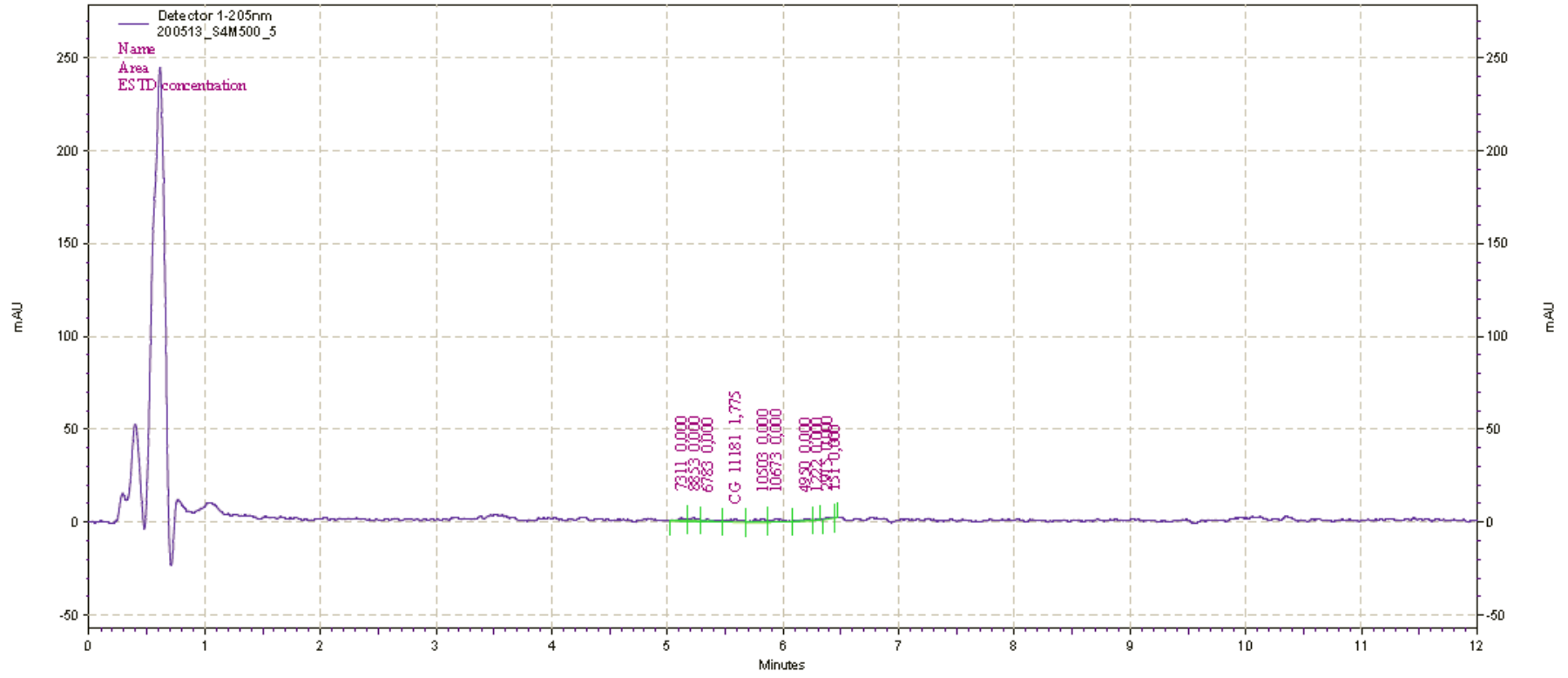
Şekil B. 3 D4M500_2: D4MIP'in breakthrough eğrisi çalışmasına ait 2. 2 ml'lik kloroform fraksiyonu.



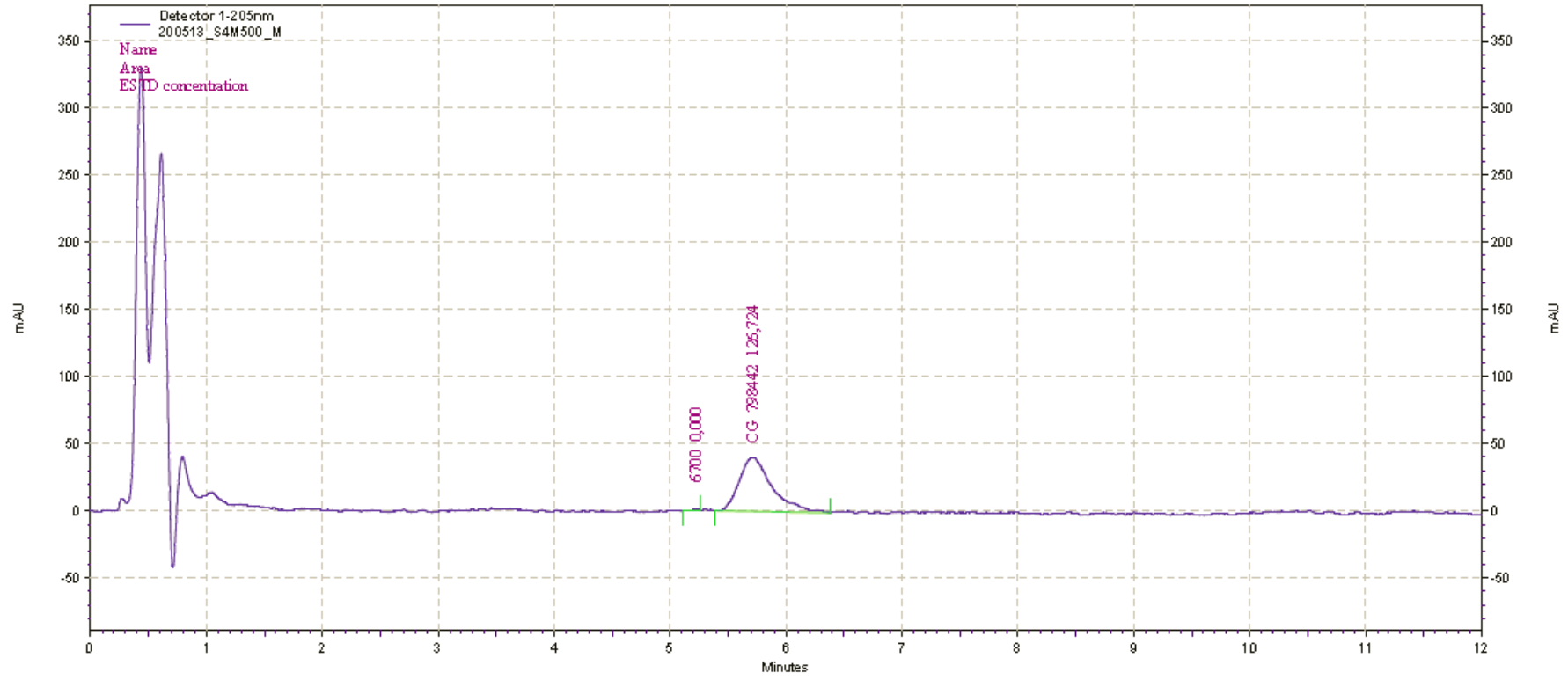
Şekil B. 4 D4M500_3: D4MIP'in breakthrough eğrisi çalışmasına ait 3. 2 ml'lik kloroform fraksiyonu.



Şekil B. 5 D4M500_4: D4MIP'in breakthrough eğrisi çalışmasına ait 4. 2 ml'lik kloroform fraksiyonu.

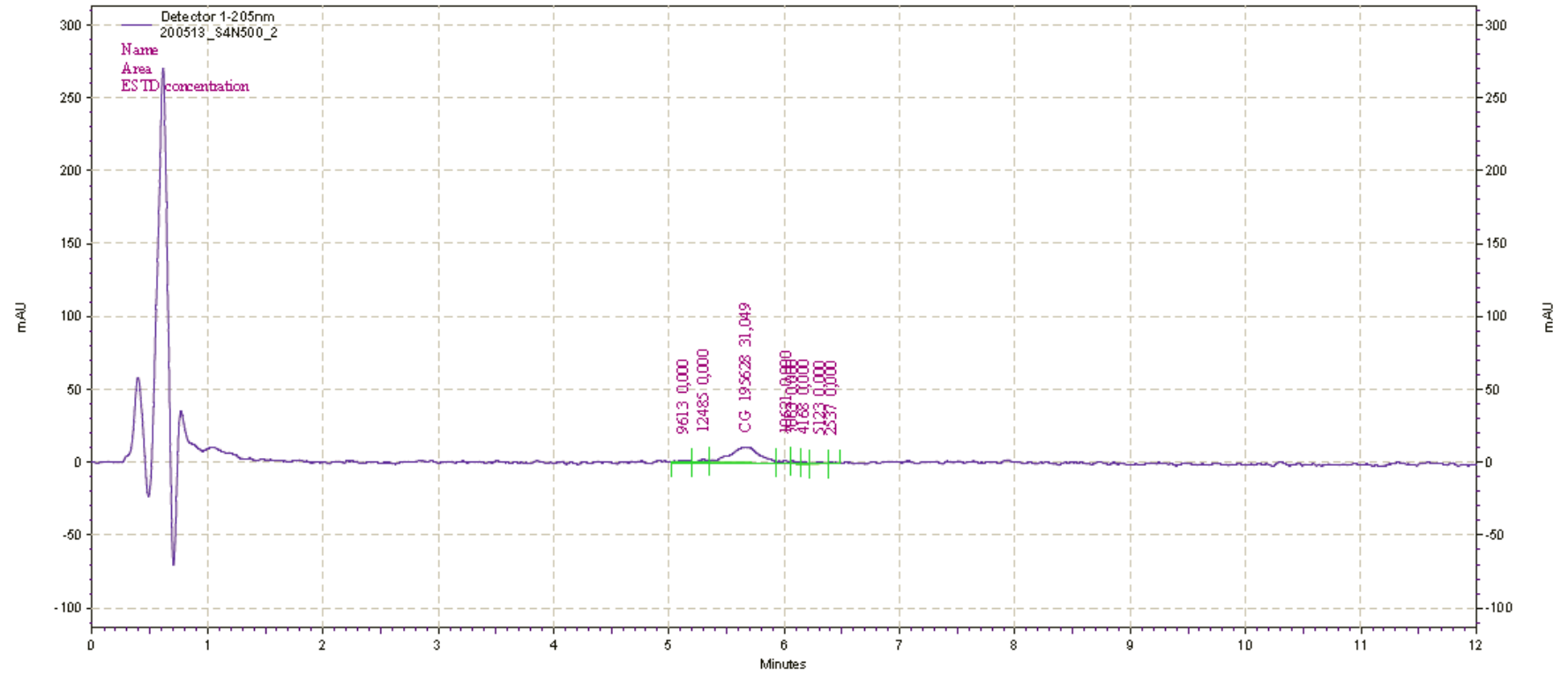


Şekil B. 6 D4M500_5: D4MIP'in breakthrough eğrisi çalışmasına ait 5. 2 ml'lik kloroform fraksiyonu.

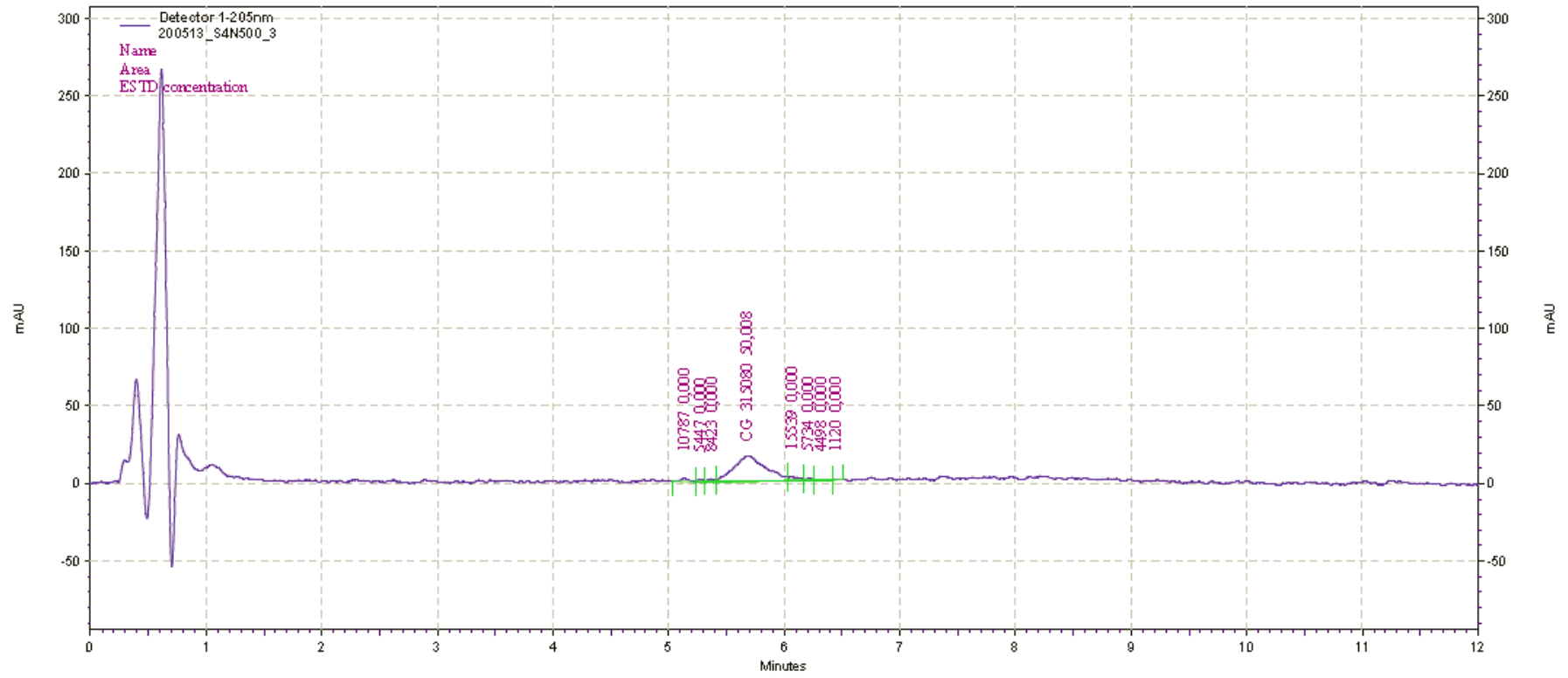


Şekil B. 7 D4M500_M: D4MIP'in breakthrough eğrisi çalışmasına ait elüsyon fraksiyonu.

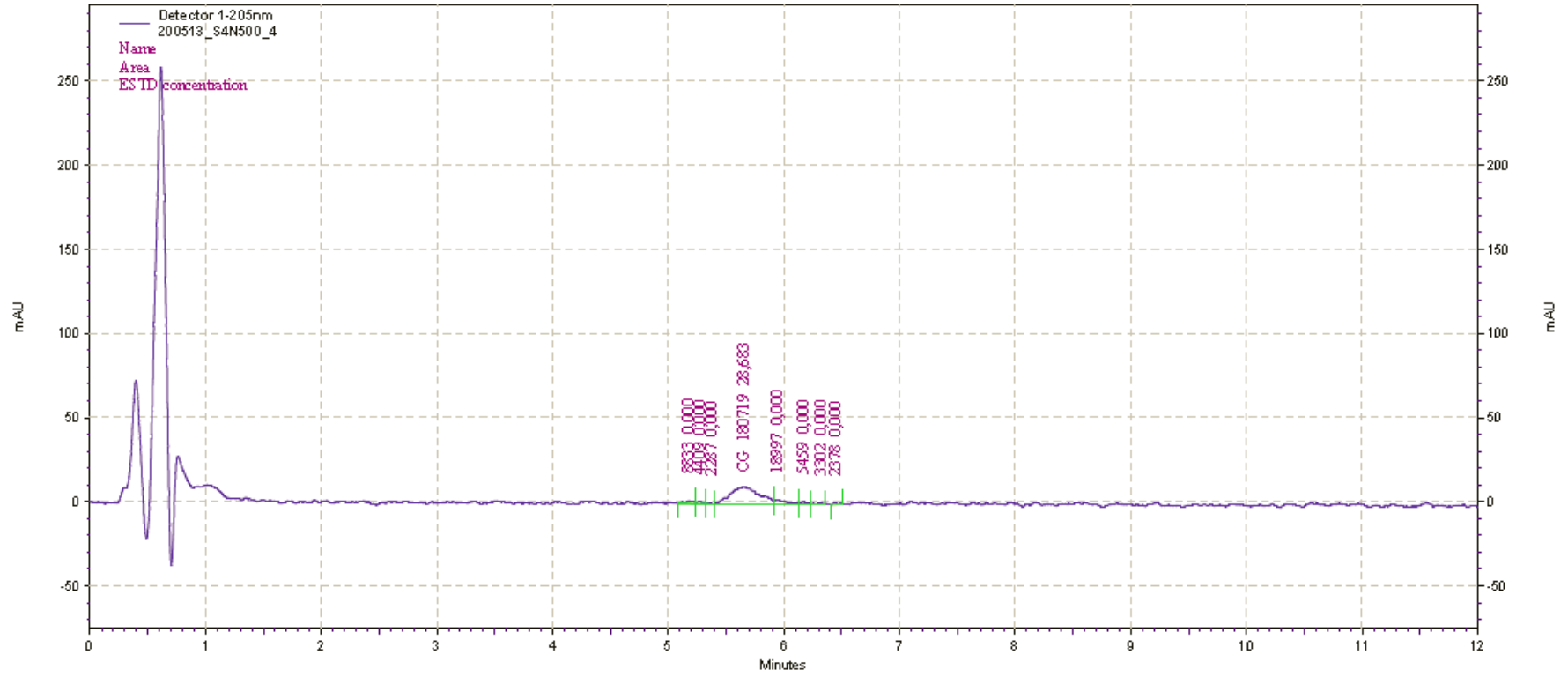
Şekil B. 8 D4N500_1: D4NIP'in breakthrough eğrisi çalışmasına ait 1. 2 ml'lik kloroform fraksiyonu.



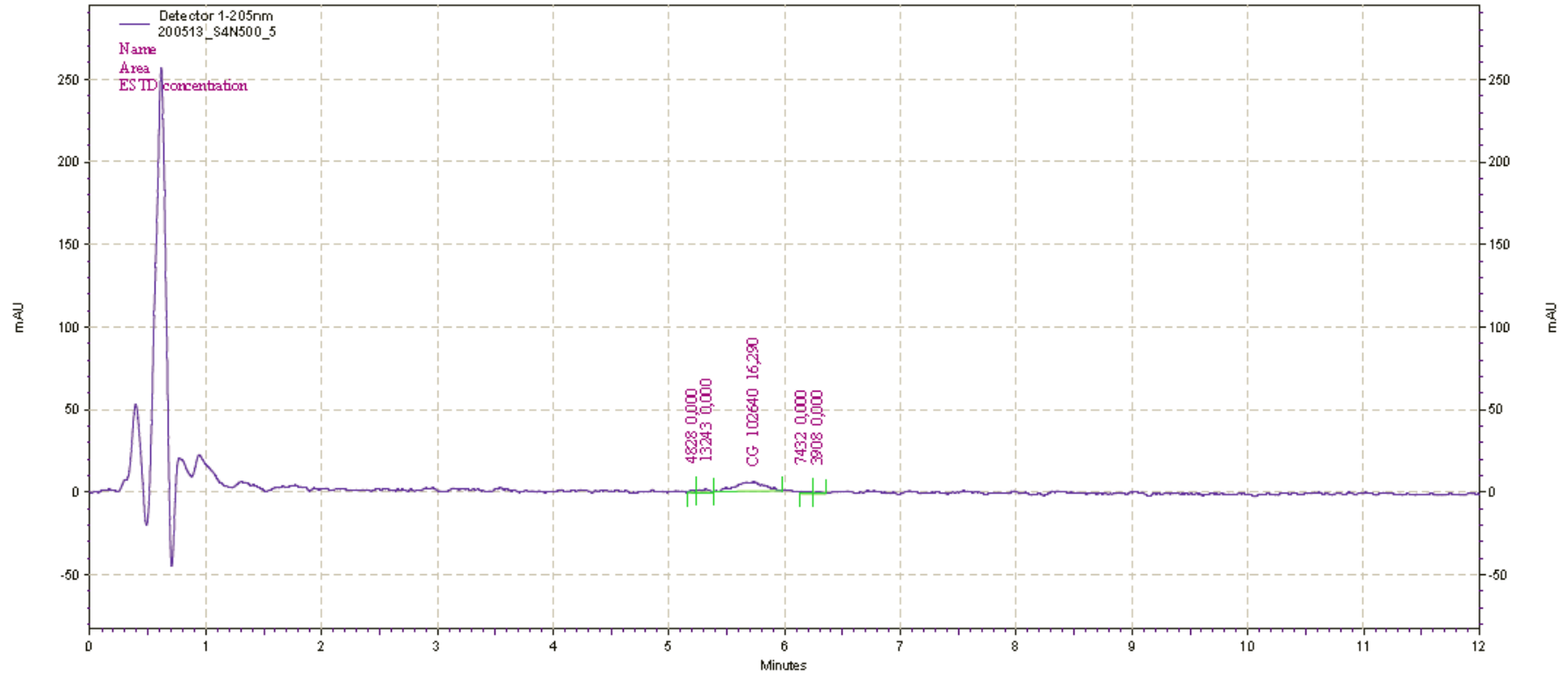
Şekil B. 9 D4N500_2: D4NIP'in breakthrough eğrisi çalışmasına ait 2. 2 ml'lik kloroform fraksiyonu.



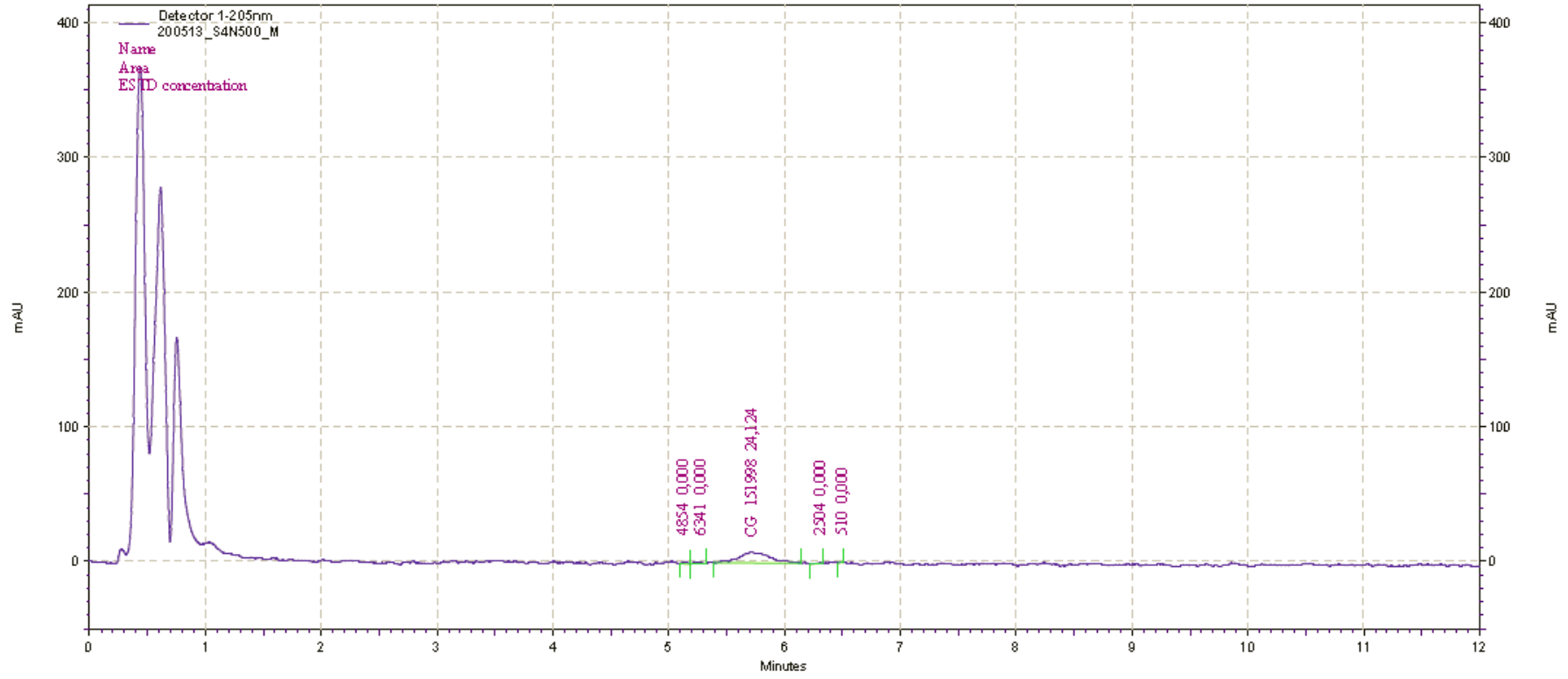
Şekil B. 10 D4N500_3: D4NIP'in breakthrough eğrisi çalışmasına ait 3. 2 ml'lik kloroform fraksiyonu.



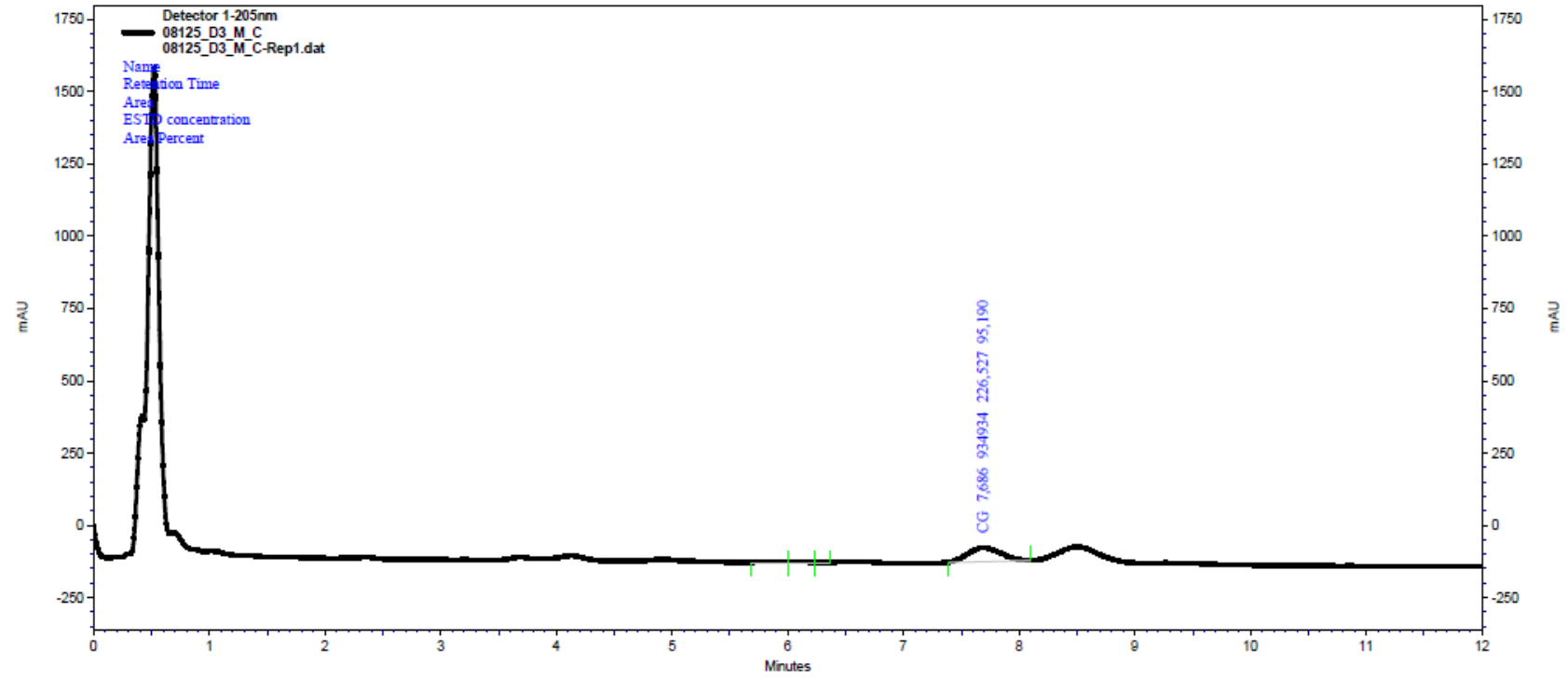
Şekil B. 11 D4N500_4: D4NIP'in breakthrough eğrisi çalışmasına ait 4. 2 ml'lik kloroform fraksiyonu.



Şekil B. 12 D4N500_5: D4NIP'in breakthrough eğrisi çalışmasına ait 5. 2 ml'lik kloroform fraksiyonu.

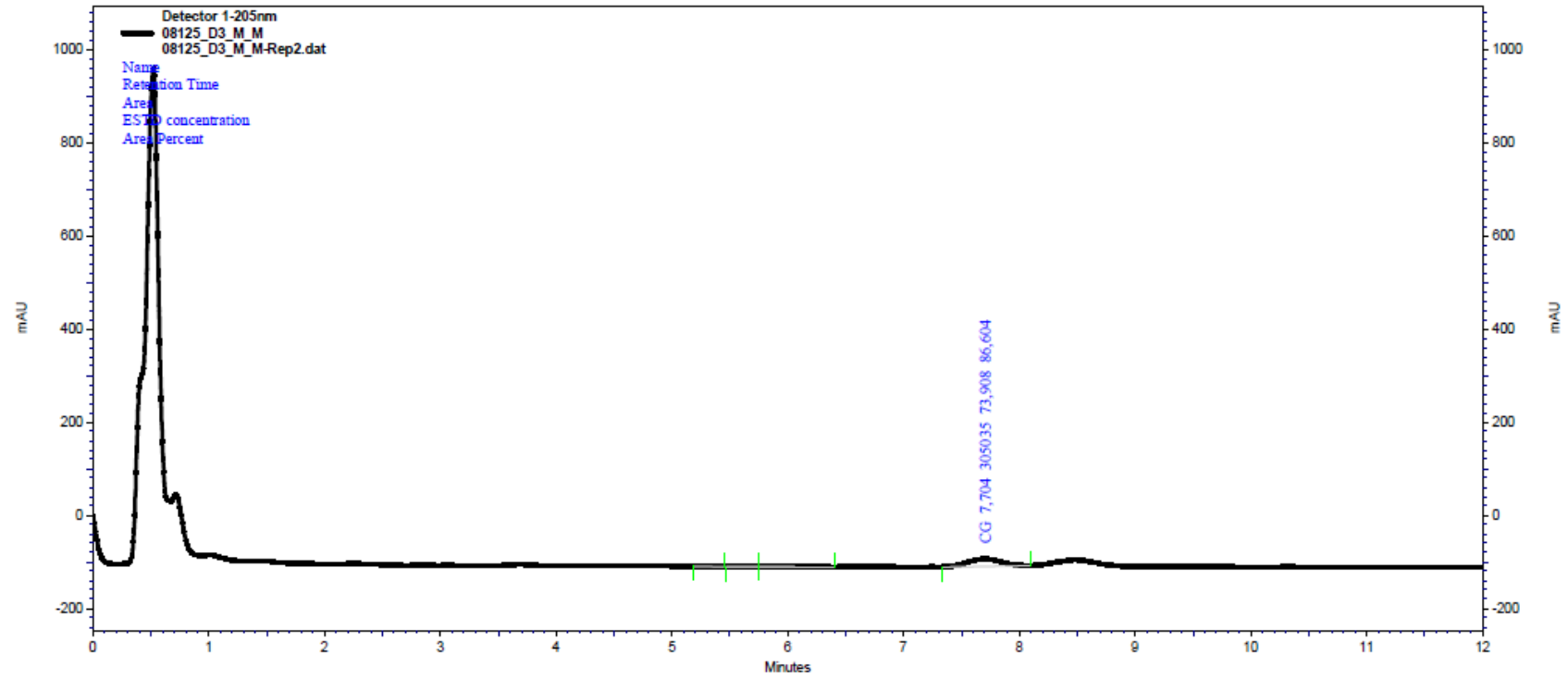


Şekil B. 13 D4N500_M: D4NIP'in breakthrough eğrisi çalışmasına ait elüsyon fraksiyonu.



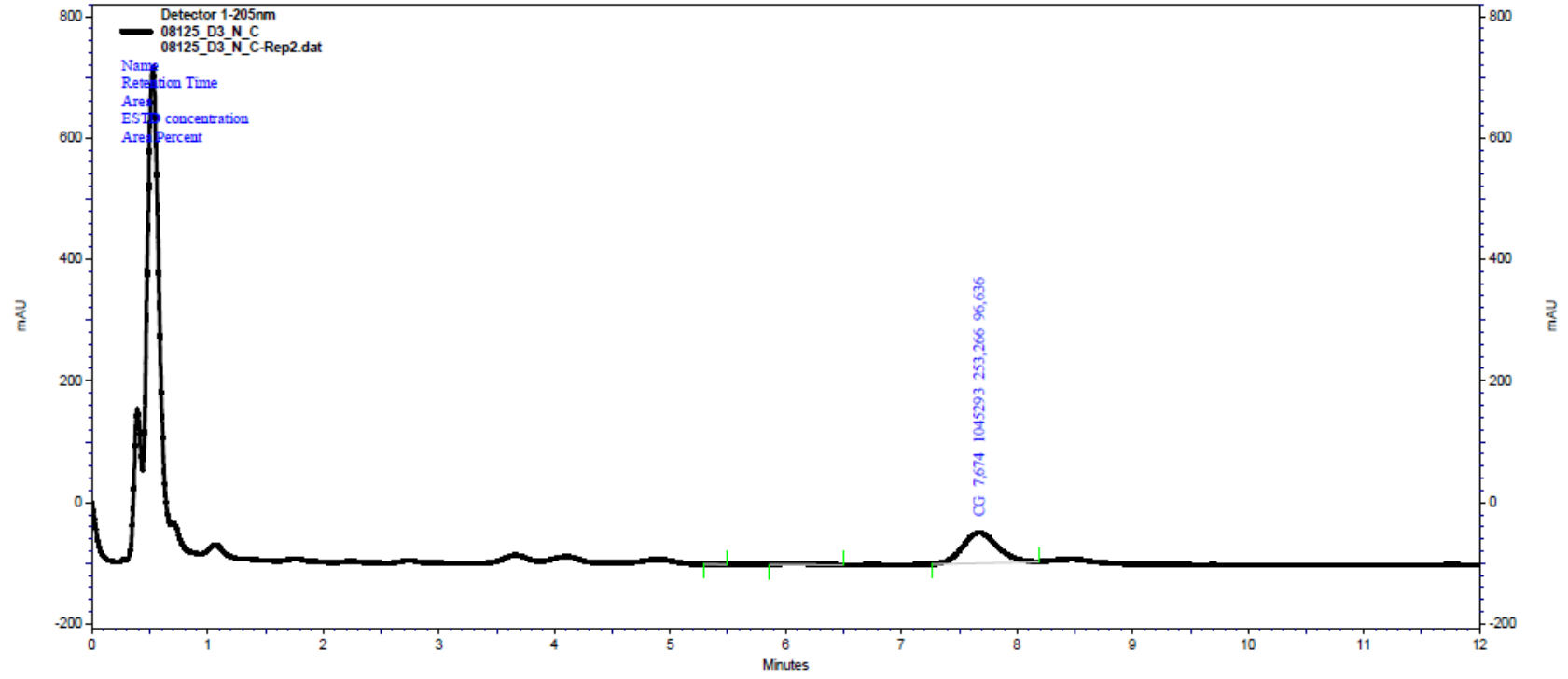
— C:\ChromQuest\Enterprise\Projects\Default\Data\08125_D3_M_C-Rep1.dat, Detector 1-205nm

Şekil B. 14 D3-MIP polimeri - katı faz ekstraksiyonu – kloroform fraksiyonu.



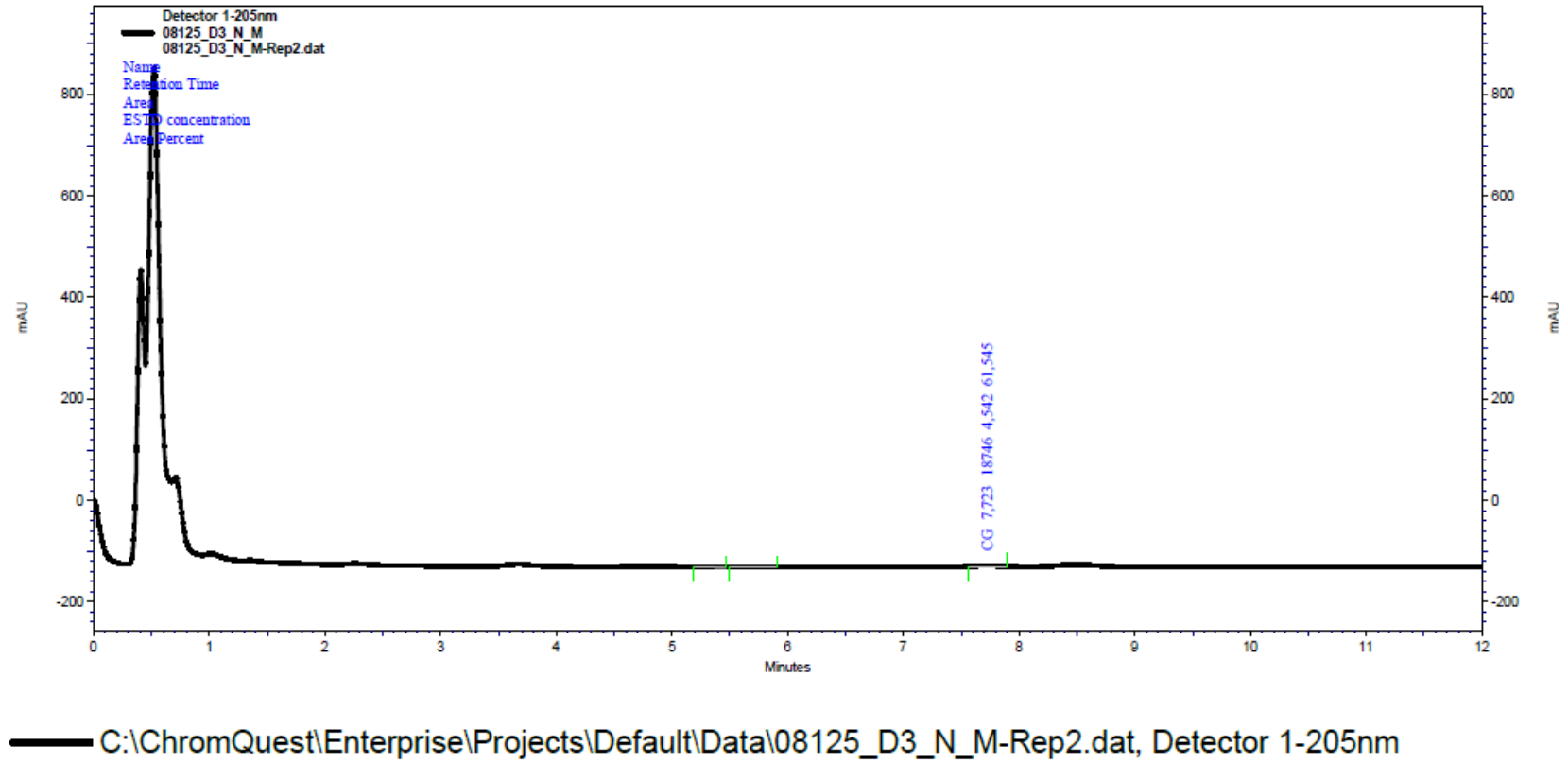
— C:\ChromQuest\Enterprise\Projects\Default\Data\08125_D3_M_M-Rep2.dat, Detector 1-205nm

Şekil B. 15 D3-MIP polimeri - katı faz ekstraksiyonu – metanol fraksiyonu.

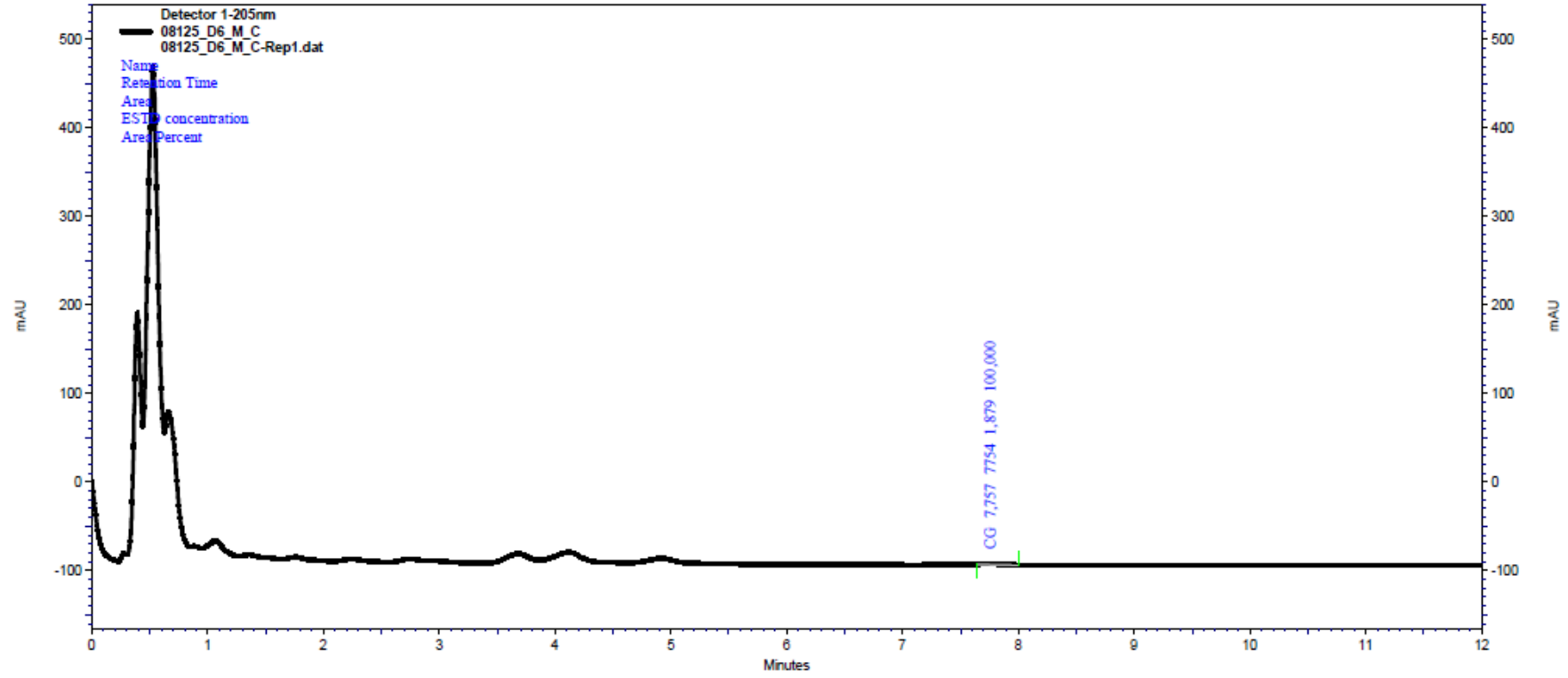


— C:\ChromQuest\Enterprise\Projects\Default\Data\08125_D3_N_C-Rep2.dat, Detector 1-205nm

Şekil B. 16 D3-NIP polimeri - katı faz ekstraksiyonu – kloroform fraksiyonu.

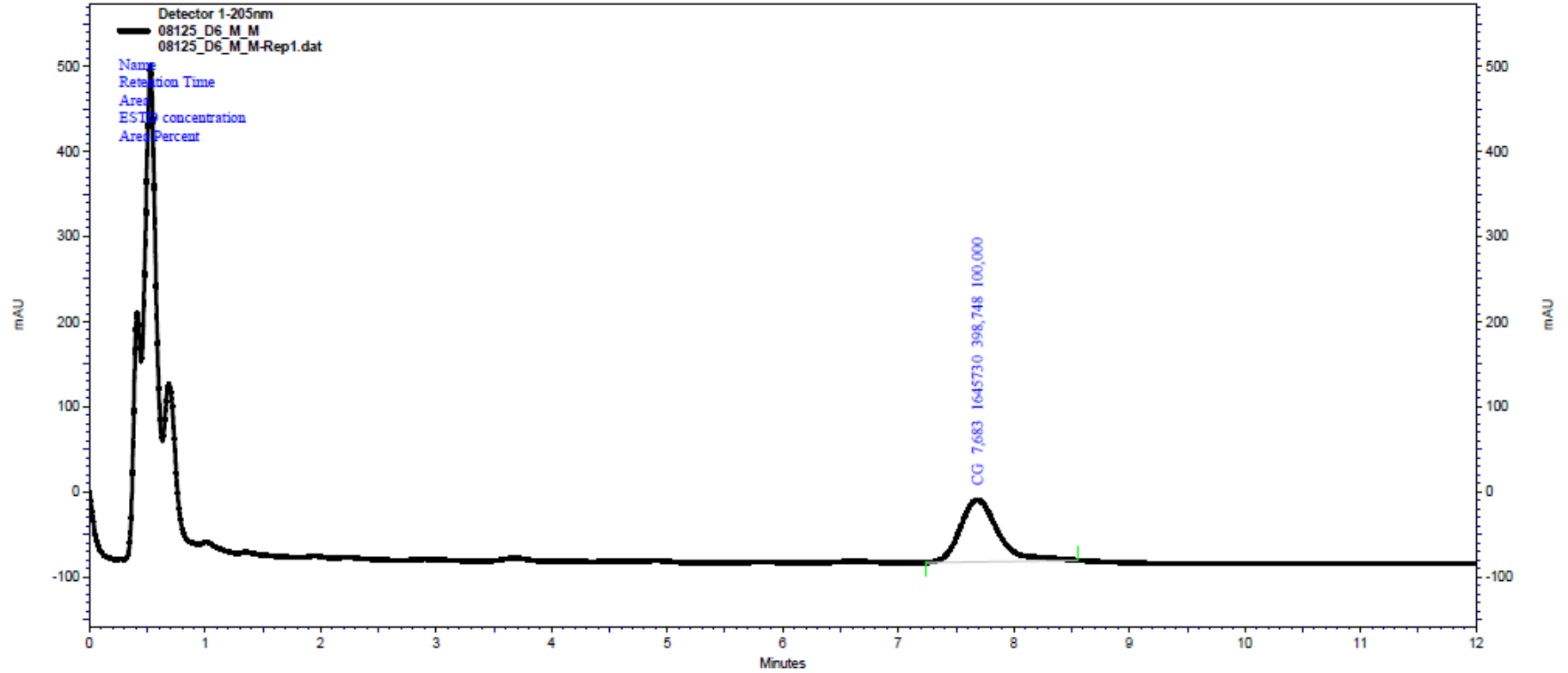


Şekil B. 17 D3-NIP polimeri - katı faz ekstraksiyonu – metanol fraksiyonu.



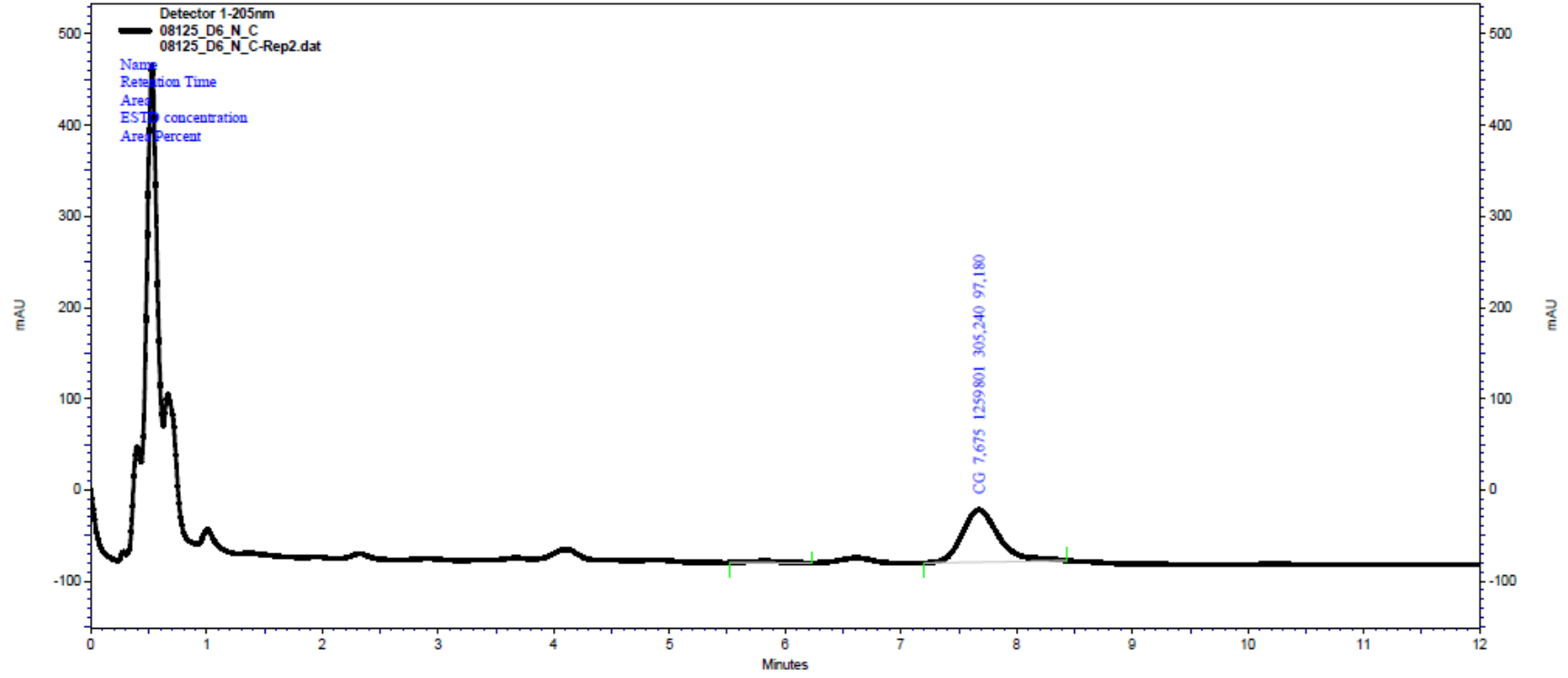
— C:\ChromQuest\Enterprise\Projects\Default\Data\08125_D6_M_C-Rep1.dat, Detector 1-205nm

Şekil B. 18 D6-MIP polimeri - katı faz ekstraksiyonu – kloroform fraksiyonu.



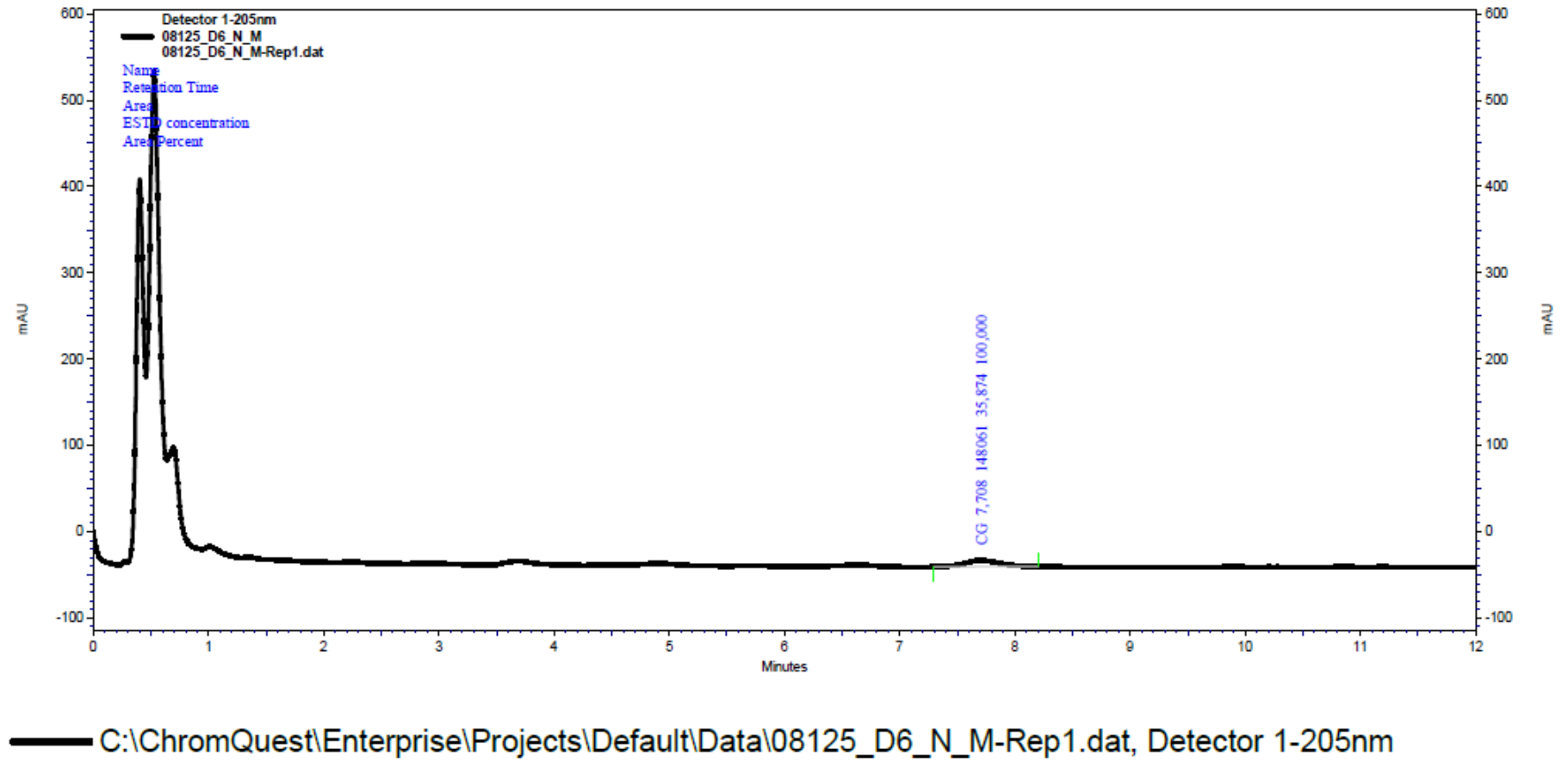
— C:\ChromQuest\Enterprise\Projects\Default\Data\08125_D6_M_M-Rep1.dat, Detector 1-205nm

Şekil B. 19 D6-MIP polimeri - katı faz ekstraksiyonu – metanol fraksiyonu.

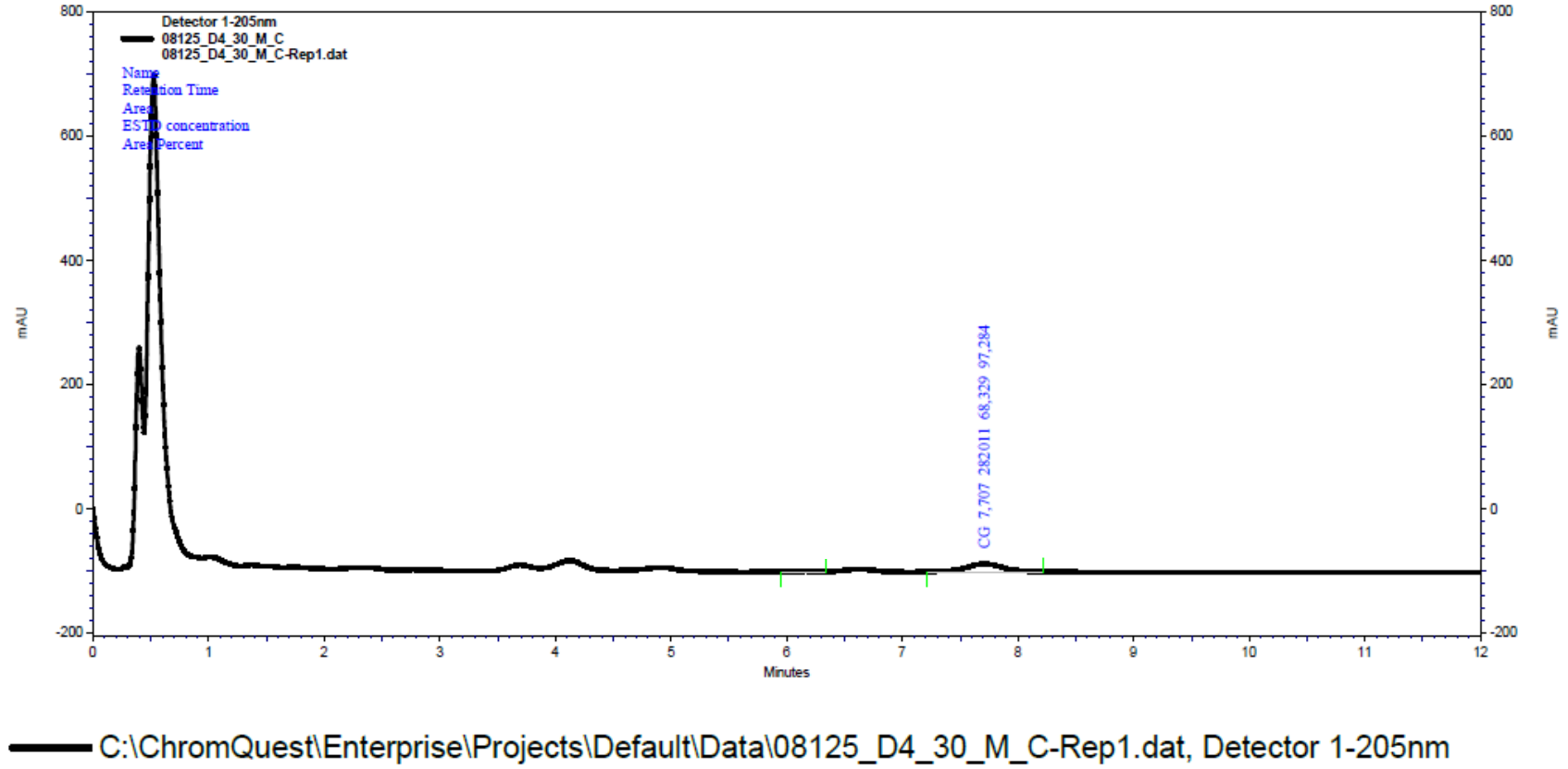


— C:\ChromQuest\Enterprise\Projects\Default\Data\08125_D6_N_C-Rep2.dat, Detector 1-205nm

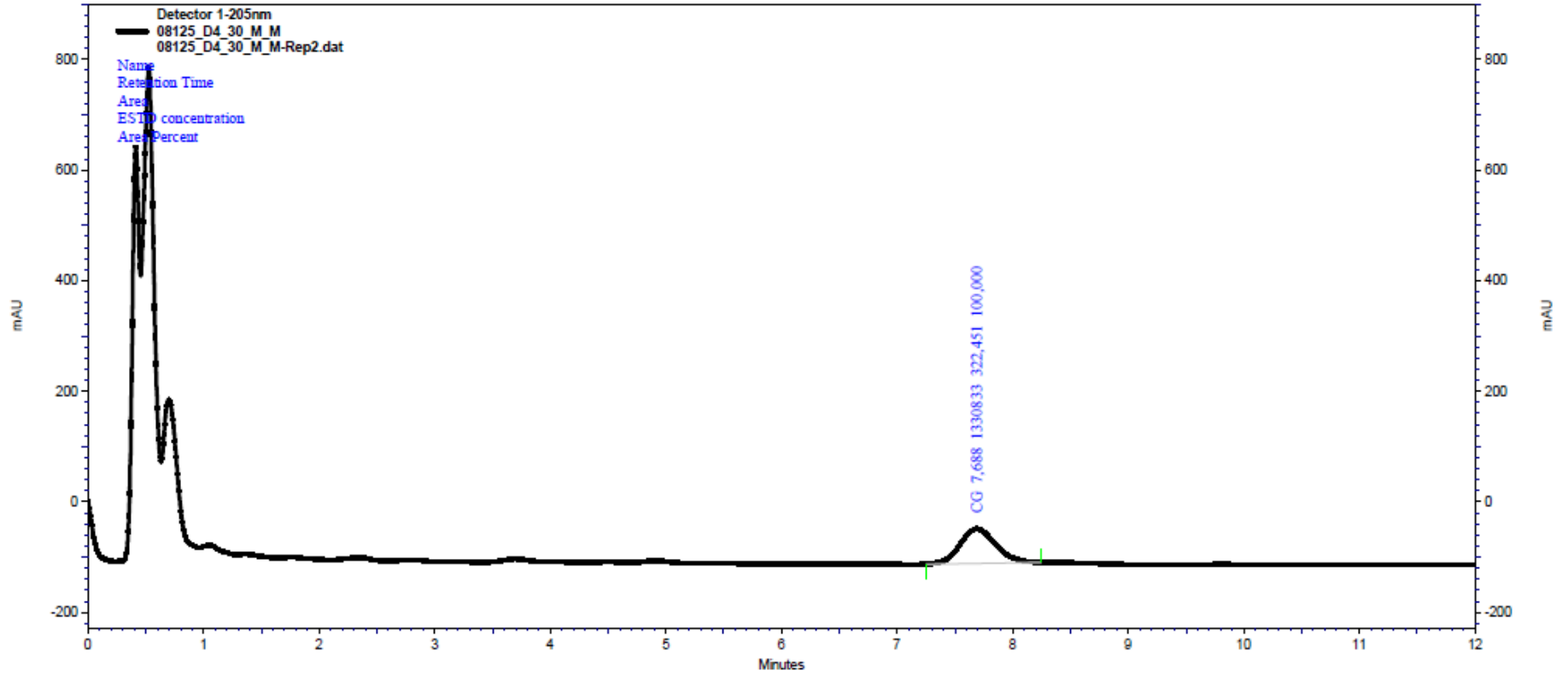
Şekil B. 20 D6-NIP polimeri - katı faz ekstraksiyonu – kloroform fraksiyonu.



Şekil B. 21 D6-NIP polimeri - katı faz ekstraksiyonu – metanol fraksiyonu.

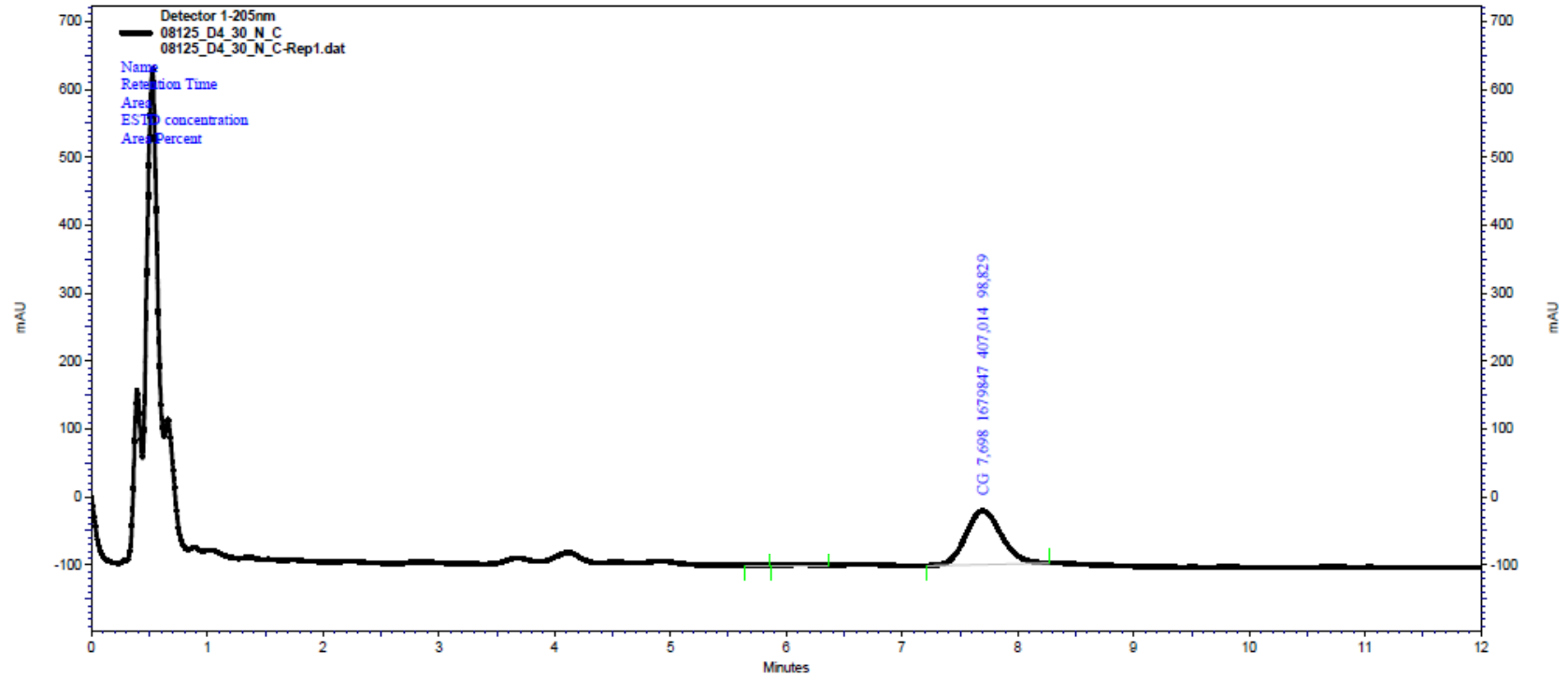


Şekil B. 22 D4-30-MIP polimeri - katı faz ekstraksiyonu – kloroform fraksiyonu.



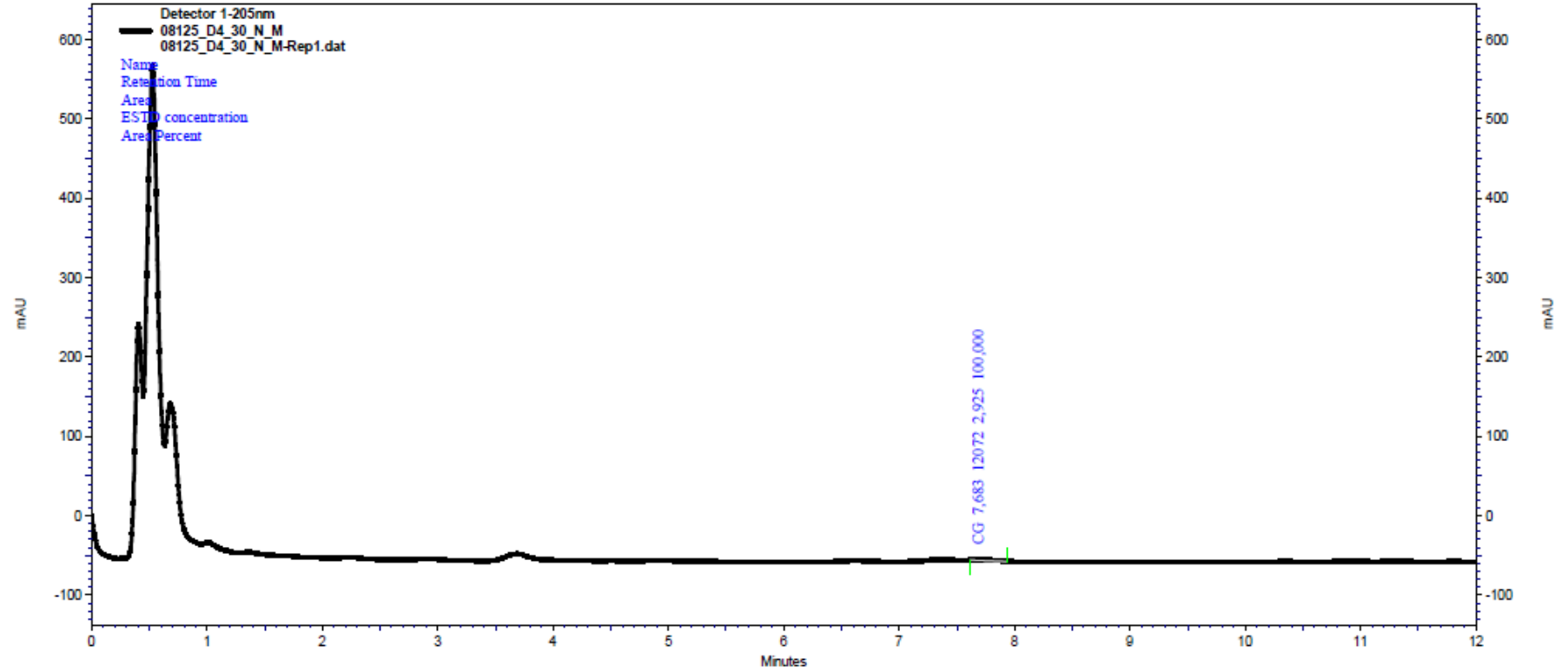
— C:\ChromQuest\Enterprise\Projects\Default\Data\08125_D4_30_M_M-Rep2.dat, Detector 1-205nm

Şekil B. 23 D4-30-MIP polimeri - katı faz ekstraksiyonu – metanol fraksiyonu.



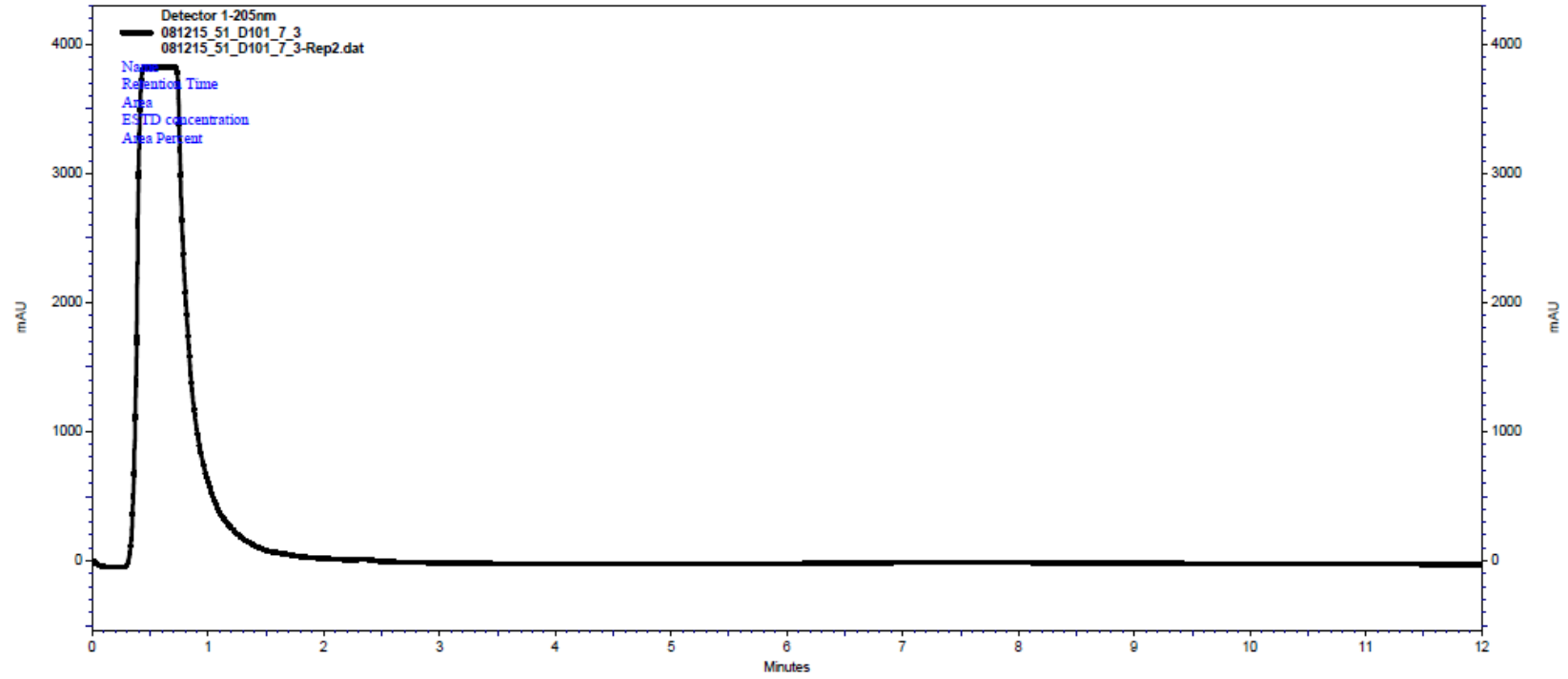
— C:\ChromQuest\Enterprise\Projects\Default\Data\08125_D4_30_N_C-Rep1.dat, Detector 1-205nm

Şekil B. 24 D4-30-NIP polimeri - katı faz ekstraksiyonu – kloroform fraksiyonu.



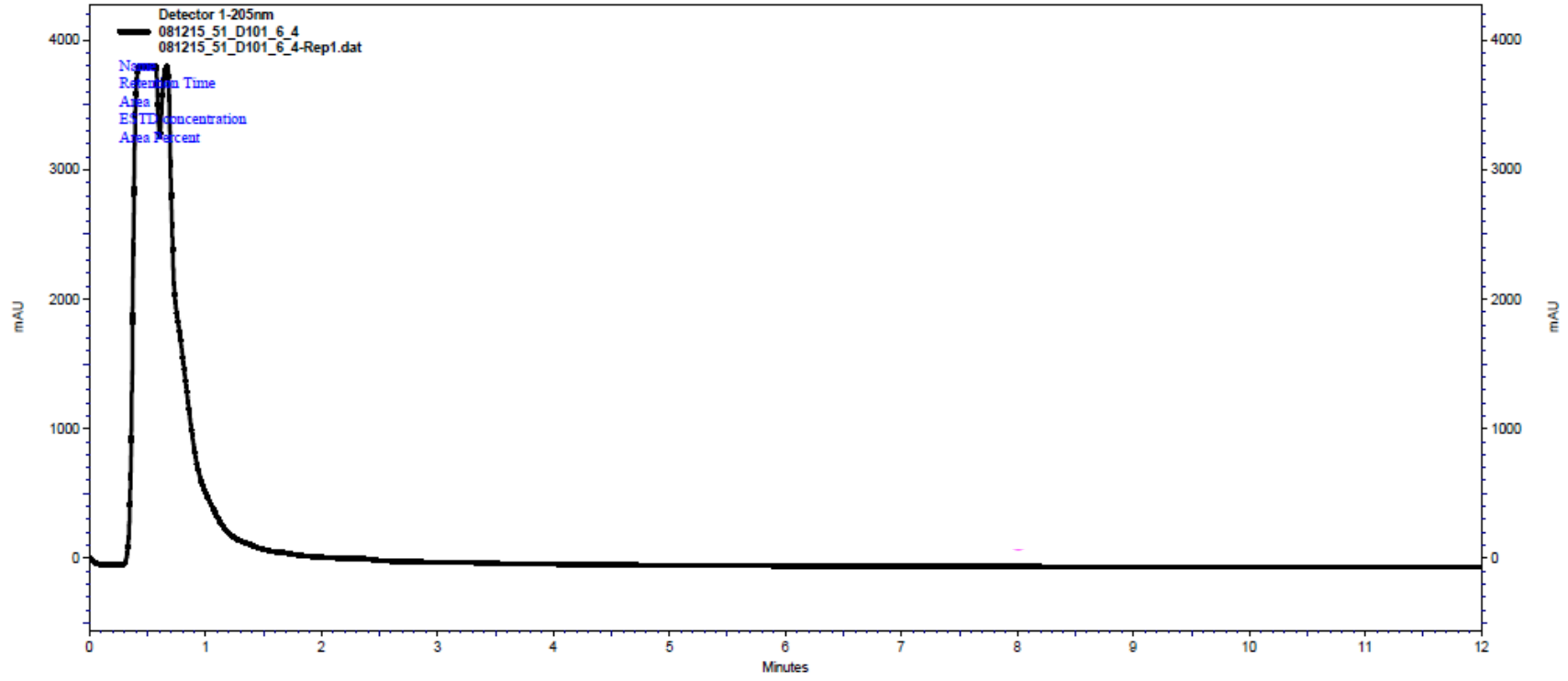
— C:\ChromQuest\Enterprise\Projects\Default\Data\08125_D4_30_N_M-Rep1.dat, Detector 1-205nm

Şekil B. 25 D4-30-NIP polimeri - katı faz ekstraksiyonu – metanol fraksiyonu.



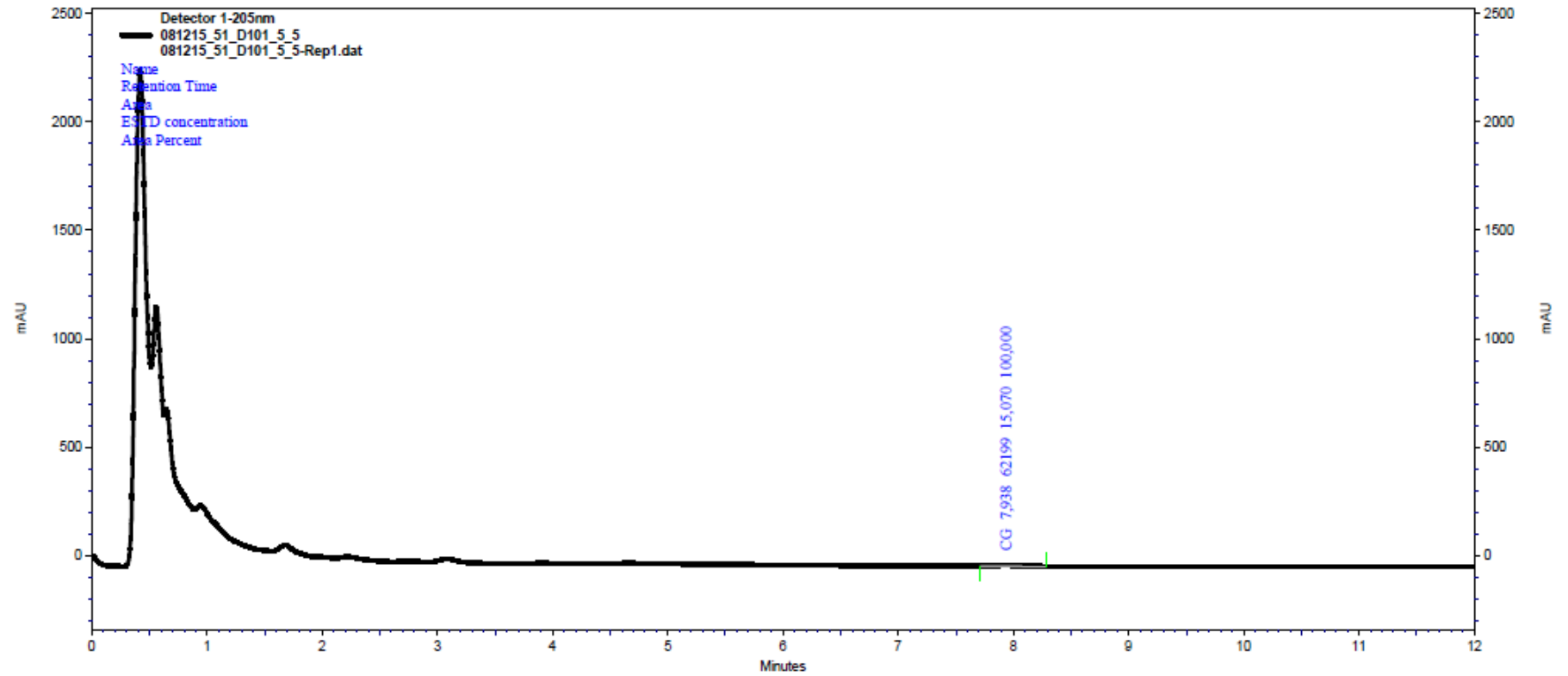
— C:\ChromQuest\Enterprise\Projects\Default\Data\081215_51_D101_7_3-Rep2.dat, Detector 1-205nm

Şekil B. 26 D101 polimeri 70:30 (su:AcN) fraksiyonu.



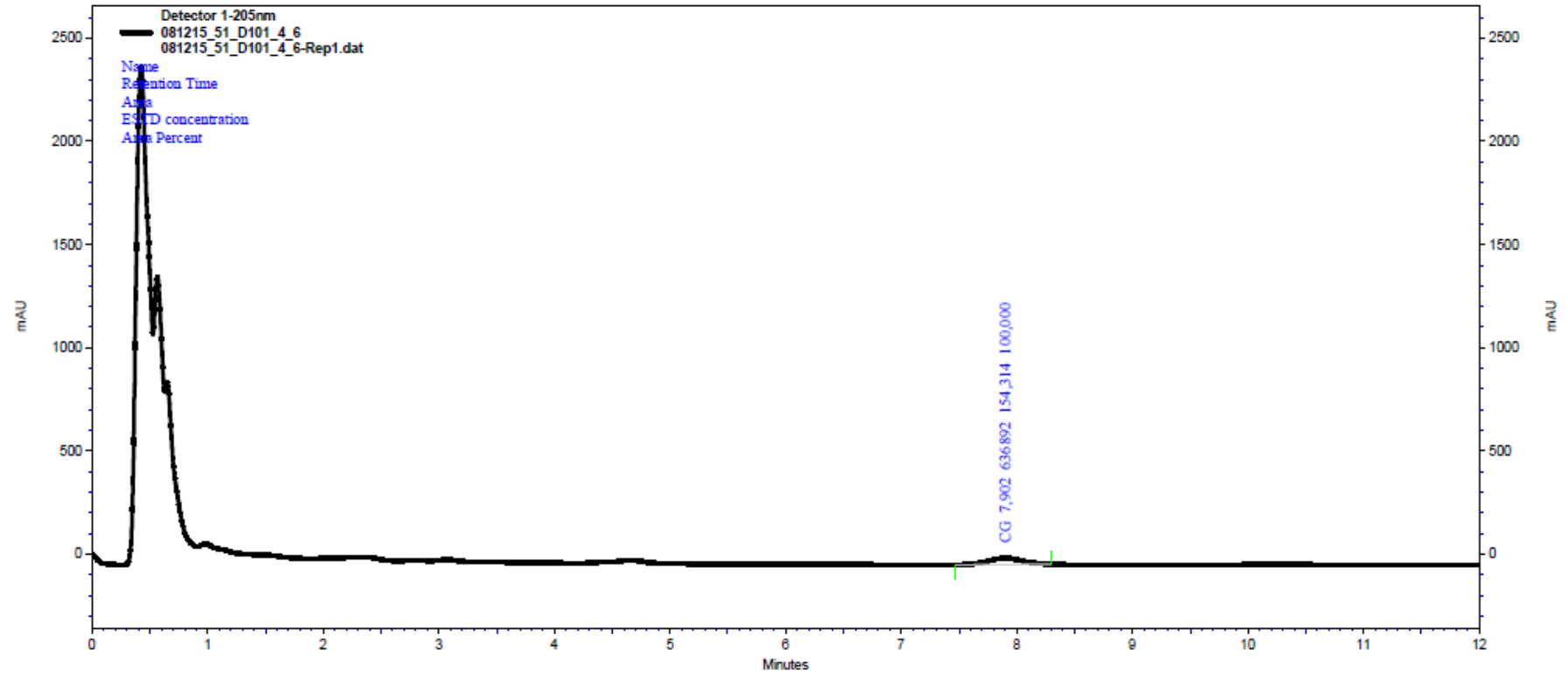
— C:\ChromQuest\Enterprise\Projects\Default\Data\081215_51_D101_6_4-Rep1.dat, Detector 1-205nm

Şekil B. 27 D101 polimeri 60:40 (su:AcN) fraksiyonu.



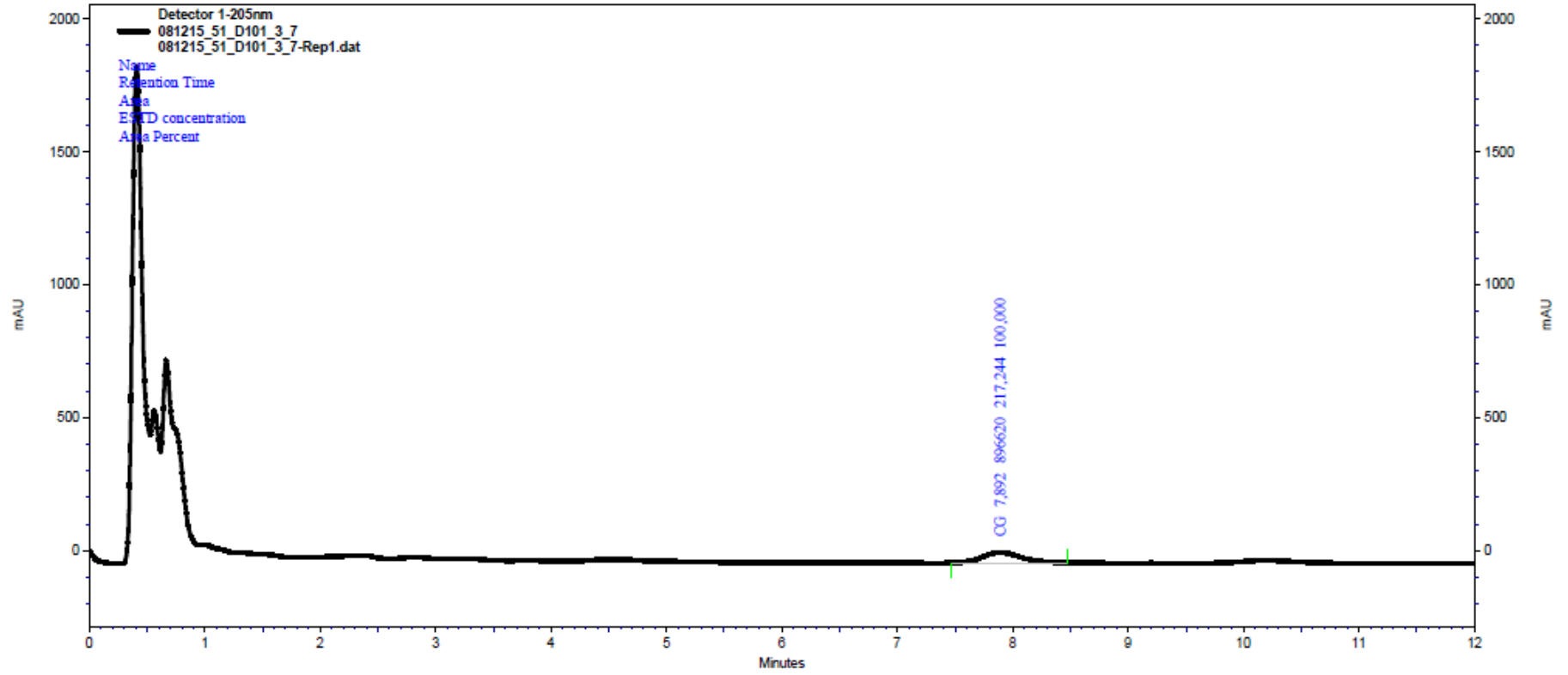
— C:\ChromQuest\Enterprise\Projects\Default\Data\081215_51_D101_5_5-Rep1.dat, Detector 1-205nm

Şekil B. 28 D101 polimeri 50:50 (su:AcN) fraksiyonu.



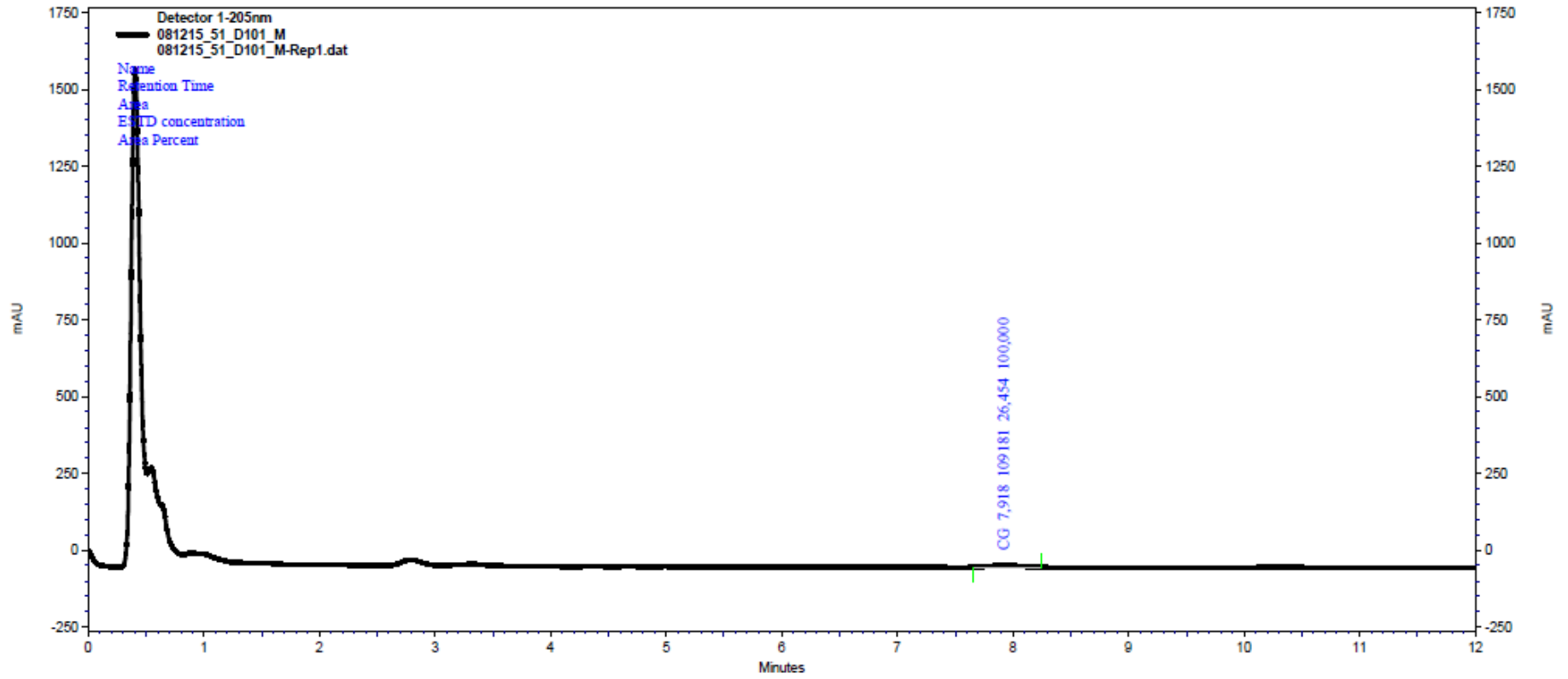
— C:\ChromQuest\Enterprise\Projects\Default\Data\081215_51_D101_4_6-Rep1.dat, Detector 1-205nm

Şekil B. 29 D101 polimeri 40:60 (su:AcN) fraksiyonu.



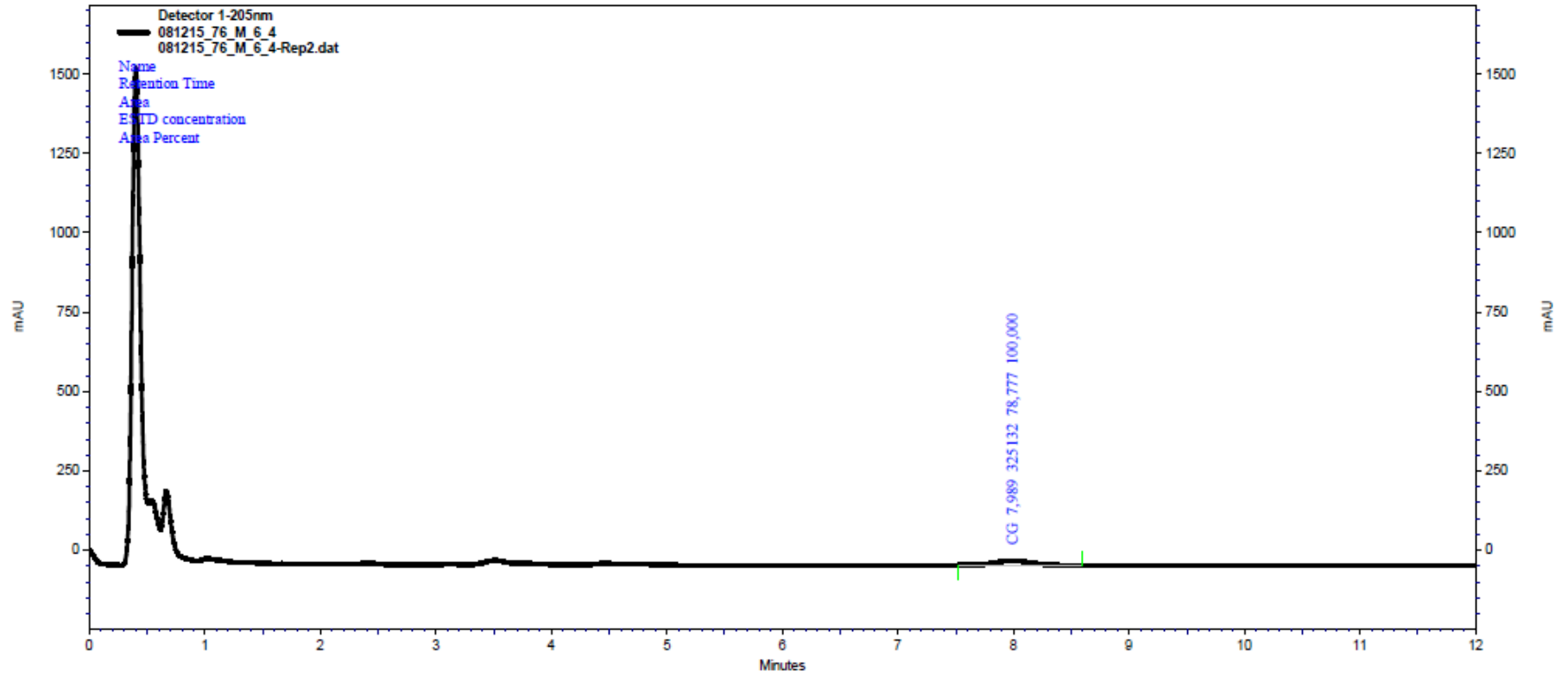
— C:\ChromQuest\Enterprise\Projects\Default\Data\081215_51_D101_3_7-Rep1.dat, Detector 1-205nm

Şekil B. 30 D101 polimeri 30:70 (su:AcN) fraksiyonu.



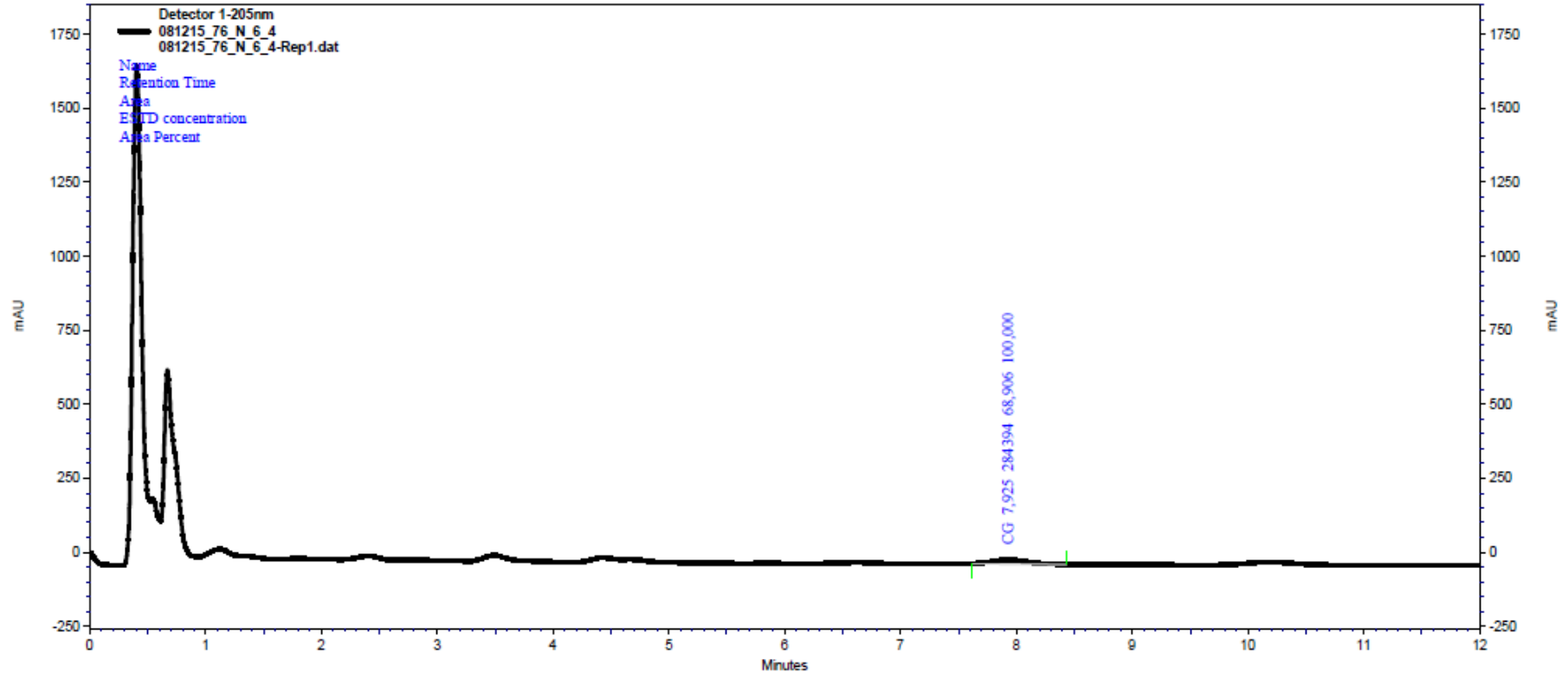
— C:\ChromQuest\Enterprise\Projects\Default\Data\081215_51_D101_M-Rep1.dat, Detector 1-205nm

Şekil B. 31 D101 polimeri metanol fraksiyonu.



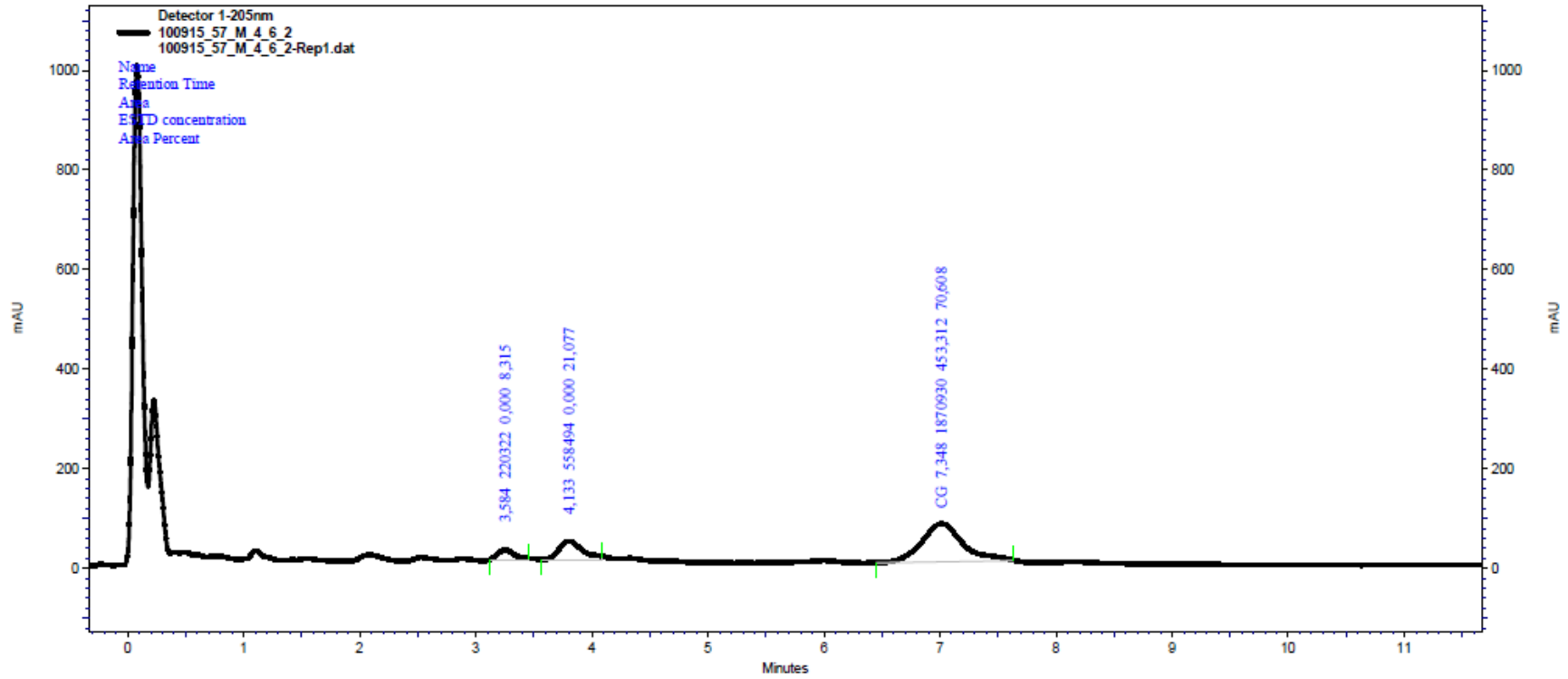
— C:\ChromQuest\Enterprise\Projects\Default\Data\081215_76_M_6_4-Rep2.dat, Detector 1-205nm

Şekil B. 32 D6-MIP – *Astragalus* ekstresi – 40:60 (su:AcN) fraksiyonu.



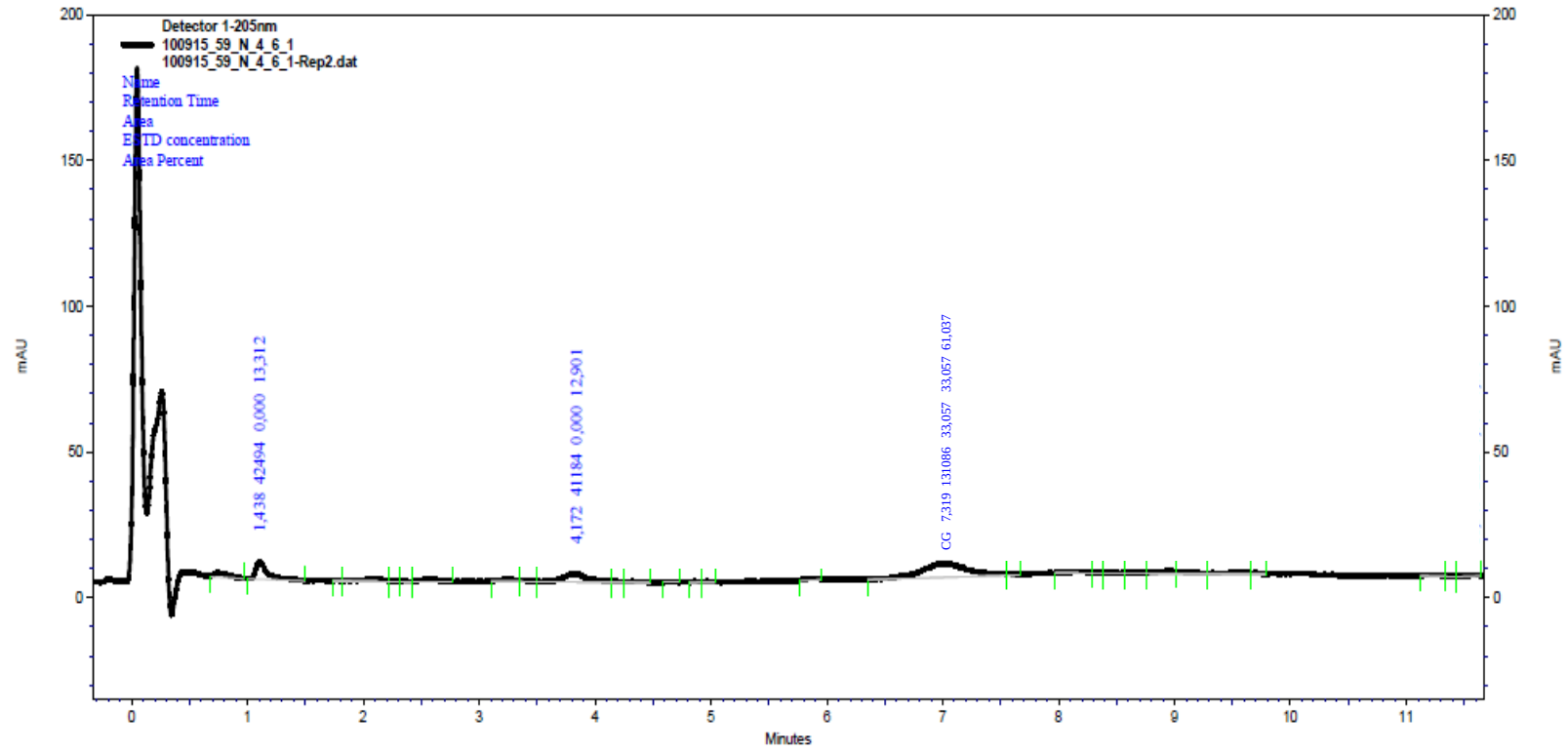
— C:\ChromQuest\Enterprise\Projects\Default\Data\081215_76_N_6_4-Rep1.dat, Detector 1-205nm

Şekil B. 33 D6-NIP – *Astragalus* ekstresi – 40:60 (su:AcN) fraksiyonu.



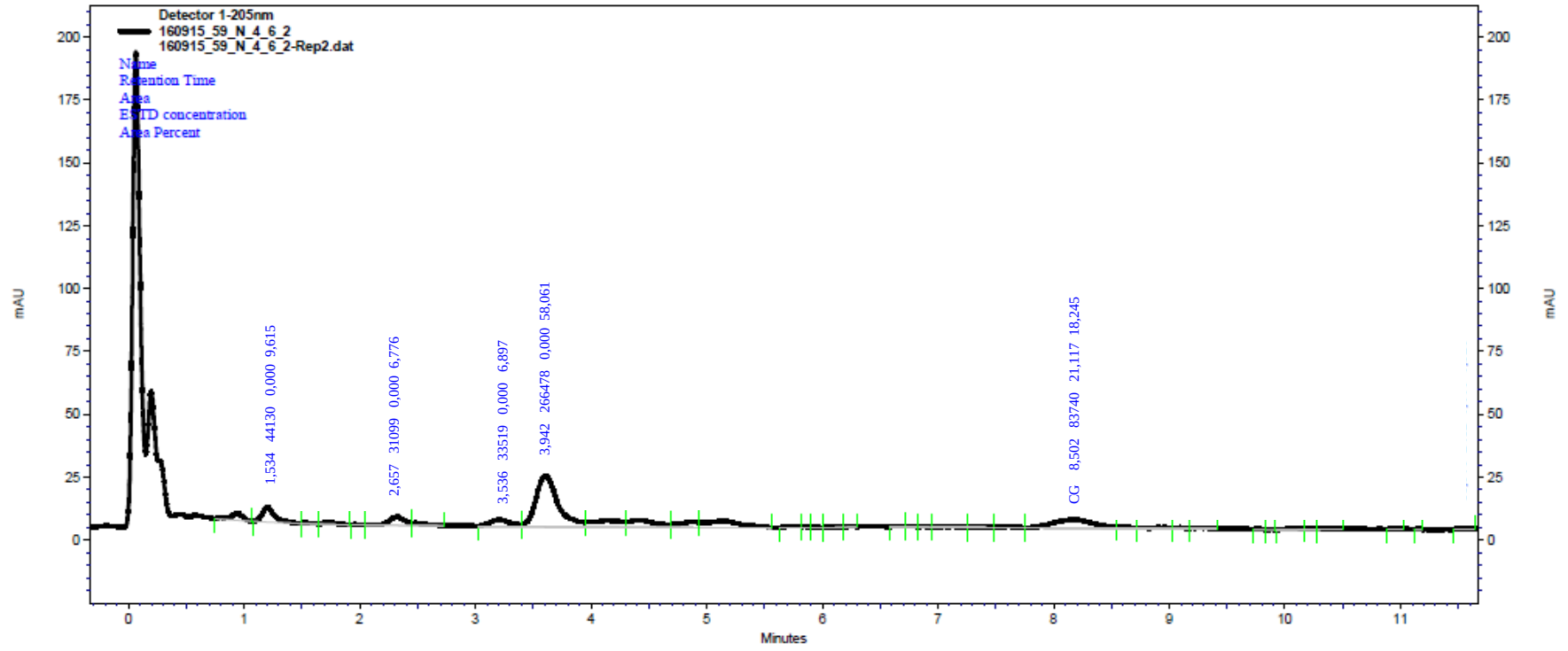
— C:\ChromQuest\Enterprise\Projects\Default\Data\26102015\100915_57_M_4_6_2-Rep1.dat, Detector 1-205nm

Şekil B. 34 D4-MIP – 10g – 40:60(2) su:AcN fraksiyonu.



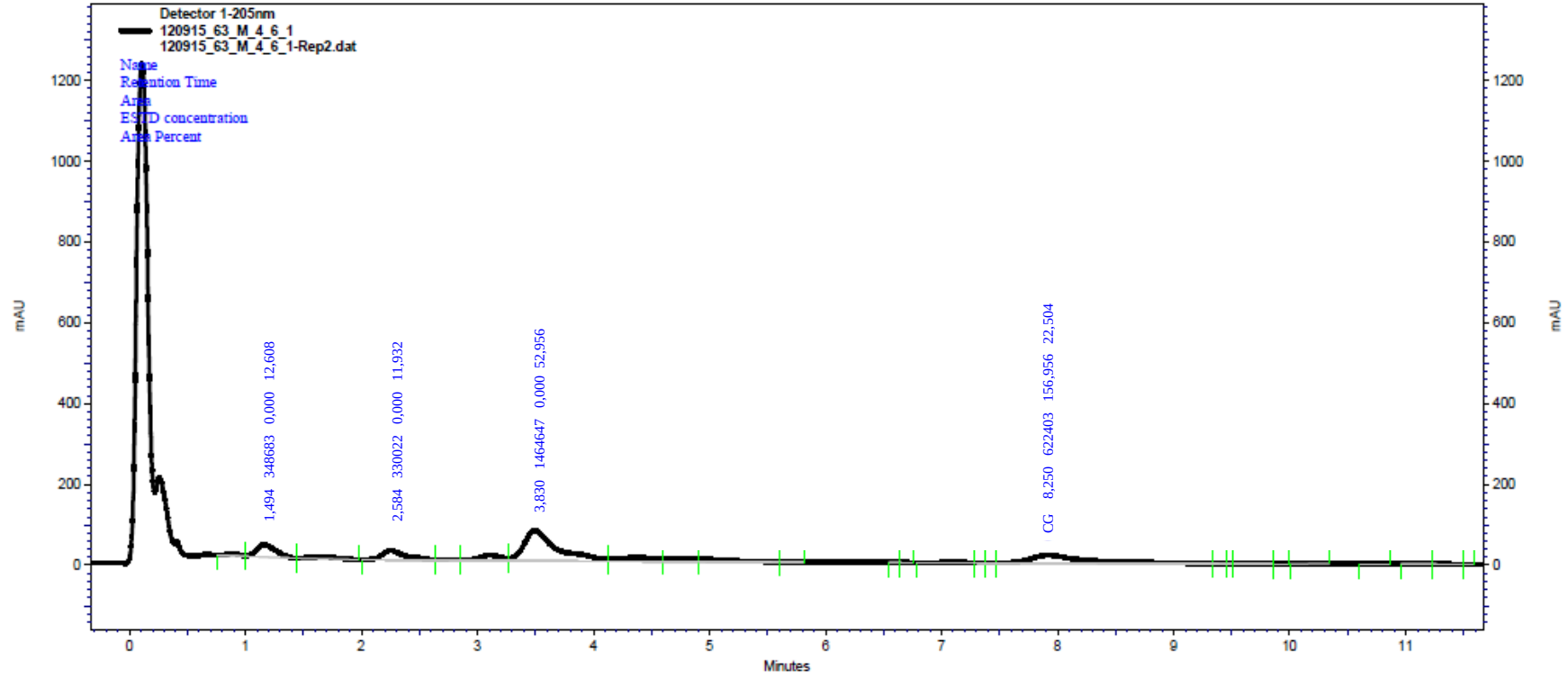
— C:\ChromQuest\Enterprise\Projects\Default\Data\26102015\100915_59_N_4_6_1-Rep2.dat, Detector 1-205nm

Şekil B. 35 D4-NIP – 10g – 40:60(1) su:AcN fraksiyonu.



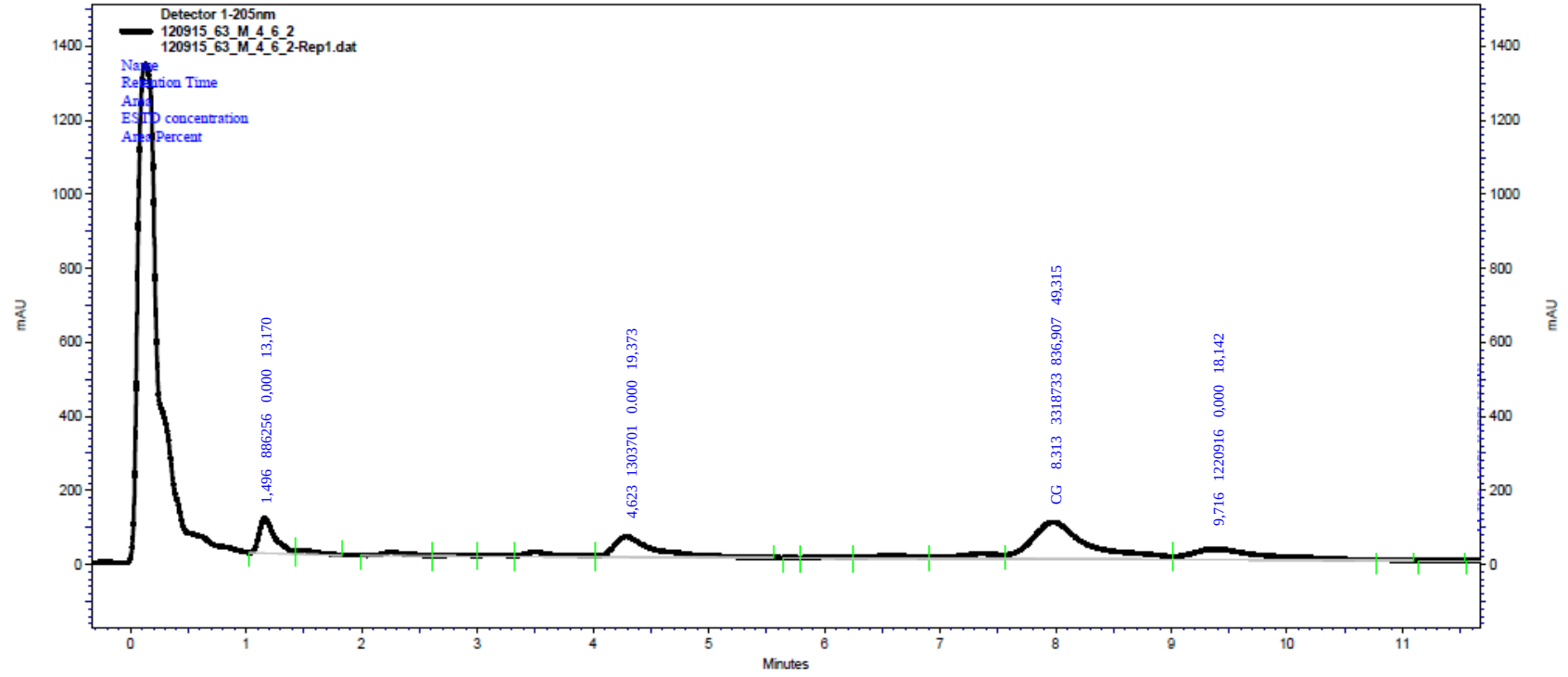
— C:\ChromQuest\Enterprise\Projects\Default\Data\26102015\160915_59_N_4_6_2-Rep2.dat, Detector 1-205nm

Şekil B. 36 D4-NIP - 10g – 40:60(2) su:AcN fraksiyonu.



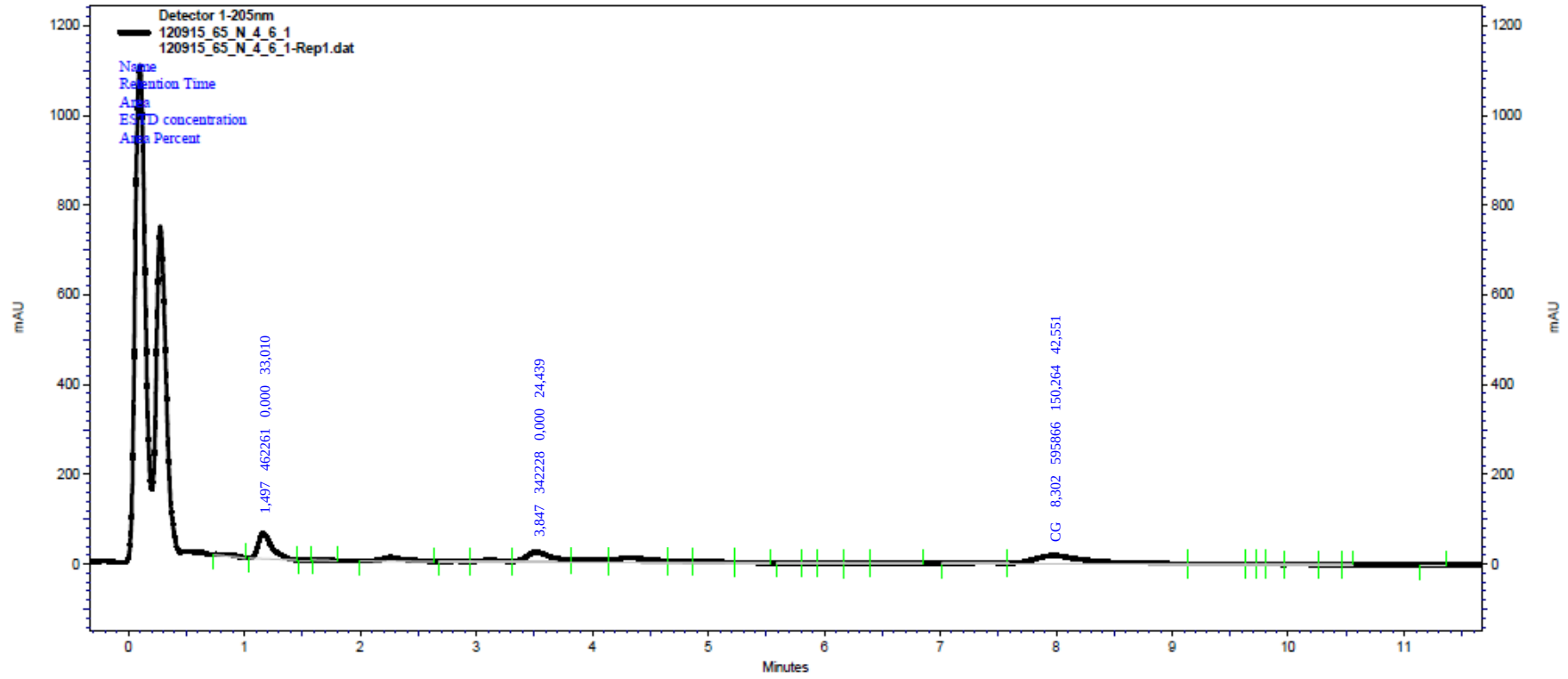
— C:\ChromQuest\Enterprise\Projects\Default\Data\26102015\120915_63_M_4_6_1-Rep2.dat, Detector 1-205nm

Şekil B. 37 D4-MIP - 100g – 40:60(1) su:AcN fraksiyonu.



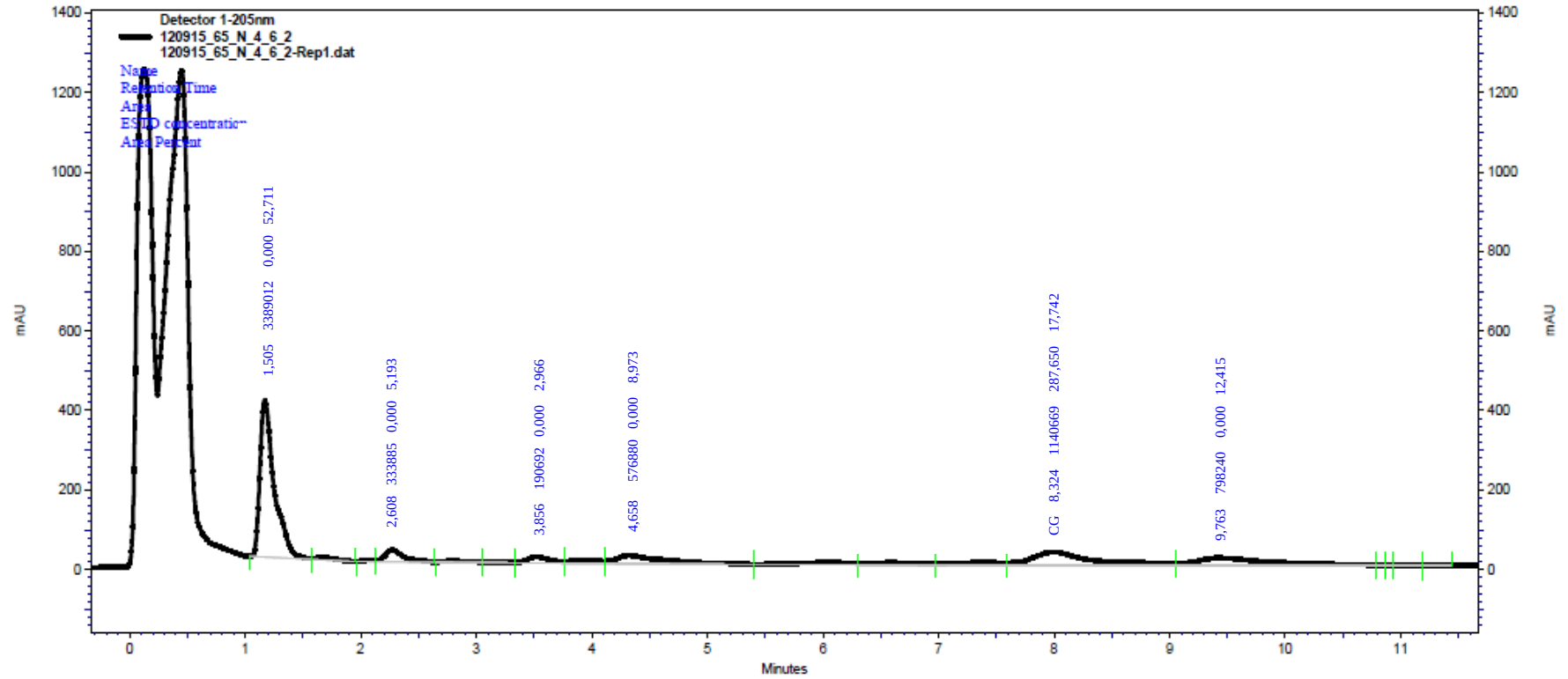
— C:\ChromQuest\Enterprise\Projects\Default\Data\26102015\120915_63_M_4_6_2-Rep1.dat, Detector 1-205nm

Şekil B. 38 D4-MIP - 100g – 40:60(2) su:AcN fraksiyonu.



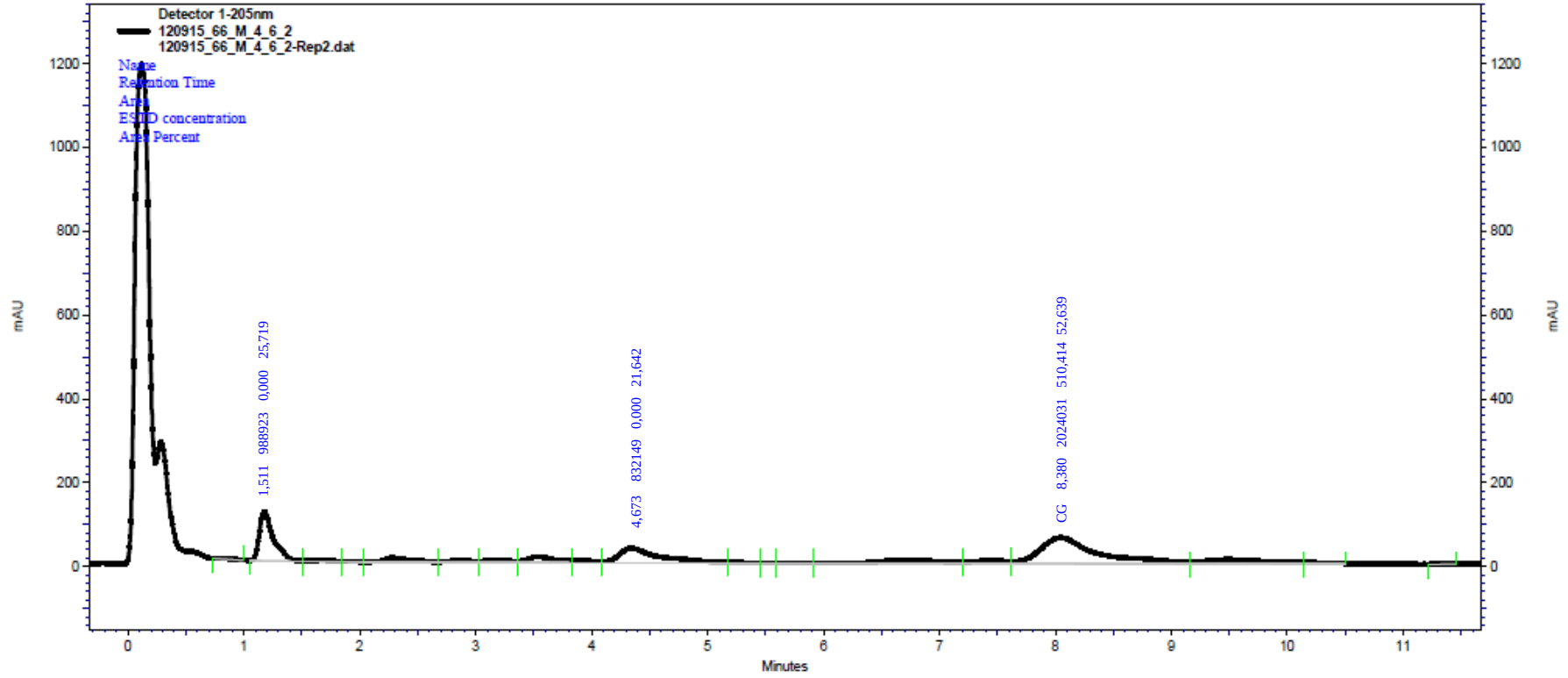
— C:\ChromQuest\Enterprise\Projects\Default\Data\26102015\120915_65_N_4_6_1-Rep1.dat, Detector 1-205nm

Şekil B. 39 D4-NIP - 100g – 40:60(1) su:AcN fraksiyonu.



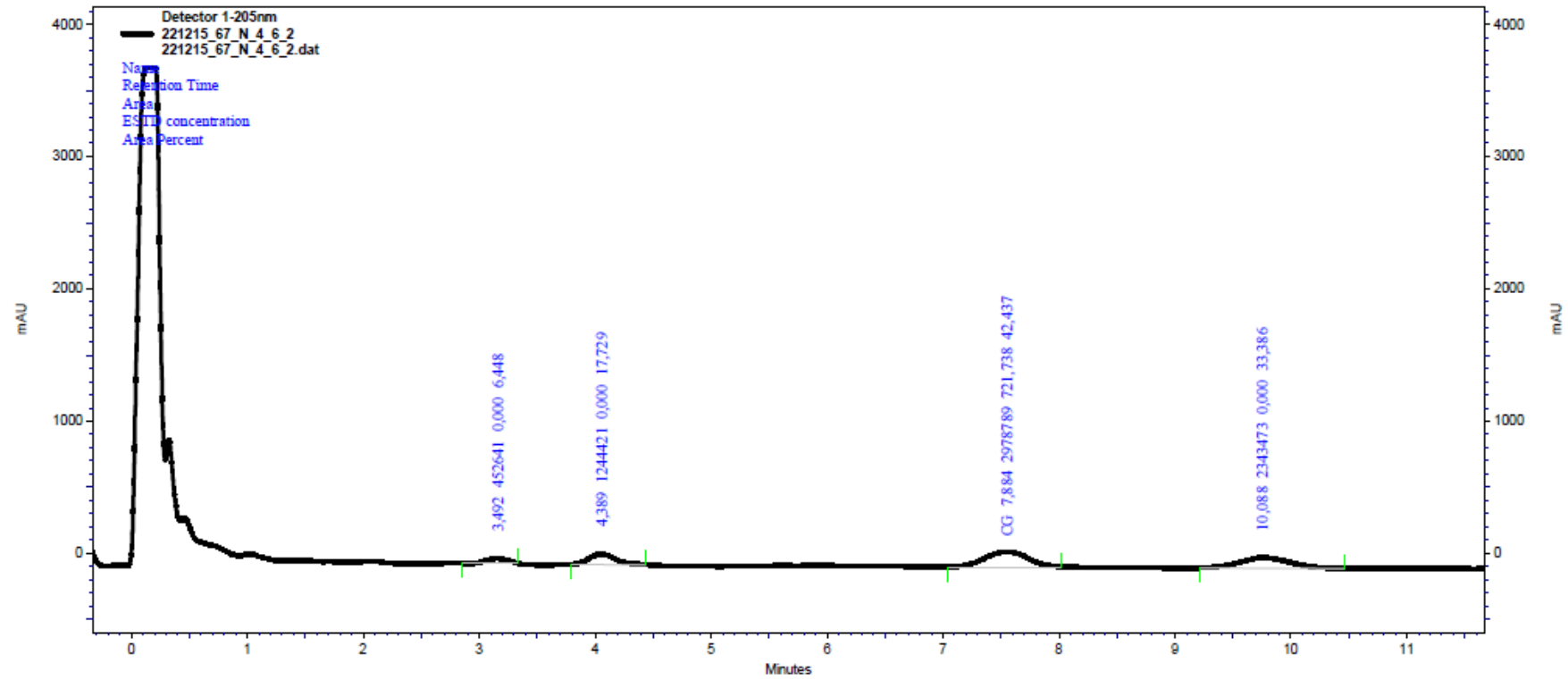
— C:\ChromQuest\Enterprise\Projects\Default\Data\26102015\120915_65_N_4_6_2-Rep1.dat, Detector 1-205nm

Şekil B. 40 D4-NIP - 100g – 40:60(2) su:AcN fraksiyonu.



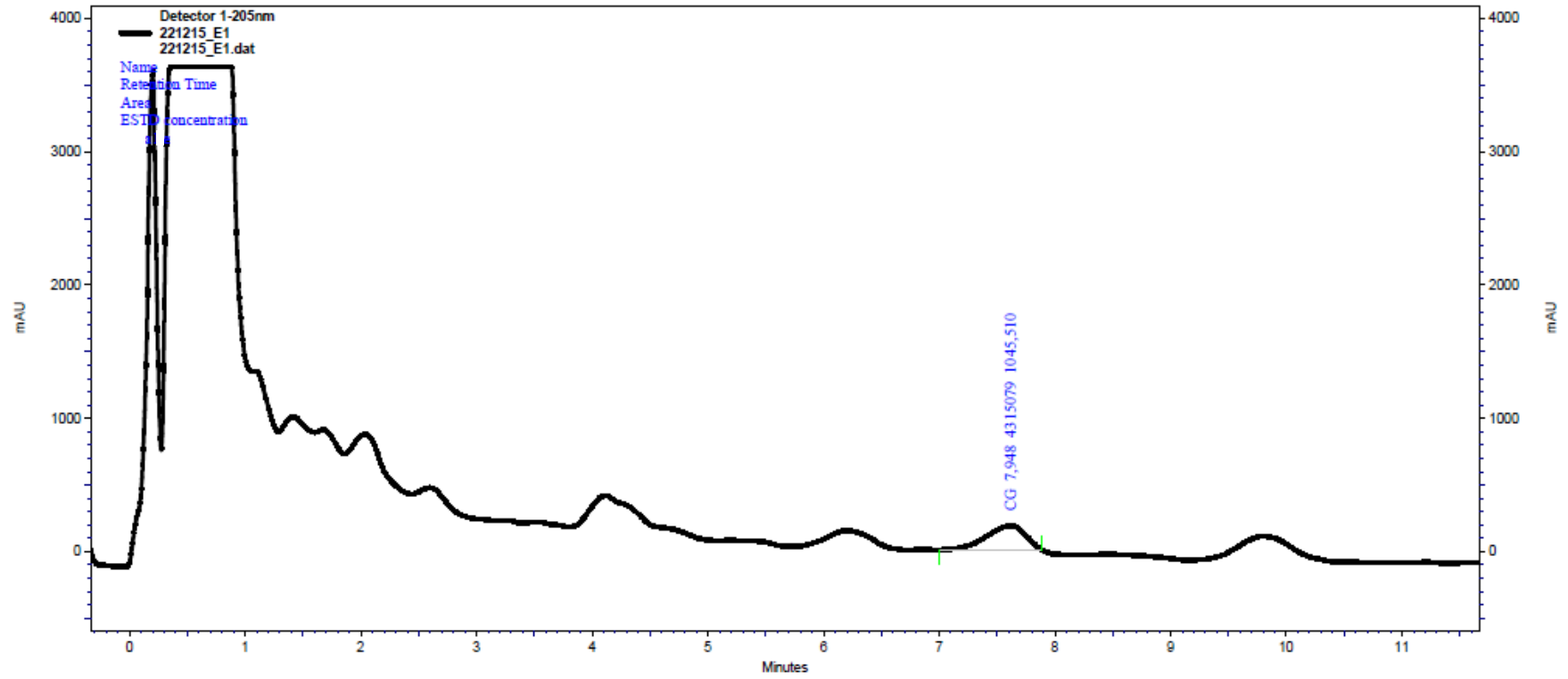
— C:\ChromQuest\Enterprise\Projects\Default\Data\26102015\120915_66_M_4_6_2-Rep2.dat, Detector 1-205nm

Şekil B. 41 D4-MIP - 100g – 40:60(2) su:AcN fraksiyonu.



— C:\ChromQuest\Enterprise\Projects\Default\Data\221215_67_N_4_6_2.dat, Detector 1-205nm

Şekil B. 42 D4-NIP – 100g - 40:60(2) su:AcN fraksiyonu.



— C:\ChromQuest\Enterprise\Projects\Default\Data\221215_E1.dat, Detector 1-205nm

Şekil B. 43 *Astragalus* hidroliz ekstresi.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Akgün I. H.**, 2006, Sikloastragenolden Hareketle Kimyasal Modifikasyonlar Yapılarak Sitotoksik Etkinliği Yüksek Yarı-Sentetik Moleküllerin Hazırlanması, Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 205s (yayımlanmamış).
- Alexander, C., Davidson, L. and Hayes, W.**, 2003, Imprinted polymers: artificial molecular recognition materials with applications in synthesis and catalysis, *Tetrahedron*, 29:2025-2057pp.
- Andersson, L., Sellergren, B. and Mosbach, K.**, 1984, Imprinting of amino acid derivatives in macroporous polymers, *Tetrahedron Letters*, 25:5211-5214pp.
- Andersson, L.I. and Mosbach, K.**, 1989, Molecular imprinting of the coenzyme-substrate analogue N-pyridoxyl-L-phenylalaninanilide, *Macromolecular Rapid Community*, 10:491-495pp.
- Anderson, L.I., Muller, R., Vlatakis, G. and Mosbach, K.**, 1995, Mimics of the binding sites of opioid receptors obtained by molecular imprinting of enkephalin and morphine, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 92:4788– 4792pp.
- Anderson, L. I.**, 2000, Molecular imprinting for drug bioanalysis, A review on the application of imprinted polymers to solid phase extraction and binding assay, *Journal of Chromatography B*, 739, 163-173.
- Arshady, R. and Mosbach, K.**, 1981, Synthesis of substrate-selective polymers by host–guest polymerization, *Makromolecular Chemistry*, 182:687– 692pp.
- Aşır, S., Uzun, L., Türkmen, D., Say, R. and Denizli, A.**, 2005, Ion selective imprinted superporous monolith for cadmium removal from human plasma, *Separation Science and Technology*, 40:3167-3185pp.
- Baydemir, G., Andaç, M., Bereli, N., Say, R. and Denizli, A.**, 2007, Selective removal of bilirubin from human plasma with bilirubin imprinted particles, *Industrial Engineering Chemistry Research*, 46:2843-2852pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bedir, E.**, 1998, Bazı *Astragalus* türlerinin sikloartan triterpenik saponozitleri üzerinde farmakognozik araştırmalar, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, 277s (yayımlanmamış).
- Bedir, E., Calis, I., Aquino, R., Piacente, S. and Pizza, C.**, 1998b, Cycloartane type glycosides from the roots of *Astragalus brachypterus* and *Astragalus microcephalus*, *Journal of Natural Products*, 61:1469-1472pp.
- Bedir, E., Calis, I., Zerbe, O. and Sticher, O.**, 1998a, Cyclocephaloside I: A novel cycloartane type glycoside from *Astragalus microcephalus*, *Journal of Natural Products*, 61:503-505pp.
- Bedir E., Pugh N.P., Calis, I., Pasco, D. A. and Khan, I. A.**, 2000, Immunostimulatory effects of cycloartane-type triterpene glycosides from *Astragalus* species, *Biological Pharmaceutical Bulletin*, 23(7):834-837pp.
- Bedir, E., Tath, I., Çalış, I. and Khan, I.A.**, 2001a, Trojanosides I-K: New cycloartane-type glycosides from the aerial parts of *Astragalus trojanus*, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 49 (11):1482- 1486pp.
- Brunauer, S., Emmet, P.H. and Teller, E.**, 1938, Adsorption of gases in multimolecular layers, *Journal of American Society*, 60(2):309-319pp.
- Caro, E., Marce, R.M., Borrull, F., Cormack, P.A.G. and Sherrington, D.C.**, 2006, Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of compounds from environmental and biological samples, *Trends in Analytical Chemistry*, 25(2):143-154pp.
- Chai, J.D. and Head-Gordon, M.**, 2008, Long-range corrected hybrid density functionals with damped atom-atom dispersion corrections, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 10:6615-20pp.
- Claude, B., Morin, Ph., Lafosse, M., Belmont, A.S. and Haupt, K.**, 2008, Selective solid phase extraction of a triterpene acid from a plant extract by molecularly imprinted polymer, *Talanta*, 75:344-350pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Claude, B., Lamy-Viron, C., Haupt, K. and Morin, Ph.**, 2010, Synthesis of a molecularly imprinted polymer for the solid phase extraction of betulin and betulinic acid from plane bark, *Phytochemical Analysis*, 21:180-185pp.
- Cormack, P.A.G. and Eloraza, Z.**, 2004, Molecularly imprinted polymers:synthesis and characterisation, *Journal Chromatography B*, 804:173-182pp.
- Çeçen, Ö., Aytaç Z. And Mısırdalı H.**, 2016, *Astragalus unalii* (Fabaceae), a new species from Turkey, *Turkish Journal of Botany*, 40:81-86pp.
- Dhal, P.K. and Arnold, F.H.**, 1991, Template-mediated synthesis of metal-complexing polymers for molecular recognition, *Journal of American Chemical Society*, 113(19):7417-7418pp.
- Dickey, F.H.**, 1955, Specific adsorption, *Journal of Physical Chemistry*, 59:695–707pp.
- Drugs Online**, “*Astragalus*”, <http://www.drugs.com/npp/astragalus.html> (Erişim tarihi: 20 Aralık 2009).
- Ferenc, A.Z. and Biziuk M.**, 2006, Solid phase extraction technique - Trends, opportunitites and applications, *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(5):677-690pp.
- Fischer, L., Muller, R., Ekberg, B. and Mosbach, K.**, 1991, Direct enantioseparation of h-adrenergic blockers using a chiral stationary phase prepared by molecular imprinting, *Journal of American Chemical Society*, 113:9358– 9360pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A., Jr.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Ö.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. , 2009, Gaussian 09, Revision C.01, Gaussian, Inc., Wallingford CT.
- Glad, M., Norrlov, O., Sellergren, B., Siegbahn, N. and Mosbach, K., 1985, Use of silane monomers for molecular imprinting and enzyme entrapment in polysiloxane-coated porous silica, *Journal of Chromatography A*, 347:11-23pp.
- Gönen, S., 2006, Karbohidrat/Aminoasit baskılanmış akrilik polimerlerin hücre biyoteknolojisinde kullanım potansiyelinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Anabilim dalı, 119s (yayımlanmamış).
- Haupt, K. Ed., 2012, Topics in Current Chemistry, Molecular Imprinting, Springer, New York, 361p.
- Helfferrich, F., 1962, Ion Exchange, Mc-Graw Hill, New York, 624p.
- Hillberg, A.L. and Tabrizian, M., 2008, Biomolecule imprinting: Developments in mimicking dynamic natural recognition systems, *IRBM*, 29:89-104pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ji, W., Xiuli, M., Zhang, J., Xie, H., Liu, F. and Wang, X.**, 2015, Preparation of the high puritiy gingerols from ginger by dummy molecularly imprinted polymers, *Journal of Chromatography A*, 1387:24-31pp.
- Karaboyacı, M.**, 2010, Modifiye edilmiş lingoselülozikler ile ağır metal adsorpsiyonu, Doktora tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 210s (yayımlanmamış).
- Kempe, M. and Mosbach, K.**, 1994, Direct resolution of naproxen on a non-covalently molecularly imprinted chiral stationary phase, *Journal of Chromatography A*, 664:276– 279pp.
- Kempe, M., Glad, M. and Mosbach, K.**, 1995, An approach towards surface imprinting using the enzyme ribonuclease A, *Journal of Molecular Recognition*, 8:35–39pp.
- Kempe M.**, 1996, Antibody-mimicking polymers as chiral stationary phases in HPLC, *Analytical Chemistry*, 68:1948–1953pp.
- Klamt, A. And Schüüman, G.**, 1993, COSMO: A New Approach to Dielectric Screening in Solvents with Explicit Expressions for the Screening Energy and its Gradient. *Journal of Chemical Society Perkin Transactions 2*, 799-805pp.
- Komiyama, M., Takeuchi, T., Mukawa, T. and Asanuma, H.**, 2004, Molecular Imprinting: From Fundamentals to Applications, Wiley-VCH, Tokyo, 147p.
- Korth, M., Pitonak, M., Rezac, J. And Hobza, P.**, 2010, A Transferable H-bonding Correction For Semiempirical Quantum-Chemical Methods, *Journal of Chemical Theory and Computation*, 6:344–352pp.
- Kriz, D., Ramstroem, O., Svensson, A. and Mosbach, K.**, 1995, A biomimetic sensor based on a molecularly imprinted polymer as a recognition element combined with fiber-optic detection, *Analytical Chemistry*, 67(13):2142-2144pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kyzas, G.Z., Nanaki, S.G., Koltsakidou, A., Papageorgiou, M., Kechagia, M., Bikiaris, D.N. and Lambropoulou, D.A.**, 2015, Effectively designed molecularly imprinted polymers for selective isolation of the antidiabetic drug metformin and its transformation product guanylsurea from aqueous media, *Analytica Chimica Acta*, 966:27-40pp.
- Lopez, C., Claude, B., Morin, Ph., Max, J.P., Pena, R. and Ribet, J.P.**, 2011, Synthesis and study of a molecularly imprinted polymer for the specific extraction of indole alkaloids from *Catharantus roseus* extracts, *Analytica Chimica Acta*, 683:198-205pp.
- Lorenzo, C. and Concheiro, A.**, 2004, Molecularly imprinted polymers for drug delivery, *Journal of Chromatography B*, 804:231-245pp.
- Mansson, M., Norrlof, O. and Mosbach, K.**, 1987, Improved chromatography-prearranged distances between boronate groups by the molecular imprinting approach, *Journal of Chromatography A*, 369(7):374-377pp.
- Mayes, A.G., Andersson, L.I. and Mosbach, K.**, 1994, Sugar binding polymers showing high anomeric and epimeric discrimination obtained by noncovalent molecular imprinting, *Analytical Biochemistry*, 222:483–488pp.
- Mayes, A.G. and Whitcombe, M.J.**, 2005, Synthetic strategies for the generation of molecularly imprinted organic polymers, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57:1742-1778pp.
- Miertus, S., Scrocco, G. And Tomasi, J.**, 1981, Electrostatic interaction of an solute with a continuum. A direct utilization of ab initio molecular potentials for the prevision of solvent effects, *Chemical Physics*, 55:117–129pp.
- Miertus, S. And Tomasi, J.**, 1982, Approximate evaluations of the electrostatic free energy changes in solution processes, *Chemical Physics*, 65:239–245pp.
- Monti, S., Cappelli, C., Bronco, S., Giusti, P. and Ciardelli, G.**, 2006, Towards the design of highly selective recognition sites into molecular imprinting polymers: A computational approach, *Biosensors&Bioelectronics*, 22:153-163pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mosbach, K. and Ramstörn, O.**, 1996, The emerging technique of molecular imprinting and its future impact on biotechnology, *Biotechnology*, 14:163-170pp.
- Motherwell, W.B., Bingham M. J., Pothier, J. and Six Y.**, 2004, A Study of Some Molecularly Imprinted Polymers as Protic Catalysts for the Isomerisation of α -pinene oxide to trans-carveol, *Tetrahedron*, 60:3231-3241pp.
- Nilsson, K.G.I., Sakaguchi, K., Gemeiner, P. and Mosbach, K.**, 1995, Molecular imprinting of acetylated carbohydrate derivatives into methacrylic polymers, *Journal of Chromatography A*, 707:199–203pp.
- Norrlov, O., Glad, M. and Mosbach, K.**, 1984, Acrylic polymer preparations containing recognition sites obtained by imprinting with substrates, *Journal of Chromatography*, 299:29– 41pp.
- Odabasi, M., Say, R. and Denizli, A.**, 2007, Molecular imprinted particles for lysozyme purification, *Materials Science and Engineering*, 27:90-99pp.
- Odian G.**, 2004, Principles of Polimerization, 4th Ed., John Wiley & Sons Inc., New York, 812p.
- Omidian, H. and Park K.**, 2012, Hydrogels , 75-106, Fundametnals and applications of controlled release drug delivery, Siepmann, J., Siepmann, R., Siegel R. And Rathbone, M. (Eds.), Springer, New York.
- Pabst, W. and Gregorova, E.**, 2007, Characterization of Particles and Particle Systems, ICT, Prague, 123p.
- Pauling, L.**, 1940, A theory of the structure and process of formation of antibodies, *Journal of American Chemical Society*, 62:2643– 2657pp.
- Pérez-Moral, N. and Mayes, A.G.**, 2001, Novel MIP formats, *Bioseparation*, 10(6): 287-299pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pérez-Moral, N. and Mayes, A.G.**, 2004, Comparative study of imprinted polymer particles prepared by different polymerization methods, *Analytica Chimica Acta*, 504:15-21pp.
- Piletsky, S.A., Alcock, S. and Turner, A.P.F.**, 2001, Molecular imprinting at the edge of the third millennium, *Trends in Biotechnology*, 19(1):9-12pp.
- Qiujin, Z., Liping, W., Shengfang, Wu, Wasswa, J., Xiaohong, G. and Jian T.**, 2009, Selectivity of molecularly imprinted solid phase extraction for sterol compounds, *Food Chemistry*, 113:608-615pp.
- Qui, H., LV, L., Pan, B., Zhang, Q., Zhang, W. and Zhang, Q.**, 2009, Critical review in adsorption kinetic models, *Journal of Zhejiang University Science A*, 10(5):716-724pp.
- Rathore, A. S. and Velayuhdan, A.**, 2003, Scale up and optimization in Preparative chromatography; Principles and biopharmaceutical applications, Marcel Decker Inc., New York, 346p.
- Ren, P., Zhao, X., Zhang, J., Shi, R., Yuan, Z. and Wang, C.**, 2008, Synthesis of high selectivity polymeric adsorbent and its application on the separation of ginkgo flavonol glycosides and terpene lactones, *Reactive and Functional Polymers*, 68:899-909pp.
- Rezac, J., Fanfrlik, J., Salahub, D. And Hobza, P.**, 2009, Semiempirical Quantum Chemical PM6 Method Augmented by Dispersion and H-Bonding Correction Terms Reliably Describes Various Types of Noncovalent Complexes, *Journal of Chemical Theory and Computation*, 5:1749-1760pp.
- Rosatzin, T., Andersson L.I., Siomon, W. and Mosbach, K.**, 1991, Preparation of Ca²⁺ selective sorbents by molecular imprinting using polymerisable ionophores, *Journal of Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 8:1261-1265pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Saad, E.M., Madbouly, A., Ayoub, N. and El Nashar, M.R.**, 2015, Preparation and application of molecularly imprinted polymer for isolation of chicoric acid from *Chicorium intybus* L medicinal plant, *Analytica Chimica Acta*, 877:80-89pp.
- Sarhan, A. and El-Zahab, M.A.**, 1987, Racemic resolution of mandelic acid on polymers with chiral cavities, 2. Enzyme-analogue stereospecific conversion of configuration, *Macromolecular Rapid Communications*, 8:555-561pp.
- Say, R., Ersöz, A., Türk, H. and Denizli, A.**, 2004, Selective separation and preconcentration of cyanide by a column packed with cyanide imprinted polymeric microbeads, *Separation and Purification Technology*, 40:9-14pp.
- Scherdel, C., Reichenauer and G. and Wiener, M.**, 2010, Relationship between pore volumes and surface areas derived from the evaluation of N₂-sorption data by DR-, BET and t-plot, *Microporous and Mesoporous Materials*, 132:572-575pp.
- Sellergren, B., Ekberg, B. and Mosbach, K.**, 1985, Molecular imprinting of amino acid derivatives in macroporous polymers: Demonstration of substrate- and enantio-selectivity by chromatographic resolution of racemic mixtures of amino acid derivatives, *Journal of Chromatography A*, 347:1-10pp.
- Sellergren, B.**, 1994, Direct drug determination by selective sample enrichment on an imprinted polymer, *Analytica Chemistry*, 66(9):1578-1582pp.
- Shahar, T., Tala, N. and Mandler, D.**, 2016, Molecularly imprinted polymer particles: Formation, characterization and application, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, (baskıda).
- Shannon, M.J.R. and Ensley, B.D.**, 1991, Solid-Phase Extraction for Removal of Organic Contaminants from Soils. Envirogen, Inc., USSR, U.S., 5 pp. Cont.-in-part of U.S. Ser. No. 744,902, abandoned, US 5242598 A 930907, US 92-936795 920828, US 91-744902 910814.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Siemann M., Andersson L., Mosbach K.**, 1996, Selective recognition of the herbicide atrazine by noncovalent molecularly imprinted polymers, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(1):141-145pp.
- Simpson, N.J.K.**, 2000, Solid Phase Extraction, Principles Techniques and Applications, Marcel Dekker Inc., New York, 515p.
- Spartan'08**, 2006, Wavefunction Inc., Irvine, CA, USA.
- Stewart, J.P.**, 2012, MOPAC 2012, Stewart Computational Chemistry, <http://openmopac.net>, Colorado Springs, CO, USA.
- Tomasi, J. And Persico, M.**, 1994, Molecular interactions in solution: an overview of methods based on continuous distributions of the solvent, *Chemical Reviews*, 94:2027–2094pp.
- Treybal, R.E.**, 1980, Mass Transfer Operations, McGraw-Hill, Inc., 3.ed., USA, 784p.
- Tsukagoshi, K., Yu, K. Y., Maeda, M. and Takagi, M.**, 1993, Metal ion selective adsorbent prepared by surface imprinting polymerization, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 66:114-120pp.
- Ulbricht, M. and Malaisamy, R.**, 2005, Insights into the mechanism of molecular imprinting by immersion precipitation phase inversion of polymer blends via detailed morphology analysis of porous membranes, *Journal of Materials Chemistry*, 15:1487-1497pp.
- Valenzuela, H.F., Fuller, T., Edwards, J., Finger, D. and Molgora, B.**, 2009, Cycloastragenol extends T cell proliferation by increasing telomerase activity, *The Journal of Immunology*, 182: 90.30pp.
- Vasapollo, G., Del Sole, R., Mergola, L., Lazzoi, M.R., Scardino, A., Scorrano, S. and Mele, G.**, 2011, Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective, *International Journal of Moleluclar Sciences*, 12:5908-5945pp.
- Vlatakis, G., Andersson, L., Muller, R., Mosbach, K.**, 1993, Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting, *Nature*, 361:645– 647pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Whitcombe, M.J., Rodriguez, M.E., Villar, P., Vulfson, E.N.**, 1995, A new method for the introduction of recognition site functionality into polymers prepared by molecular imprinting: synthesis and characterization of polymeric receptors for cholesterol, *Journal of American Chemical Society*, 117:7105– 7111pp.
- Wu, T.S.**, 2005, Pharmaceutical composition having prophylactic effects on lamivudine-related disease relapse and drug resistance and methods of using the same, <http://www.freepatentsonline.com/6855346.html> (Erişim tarihi: 20 Aralık 2009).
- Wulff, A. S.**, 1972, The use of polymers with enzyme analogous structures for the resolution of racemates, *Angewandte Chemie, International Edition in English*, 11:341pp.
- Xu, X., Zhu, L. and Chen, L.**, 2004, Separation and screening of compounds of biological origin using molecularly imprinted polymers, *Journal of Chromatography B*, 804:61-69pp.
- Yavuz, H., Andaç, M., Uzun, L., Say, R. and Denizli, A.**, 2006, Molecular recognition based iron removal from human plasma with imprinted membranes, *The International Journal of Artificial Organs*, 29:900-911pp.
- Yu, L., Yun, Y., Zhang, W. and Wang, L.**, 2011, Preparation, recognition characteristics and properties for quercetin molecularly imprinted polymers, *Desalination and Water Treatment*, 34:309-314pp.
- Zhang, J., Zhu, X., Luo, F., Sun C., Huang, J., Li, X. and Chen, K.**, 2012, Separation and purification of neohesperidin from the albedo of *Citrus reticulata* cv. *Suavissima* by combination of macroporous resin and high-speed counter-current chromatography, *Journal of Separation Science*, 35:128-136pp.
- Zhong, S. and Yu, H.**, 2007, Antiviral *Astragalus* extract, <http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?IA=WO2007144569&WO=2007144569&DISPLAY=DESC> (Erişim tarihi: 20 Aralık 2009).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Zhu, F., Wang, J., Zhu, L., Tan, L., Feng, G., Liue, S., Dai, Y. and Wang, H.,
2016, Preparation of molecularly imprinted polymers using theanine as
dummy template and its application as SPE sorbent for the determination of
eighteen amino acids in tobacco, *Talanta*, 150:388-398pp.



ÖZGEÇMİŞ**Melis ALTAŞ**

1703 sk. No:62/6 Doğa Apt. Karşıyaka / İZMİR

Cep Tel: +90-0533-325-54-98

meliskuban@gmail.com**Doğum Tarihi ve Yeri:** 01.07.1984**Doğum Yeri:** İzmir**Uyruğu:** TC**Medeni Hali:** Evli**Ehliyet:** B Sınıfı – 29.11.2002**EĞİTİM BİLGİLERİ**

- **2010 - Ege Üniversitesi / İzmir**
Mühendislik Fakültesi - Biyomühendislik Bölümü – Doktora
- **2007 – 2010 Ege Üniversitesi / İzmir**
Mühendislik Fakültesi - Biyomühendislik Bölümü – Yüksek Lisans
- **2005 – 2009 Anadolu Üniversitesi**
İşletme Fakültesi – İşletme Bölümü
- **2004 – 2006 Ege Üniversitesi / İzmir**
İngilizce Öğretmenliği Sertifika Programı
- **2002 – 2007 Ege Üniversitesi / İzmir**
Mühendislik Fakültesi - Kimya Mühendisliği Bölümü - Lisans
- **1995-2002 Özel İzmir Amerikan Lisesi**

TEZLER

2007: Balçova Jeotermal Suyundan Diaion CRB02 Reçinesi Kullanarak İyon Değiştirme-Membran Hibrid Proses ile Bor Giderimi (Lisans Bitirme Tezi)

2008-2010 : Sikloartan Grubu Saponinlerin Mikrobiyal Biyotransformasyonu
(Yüksek Lisans Tezi)

2010- : Biyoaktif Moleküllerin Moleküler Baskılama Tekniği Kullanılarak
Hazırlanan Polimerik Matrisler ile Ayırma Safılaştırılması (Doktora Tezi)

İŞ DENEYİMLERİ

- Dalan Kimya – Yaz Stajı - 06.2004 - 07.2004
- Efes Pilsen – Yaz Stajı - 06.2005 - 07.2005
- Çamkiran İlköğretim Okulu – İngilizce Öğretmenliği – Zorunlu Staj – 03.2006 - 06.2006
- İngilizce-Türkçe Çeviri – 10.2006 - 12.2006 – Jeotermal Sulardan Bor Giderimi
- İngilizce-Türkçe Çeviri – 2009 – Nalco Su El Kitabı’ndan bölümler
- Tübitak – 1002 Proje bursiyeri – Sikloartan Grubu Saponinlerin Mikrobiyal Biyotransformasyonu – 2009-2010
- Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Öğrenci Laboratuvarı Asistanlığı – Membran Ayırma, Kromatografik Yöntemlerle Ayırma Safılaştırma, Akışkan Yataklı Kurutucu, Santrifüj Pompa, Püskürtmeli Kurutucu – 2008-2011
- Tübitak – 1001 (COST) Proje bursiyeri – Sikloartan Grubu Saponinlerin Mikrobiyal Biyotransformasyonu – 2010 – 2011
- Ege Üniversitesi BAP Projesi - Biyoaktif Moleküllerin Moleküler Baskılama Tekniği Kullanılarak Hazırlanan Polimerik Matrisler ile Ayırma Safılaştırılması – 2012-2013
- Ege Üniversitesi BAP Projesi - Moleküler Baskılama Yöntemi ile Hazırlanan Polimerlerin Ölçek Büyütme Problemlerine Çözüm Önerileri Sunularak Ekstre İzolasyonunda Değerlendirilmesi – 2014-2016
- İZSU – Kimya Mühendisi – ICP-MS ile Ağır Metal Analizi – 2011-...

PROJELER - KONGRE VE SEMPOZYUMLARDA SUNULAN VE BASILAN BİLDİRİLER - YAYINLAR

- Diploma Projesi Sergisi – Balçova Jeotermal Sularından Reçine-Membran Hibrit Sistemlerle Bor Giderimi – Poster Sunumu - 2006.

- Vth International Bioengineering Congress – Biotransformation of Cycloartane Type Sapogenol, Cycloastragenol, by *Cunninghamella blakesleeana* NRRL 1369 – Sözlü Sunum – Bildiri - 2010.
- 20. Ulusal Biyoloji Kongresi – Saponinlerin Mikrobiyal Transformasyonundan Beklentiler – Bildiri - 2010.
- International PSE Symposium on Terpenes - Biotransformation of Cycloartane Type Sapogenol, Cycloastragenol, by *Cunninghamella blakesleeana* NRRL 1369 – Bildiri - 2010.
- Cost Action – Biotransformation studies on cycloartane-type triterpenoids from *Astragalus* genus - Sözlü Sunum – 2013.
- Workshop on Plant Products Chemistry & International Symposium on Medicinal-Aromatic Plants - Biotransformation studies on cycloartane-type triterpenoids from *Astragalus* genus – Sözlü Sunum – 2013.
- Kuban, M., Ongen, G., Bedir, E., Biotransformation of Cycloastragenol by *Cunninghamella blakesleeana* NRRL 1369 Resulting a Novel Framework, Organic Letters, 12 (19), 4252-4255 (2010).
- Kuban, M., Kula, C., Ongen, G., Bedir, E., Biotransformation of Cycloartane-Type Sapogenols, Cycloastragenol and Cyclocanthogenol, by *Cunninghamella blakesleeana* NRRL 1369, Planta Medica, 77(12) PB41 (2011).
- Kuban, M., Ongen, G., Khan, I.A., Bedir, E., Microbial Transformation of Cycloastragenol, Phytochemistry, 88, 99-104 (2013).
- Bedir, E., Kula, C., Altas, M., Tag, O., Ongen, G., Microbial transformation of *Astragalus* sapogenins using *Cunninghamella blakesleeana* NRRL 1369 and *Glomerella fusarioides* ATCC 9552, Journal of Molecular Catalysis B, 115, 29-34 (2015).

SAHİP OLDUĞU BELGELER VE ALDIĞI EĞİTİMLER

- TS EN ISO 22000 Tehlike Analizi ve Kritik Noktaları – Halil Kırmacı
- ISO 9001:2000 Kalite Yönetim Sistemi – Bamer Bilgi Araştırma Merkezi
- Nanobiyoteknolojik Yaklaşımlar Sempozyumu – Prof. Dr. Avni Öktem, Prof. Dr. Nesrin Hasırcı, Prof. Dr. Aydın Doğan, Prof. Dr. İsmet Deliloğlu Gürhan
- IV. Ulusal Biyomühendislik Kongresi – görevli, dinleyici

- ISO 9001:2008 Kalite Yönetim Sistemi – ISO 14001:2004 Çevre Yönetim Sistemi ISO 18001:2007 İş Sağlığı ve İş Güvenliği Yönetim Sistemi – Asko Kariyer
- V. Uluslararası Biyomühendislik Kongresi
- İç Kalite Tetkikçi Eğitimi
- ISO 17025 Eğitimi
- Kurum Kültürü Eğitimi
- Stres Yönetimi Eğitimi
- Takım Çalışması Eğitimi
- ICP-MS Kullanıcı Eğitimi

DİL

- İngilizce – Çok iyi
- Fransızca - Az

BİLGİSAYAR

- Windows
- Tüm MS Office Programları
- Orta düzeyde programlama (Visual Basic), AutoCad, IntelliCad, ChemCad, ChemDraw, ACD Labs, Design Expert, Discovery Studio.