



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



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ÜZÜM SUYU ve/veya ŞARAP ENDÜSTRİSİ ATIKLARINDAN
FENOLİK BİLEŞİKLERİN MOLEKÜLER BASKILI
POLİMERLERLE DERİŞİKLENDİRİLMESİ**

Seda ÖZEN

Kimya Anabilim Dalı

Analitik Kimya Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Esma TÜTEM**

Mayıs, 2017

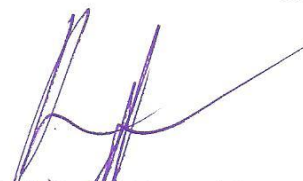
İSTANBUL

Bu çalışma 22.06.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı, Analitik Kimya Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi



Prof. Dr. Esmâ TÜTEM(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



Prof. Dr. M. Reşat APAK
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



Prof. Dr. Süleyman AKMAN
İstanbul Teknik Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi



Prof. Dr. Kevser SÖZGEN BAŞKAN
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



Doç. Dr. Sema DEMİRCİ ÇEKİÇ
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



20.04.2016 tarihli resmi gazetede yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi'nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 50981 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim süresince göstermiş olduğu her türlü yardım ve anlayış için danışmanım ve değerli büyüğüm Prof. Dr. Esmâ TÜTEM'e en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili hocam Prof. Dr. Kevser SÖZGEN BAŞKAN'a, ve başta Araş.Gör.Esin AKYÜZ ve Dr.Şeyda KARAMAN ERSOY olmak üzere tüm çalışma arkadaşlarıma göstermiş oldukları sevgi, saygı ve sonsuz desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca maddi manevi desteklerini ve sevgilerini her zaman hissettiren aileme şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmam için gerekli olan şarap endüstrisi atıklarını temin etmemde yardımcı olan Sayın Yasemin ERBİLLİ'ye ve Doluca Bağcılık ve Şarapçılık A.Ş.'ye eğitime ve bilime verdikleri destekten dolayı teşekkür ederim.

Tezimle aynı adı taşıyan 50981 numaralı projeme maddi destek sağlayan İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

Mayıs 2017

Seda ÖZEN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ.....	x
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xi
ÖZET	xiii
SUMMARY	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	4
2.1. MOLEKÜLER BASKILI POLİMERLER	4
2.1.1. Moleküler Baskılı Polimerlerde Baskılama Yöntemleri	5
2.1.1.1. Kovalent Baskılama Yöntemi	5
2.1.1.2. Non-kovalent (kovalent olmayan) baskılama yöntemi.....	6
2.1.1.3. Semi kovalent (yarı kovalent) baskılama yöntemi	7
2.1.2. Moleküler Baskılı polimerleri Oluşturan Başlıca Bileşenler.....	7
2.1.2.1. Kalıp Molekül	7
2.1.2.2. Fonksiyonel Monomer	7
2.1.2.3. Çapraz Bağlayıcı	8
2.1.2.4. Gözenek Oluşturucu Çözücü.....	9
2.1.2.5. Başlatıcı	10
2.1.3. Moleküler Baskılı Polimer Sentezleme Yöntemleri	10
2.1.3.1. Yığın (Bulk) Polimerizasyonu	10
2.1.4. Moleküler Baskılı Polimerlerin Uygulama Alanları	11
2.1.4.1. Ayırma Teknikleri	11
2.1.4.2. Sensör Uygulamaları	15
2.1.4.3. Kataliz Uygulamaları	15
2.1.4.4. İlaç Dağıtımı Uygulamaları	16
2.1.5. MIP Etkinliğinin Belirlenmesi	16
2.1.5.1. Kesikli Temas (Batch) Testi	17
2.1.5.2. Kopma (Breakthrough) Eğrisi Tekniği	17

2.1.6. MIP'lerin Adsorpsiyon Büyüklüklerinin Belirlenmesi	18
2.1.6.1. <i>Freundlich İzotermi</i>	18
2.1.6.2. <i>Langmuir İzotermi</i>	19
2.2. FENOLİK BİLEŞİKLER.....	20
2.2.1. Flavonoidler.....	21
2.2.2. Fenolik Asitler	25
2.2.2.1. <i>Hidroksibenzoik asitler</i>	25
2.2.2.2. <i>Hidroksisinnamik asitler</i>	26
2.2.3. Fenolik Polimerler (Tanenler)	26
2.3. KATEŞİN VE TÜREVLERİ BASKILI POLİMERLERLE YAPILMIŞ ÇALIŞMALAR	27
2.4. ÜZÜM	30
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	35
3.1. CİHAZ VE MALZEME LİSTESİ	35
3.2. KİMYASAL MADDELER	36
3.3. ŞARAP ENDÜSTRİSİ ATIKLARINDAN FENOLİK BİLEŞİK EKSTRAKTLARININ HAZIRLANMASI.....	36
3.4. UYGULANAN YÖNTEMLER.....	37
3.4.1. Fenolik Bileşiklerin Analizi için HPLC Yönteminin Geliştirilmesi	37
3.4.2. Moleküler Baskılı Polimer Sentezleri	37
3.4.2.1. <i>Uygun Monomerin Belirlenmesi</i>	38
3.4.2.2. <i>Uygun Gözenek Oluşturucu Çözücünün Belirlenmesi</i>	39
3.4.2.3. <i>Uygun Kalıp Molekül:Monomer:Çapraz Bağlayıcı Oranının Belirlenmesi</i>	39
3.4.3. Moleküler Baskılı Polimerlerde Kalıp Molekülün Geri Bağla(n)ma Büyüklüklerinin İncelenmesi.....	39
3.4.3.1. <i>Geri Bağla(n)maya Zaman Etkisi</i>	39
3.4.3.2. <i>Geri Bağla(n)maya Çözücü Etkisi</i>	40
3.4.3.3. <i>Geri Bağla(n)maya Kalıp molekül Derişimi Etkisi</i>	40
3.4.4. Moleküler Baskılı Polimerlerin Adsorpsiyon Özelliklerinin Belirlenmesi	40
3.4.4.1. <i>Batch (Kesikli Temas) Adsorpsiyon Testi</i>	40
3.4.4.2. <i>Kolon Denemeleri</i>	41
3.4.4.3. <i>Seçimlilik Denemeleri</i>	41
3.4.5. Üzüm Çekirdeği Ekstraktları için Moleküler Baskılı Katı-Faz Ekstraksiyonu Uygulamaları	41
3.4.5.1. <i>Beyaz Üzüm Çekirdeği Ekstraktı için KAT-MISPE Uygulaması</i>	41

3.4.5.2. Kırmızı Üzüm Çekirdeği Ekstraktı için KAT-MISPE Uygulaması	42
4. BULGULAR.....	44
4.1. UYGUN EKSTRAKSİYON ÇÖZÜCÜSÜNÜN BELİRLENMESİ.....	44
4.2. ÇALIŞILAN FENOLİK BİLEŞİKLERİN HPLC KALİBRASYONLARININ SONUÇLARI.....	46
4.3. KAT-MIP SENTEZİ İÇİN OPTİMİZASYON ÇALIŞMALARI	47
4.3.1. Uygun Monomerin Belirlenmesi.....	47
4.3.2. Uygun Gözenek Oluşturucu Çözücünün Belirlenmesi.....	47
4.3.3. Uygun Kalıp molekül:Monomer:Çapraz bağlayıcı Mol Oranının Belirlenmesi.....	48
4.4. MOLEKÜLER BASKILI POLİMERLERDE KALIP MOLEKÜLÜN GERİ BAĞLA(N)MA BÜYÜKLÜKLERİNİN İNCELENMESİ	49
4.4.1. Geri Bağla(n)maya Zaman Etkisi.....	49
4.4.2. Geri Bağla(n)maya Çözücü Etkisi.....	49
4.4.3. Geri Bağla(n)maya Kalıp Molekül Derişimi Etkisi.....	50
4.5. MOLEKÜLER BASKILI POLİMERLERİN ADSORPSİYON ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ	52
4.5.1. Batch (Kesikli Temas) Adsorpsiyon Testi	52
4.5.2. Kolon Denemeleri	54
4.5.3. Seçimlilik Denemeleri	55
4.6. ÜZÜM ÇEKİRDEĞİ EKSTRAKTLARI İÇİN MOLEKÜLER BASKILI KATI FAZ EKSTRAKSİYONU UYGULAMALARI.....	56
4.6.1. Beyaz Üzüm Çekirdeği Ekstraktı için KAT-MISPE Uygulaması	56
4.6.2. Kırmızı Üzüm Çekirdeği Ekstraktı için KAT-MISPE Uygulaması.....	59
4.7. ÜZÜM KABUĞU EKSTRAKTLARININ FENOLİK BİLEŞENLERİNİN BELİRLENMESİ.....	62
4.7.1. Beyaz ve Kırmızı Üzüm Kabuk Ekstrakt İçeriğinin Belirlenmesi	62
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	65
KAYNAKLAR.....	67
ÖZGEÇMİŞ	72

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Kovalent baskılama yönteminin genel şematik gösterimi (Yan ve Row, 200.....5	5
Şekil 2.2: Non-Kovalent baskılama yönteminin genel şematik gösterimi (Yan ve Row, 2006).....6	6
Şekil 2.3: Moleküler baskılamada kullanılan monomerlere örnekler. 8	8
Şekil 2.4: Moleküler baskılamada en çok kullanılan çapraz bağlayıcılara örnekler. 9	9
Şekil 2.5: Yığın polimerizasyonu oluşum şeması. 11	11
Şekil 2.6: Sorban olarak MIP'in kullanıldığı katı faz ekstraksiyon şeması (Eiroa ve diğ., 2016).....13	13
Şekil 2.7: Dinamik tutma kapasitesinin breakthrough (kopma) tekniğine göre belirlenmesi. 18	18
Şekil 2.8: Flavonoidlerin genel yapısı (Heim ve diğ., 2002). 21	21
Şekil 2.9: Antosiyanidinlerin kimyasal yapıları.....22	22
Şekil 2.10: Flavonların kimyasal yapıları. 22	22
Şekil 2.11: Flavanonların kimyasal yapıları. 23	23
Şekil 2.12: Flavonollerin kimyasal yapıları. 23	23
Şekil 2.13: İzoflavonların kimyasal yapıları. 23	23
Şekil 2.14: Flavanollerin kimyasal yapıları. 24	24
Şekil 2.15: Kalkonların (dihidrokalikonların) kimyasal yapıları. 25	25
Şekil 2.16: Hidroksibenzoik asitlerin kimyasal yapıları. 25	25
Şekil 2.17: Hidroksisinnamik asitlerin kimyasal yapıları. 26	26
Şekil 2.18: Fenolik polimerlerin (tanen) kimyasal yapısı. 27	27
Şekil 2.19: Üzüm çekirdek, kabuk, meyve ve sap kısmında bulunan fenolik bileşiklere örnekler.....32	32
Şekil 2.20: Beyaz ve kırmızı üzüm üretim şeması (Pretorius, 2000).....33	33
Şekil 3.1: MIP sentezi genel şeması.....38	38

Şekil 4.1: Beyaz üzüm çekirdeği ekstraktı spektrumu (1:40 seyreltilmiş).....	44
Şekil 4.2: Kırmızı üzüm çekirdeği ekstraktı spektrumu (1:40 seyreltilmiş).	44
Şekil 4.3: Beyaz üzüm kabuğu ekstraktı spektrumu (1:20 seyreltilmiş).....	45
Şekil 4.4: Kırmızı üzüm kabuğu ekstraktı spektrumu (1:40 seyreltilmiş).	45
Şekil 4.5: Fenolik bileşik standartlarının HPLC kromatogramı.	47
Şekil 4.6: 1:4:20 KAT-MIP'e ait adsorpsiyon-zaman grafiği.....	49
Şekil 4.7: KAT-MIP ve NIP'e ait KAT derişimi-adsorplanan KAT miktarı grafiği.	51
Şekil 4.8: KAT-MIP ve NIP için Freundlich adsorpsiyon izotermi.	52
Şekil 4.9: KAT-MIP ve NIP için Langmuir izotermi.	53
Şekil 4.10: 1:4:20 KAT-MIP için kopma (breakthrough) eğrisi.....	55
Şekil 4.11: KAT-MIP ve NIP'de fenolik bileşiklerin adsorpsiyonunun karşılaştırılması.....	55
Şekil 4.12: Beyaz üzüm çekirdeği ekstraktının KAT-MISPE kartuşa yükleme öncesi (a) ve yükleme sonrası (b) kromatogramları (Belirleme dalga boyu: 280 nm).....	57
Şekil 4.13: Beyaz üzüm çekirdeği ekstraktının KAT-MISPE yıkama kromatogramları.....	58
Şekil 4.14: Beyaz üzüm çekirdeği ekstraktının elüsyon (a: Elüsyon 1, b: Elüsyon 2) kromatogramları	58
Şekil 4.15: Kırmızı üzüm çekirdek ekstraktının KAT-MISPE kartuşa yükleme öncesi (a) ve yükleme	60
Şekil 4.16: Kırmızı üzüm çekirdeği ekstraktının KAT-MISPE yıkama kromatogramlar	61
Şekil 4.17: Kırmızı üzüm çekirdeği ekstraktının elüsyon (a: Elüsyon 1, b: Elüsyon 2).....	61
Şekil 4.18: Beyaz üzüm kabuğu ekstrakt kromatogramı (Belirleme dalga boyu: 280 n.....	63
Şekil 4.19: Kırmızı üzüm kabuğu ekstrakt kromatogramı.	63

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: KAT ve türevleri ile yapılan çalışmalar.	27
Tablo 4.1: Çeşitli fenolik bileşiklerin HPLC verileri	46
Tablo 4.2: Farklı gözenek oluşturuç çözücüler kullanılarak sentezlenen 1:4:20 K:M:ÇB mol.....	48
Tablo 4.3: Farklı K:M:ÇB molar bileşim oranlarındaki KAT-MIP ve NIP'lerin	48
Tablo 4.4: Farklı çözücü ortamlarında KAT adsorpsiyonunun karşılaştırılması.	50
Tablo 4.5: Farklı derişimlerde KAT çözeltilerinin MIP ve NIP'lerde adsorpsiyonu	51
Tablo 4.6: KAT-MIP ve NIP için Freundlich adsorpsiyon izotermi değerleri.....	53
Tablo 4.7: KAT-MIP ve NIP için Langmuir adsorpsiyon izoterm verileri.	54
Tablo 4.8: KAT-MIP ve NIP'de farklı fenolik bileşiklerin baskılama ve seçimlilik faktörlerinin	56
Tablo 4.9: Beyaz üzüm çekirdeği ekstraktı için KAT-MISPE sonuçları.	59
Tablo 4.10: Kırmızı üzüm çekirdeği ekstraktı için KAT-MISPE sonuçları.....	62

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
$1/n$	: Adsorpsiyon şiddetini gösteren Freundlich sabiti
C_e	: Dengede adsorplanmadan kalan madde derişimi (μM)
C_i	: Kolondan ayrılan çözeltinin derişimi
C_o	: Polimer tarafından adsorplanacak maddenin başlangıç derişimi (μM)
K_f	: Adsorpsiyon kapasitesi ile ilgili freundlich sabiti ($\mu\text{g g}^{-1}$)
m	: Polimer miktarı (g)
Q	: Birim polimer başına adsorplanan madde miktarı ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Q_{MIP}	: Birim MIP başına adsorplanan madde miktarı ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Q_{NIP}	: Birim NIP başına adsorplanan madde miktarı ($\mu\text{g g}^{-1}$)
R	: Korelasyon katsayısı (uyum katsayısı)
R_L	: Dağılma veya boyutsuz ayırma faktörü
S	: Seçimlilik faktörü
V_e	: Kolondan ayrılan çözelti hacmi (mL)

Kısaltmalar	Açıklama
ACN	: Asetonitril
ADV N	: 2,2'-azobis-(2,4-dimetilvaleronitril)
AIBN	: 2,2'-azobisisobutironitril
BF	: Baskılama faktörü
CEC	: Capillary electrochromatography, Kapiler elektrokromatografi
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DVB	: Divinilbenzen
ECG	: Epikateşin gallat
EDMA	: Etilen glikol dimetakrilat
EGC	: Epigallokateşin
EGCG	: Epigallokateşin gallat
EKAT	: Epikateşin
GA	: Gallik asit
GC	: Gallokateşin

GF-PET	: Glass fiber/polietilentereftalat
HAc	: Asetik asit
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography, Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
ISO	: İzooktan
KAT	: Kateşin
KLA	: Klorojenik asit
KUE	: Kuersetin
MAA	: Metakrilik asit
MeOH	: Metanol
MIP	: Molecularly Imprinted Polymer, Moleküler baskılı polimer
MISPE	: Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction, Moleküler baskılı katı faz ekstraksiyonu
NIP	: Non-Imprinted Polymer, Baskısız polimer
SPE	: Solid phase extraction, Katı faz ekstraksiyonu
TFM	: Triflorometakrilik asit
THF	: Tetra hidrofuran
2-VP	: 2- Vinilpiridin
4-VP	: 4- Vinilpiridin

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÜZÜM SUYU ve/veya ŞARAP ENDÜSTRİSİ ATIKLARINDAN FENOLİK BİLEŞİKLERİN MOLEKÜLER BASKILI POLİMERLERLE DERİŞİKLENDİRİLMESİ

Seda ÖZEN

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Esmâ TÜTEM

Moleküler baskılı polimerler (MIPs), kalıp moleküle özgü yüksek seçicilik kabiliyetine sahip sentetik materyallerdir. Hedef moleküle yüksek ilgi ve seçicilikleri, tanıma kabiliyetlerini uzun süre saklayabilmeleri, yüksek fiziksel ve kimyasal kararlılıkları ve kolay hazırlanabilme gibi üstünlükleri nedeniyle pek çok araştırmaya konu olmaktadır.

Kateşinler, meyve, sebze ve içeceklerde bulunan fenolik bileşiklerdir. Üzüm, elma, kiraz, yeşil çay ve şarap önemli kateşin kaynaklarıdır. Kateşinlerin dejeneratif hastalıklara karşı koruma sağladıkları, kanser tedavinde tümör önleyici ve bağışıklık güçlendirici olarak hareket ettikleri, diyetle kateşin ve epikateşin alımının kalp hastalıklarına bağlı ölümleri azalttığı hakkında çok sayıda çalışma literatürde yer almaktadır.

Bu çalışmada, kateşin baskılı polimer (KAT-MIP) sentezlenmiştir. Hedef molekül olarak kateşin, gözenek oluşturuçu çözücüler olarak aseton, tetra hidrofuran (THF) ve asetonitril (ACN)-dimetil sülfoksit (DMSO) (98:2, h/h) çözücü karışımı, fonksiyonel monomerler olarak 4-vinil piridin (4-VP), metakrilik asit (MAA), çapraz bağlayıcı olarak etilen glikol dimetakrilat (EDMA) ve başlatıcı olarak 2,2'-azobisisobutironitril (AIBN) kullanılmasıyla farklı (kalıp:monomer:çapraz bağlayıcı) mol oranlarında (1:4:20 ve 1:5:25) sentez gerçekleştirilmiştir. Bu polimerlerin tanıma ve seçicilik özellikleri, asetonitril ve farklı oranlardaki ACN-DMSO çözücü karışımlarında hazırlanan kateşin çözeltileri kullanılarak denge bağla(n)ma denemeleriyle 280 nm'deki absorbanlarından yararlanılarak belirlendi. 1:4:20 (kateşin:4-VP:EDMA) mol oranına sahip ACN-DMSO (%2, h/h) çözücü karışımında

hazırlanan baskılı polimerin en yüksek adsorpsiyon kapasitesine ve baskılama faktörüne sahip olduğu saptandı.

Hazırlanan KAT-MIP'ın moleküler baskılı katı faz ekstraksiyonu (MISPE) adsorbanı olarak kullanılmasıyla şarap endüstrisi atıklarından (kırmızı ve beyaz üzüm çekirdeklerinden) kateşinin ve epikateşinin sırasıyla % 69 ve % 52 verimle geri kazanımı gerçekleştirildi. Böylece bir sanayi atığının değerli ürünlere yüksek bir verimle dönüştürülmesi başarılmış oldu.

Mayıs 2017, 88 sayfa.

Anahtar kelimeler: Moleküler baskılı polimer (MIP), moleküler baskılı katı faz ekstraksiyonu (MISPE), kateşin baskılı polimer.



SUMMARY

M.Sc. THESIS

CONCENTRATION of PHENOLIC COMPOUNDS with MOLECULARLY IMPRINTED POLYMERS from WASTE of GRAPE JUICE and/or WINE INDUSTRY

Seda ÖZEN

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Chemistry

Supervisor : Prof. Dr. Esma TÜTEM

Molecularly imprinted polymers (MIPs) are synthetic materials with high selectivity specific for template molecules. MIPs are subject to many researches because of advantages such as their high affinity and selectivity to target molecules, ability to store their recognition capability for a long time, high physical and chemical stability and easy preparation.

Catechins are phenolic compounds found in fruits, vegetables and beverages. Grape, apple, cherry, green tea and wine are important catechin sources. Numerous studies have been published in the literature on catechins' protection against degenerative diseases, acting as a tumor preventive and immune enhancer in cancer treatment, and catechin and epicatechin intake on diet reducing heart disease-related deaths.

In this work, catechin-imprinted polymer (KAT-MIP) was synthesized. Synthesis was carried out using catechin as template molecule; acetone, tetra hydrofuran (THF) and acetonitrile (ACN)-dimethyl sulfoxide (DMSO) (98:2, h/h) solvent mixture as porojen solvents; 4-vinyl pyridine (4-VP), metacrylic acid (MAA) as functional monomers; ethylene glycol dimethacrylate (EDMA) as cross-linker and 2,2'-azobisisobutyronitril (AIBN) as initiator at different template:monomer:cross-linker molar ratios (1:4:20 and 1:5:25). The recognition and selectivity properties of these polymers were determined from the absorbance values at 280 nm obtained with equilibrium assays using catechin solutions prepared in ACN and ACN-DMSO solvent mixtures at different ratios. It was established that the imprinted polymer prepared in

ACN-DMSO (%2, h/h) solvent mixture with a molar ratio of 1:4:20 (catechin:4-VP:EDMA) had the highest adsorption capacity and imprinting factor.

Catechin and epicatechin were obtained from wine industry wastes (red and white grape seeds) with recovery values of 69 % and 52 %, respectively using the prepared KAT-MIP as a molecularly printed solid-phase extraction (MISPE) adsorbent. Thus, it was achieved that an industrial waste was converted into valuable products with high efficiency.

May 2017, 88 pages.

Keywords: Molecular imprinted polymer (MIP), molecular imprinted solid phase extraction (MISPE), catechin imprinted polymer.



1. GİRİŞ

Moleküler baskılı polimerler (Molecularly imprinted polymer, MIP), kalıp moleküle özgü yüksek seçicilik kabiliyetine sahip sentetik materyallerdir. Moleküler baskılı polimerler hedef moleküle yüksek ilgi ve seçicilikte olma, tanıma kabiliyetlerini uzun süre saklayabilme, yüksek fiziksel ve kimyasal kararlılıkta olma ve bunun yanı sıra kolay hazırlanabilme gibi üstünlüklere sahip olduklarından araştırmacılar tarafından ilgi görmektedirler. Başlıca; sensörler için affinite materyali, yapay antikör üretiminde, katı faz ekstraksiyonunda adsorban ve kromatografide sabit faz olarak kimya, biyoloji ve tıbbın bir çok alanında moleküler baskılı polimerlerden yararlanılmaktadır (Haupt, 2003; Yan ve Row, 2006; He ve diğ., 2007; Vasapollo ve Sole, 2011).

Fenolik bileşikler, bitkilerin ikincil metabolitleridir ve genel olarak hücreleri UV ışınlarına ve hastalığa neden olan virüs, bakteri gibi patojenlere karşı korurlar (Manach ve diğ., 2004). Bu polifenoller bitkilerin kök, sap, kabuk, çekirdek ve posasında farklı tür ve miktarda bulunurlar. Fenolik bileşikler, tıbbi bitkilerden, sebze ve meyvelerden, baharat ve tahıllardan elde edilen insan sağlığı için faydalı doğal antioksidanlardır. Bu bileşikler başlıca serbest radikallerden reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerini engellemekte önemli rol oynarlar (Stratil ve diğ., 2007). Serbest radikallerin oluşumunu engelleyerek kanser, kalp-damar ve alzheimer gibi hastalıklara yakalanma riskini azaltırlar (Apak ve diğ., 2007). Bitki, meyve, sebze ve endüstri atıklarındaki doğal antioksidanların seçimli olarak ayrılması ve geri kazanılmasında moleküler baskılı polimerler katı faz ekstraksiyonunda adsorban olarak kullanılmaktadır.

Kateşinler, meyve sebze ve içeceklerde yüksek derişimlerde bulunan fenolik bileşiklerdir. Fenolik bileşiklerin flavanol grubunda olup antioksidan özelliği yüksektir. Yapılan çalışmalara göre kateşinler dejeneratif hastalıklara karşı koruma sağlarlar, kanser tedavinde tümör önleyici ve bağışıklık güçlendirici olarak hareket ederler. Diyetle kateşin ve epikateşin alımının kalp hastalıklarına bağlı ölümleri azalttığı görülmüştür (Gadkari ve Balaraman, 2014, Garrido ve Borges, 2013). Üzüm, elma, kiraz, yeşil çay, şarap önemli kateşin kaynaklarıdır. Şaraptaki polifenol içeriğini başlıca kateşin, epikateşin ve epikateşin galat oluşturmaktadır (Montealegre,

2006). Üzüm çekirdeği, kateşin, epikateşin ve türevlerinin miktarı bakımından oldukça zengindir (Rockenbach ve diğ., 2011).

Günümüzde gıda maddeleri korumak amaçlı kullanılan sentetik antioksidanların (BHT, BHA gibi) zararlı etkileri açığa çıktığından antioksidanların doğal kaynaklardan elde edilmesine yönelik çalışmalar önem kazanmıştır. Bu doğal kaynaklar arasında da bitki ve bitki endüstrisi atıkları önemli yer tutmaktadır (Schieber ve diğ., 2001, Cheung ve diğ., 2003). Şarap ve meyve suyu endüstrisinden yıllık ortalama 2.5 milyon ton atık ortaya çıkmaktadır (Nowshetri ve diğ., 2015). Oluşan bu atıkların değerlendirilmesi, sürdürülebilir tarımsal uygulamalara katkıda bulunulmasına yardımcı olması nedeniyle oldukça önemlidir. Geleneksel olarak etanol eldesinde veya gübre ve biyokütle olarak kullanılan atıkların pekçok biyoaktif bileşik için diğer tarımsal gıda atıklarından daha zengin içerikleri nedeniyle düşük maliyetli kaynaklar olabileceğini gösteren çalışmalar 2000'li yıllarda artmıştır. Özellikle ilaç, kozmetik, besin ve tarım gibi olası endüstriyel uygulamaları açısından bu atıkların fenolik bileşik içerikleri çok önemlidir. Bu nedenle güçlü antioksidan, antienflamatuvar, antibakteriyel özelliklere sahip fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için ucuz ve doğal kaynak olarak kullanılabilme potansiyelleri yüksektir (Aceto ve diğ., 2014, Palacios ve diğ., 2014; Martins ve diğ., 2016).

Bu çalışmadaki amacımız şarap endüstrisi atıklarından (üzüm kabuk ve çekirdeği) doğal antioksidanlardan kateşinin, moleküler baskılı polimerler kullanılarak ayrılması ve derişiklendirilmesidir. Bunu gerçekleştirmek için çeşitli monomer, gözenek oluşturuvcu çözücü ve kateşin:monomer:çapraz bağlayıcı mol oranlarında KAT-MIP'ler sentezlenerek en iyi adsorplama özelliğine sahip polimer belirlendi. Kateşin baskılı polimer için adsorpsiyon özellikleri statik adsorpsiyon testlerinden yararlanılarak saptandı. Freundlich ve Langmuir adsorpsiyon izotermi çizilerek polimerlerin bu izotermilere uyumu karşılaştırıldı. Polimerin tutma kapasitesi hesaplandı. Seçimlilik özelliğini kanıtlamak için kalıp molekül ile aynı gruptan olan ve olmayan fenolik bileşiklere karşı seçimlilik denemeleri yapıldı. Farklı türdeki fenolik bileşiklerin kateşin baskılı (KAT-MIP) ve baskısız (KAT-NIP) polimerlere ne kadar tutunduğu hesaplandı. Tutunmanın kalıp moleküle (kateşin) özgüllüğü belirlendi.

Belirlenen en uygun koşullarda sentezlenen kateşin baskılı polimer (KAT-MIP) ile kırmızı ve beyaz üzüm çekirdeği ekstraktlarına moleküler baskılı katı faz ekstraksiyon (MISPE) uygulamaları gerçekleştirildi. KAT-MIP kartuşuna dolduruldu ve üzerine uygun çözücüde

hazırlanan ekstrakt yükleme yapıldı. MISPE' nin yükleme, yıkama ve elüsyon aşamaları sırasıyla gerçekleştirilip kateşinin % geri kazanımı HPLC analiziyle belirlendi.



2. GENEL KISIMLAR

2.1. MOLEKÜLER BASKILI POLİMERLER

Moleküler baskılama, hedef moleküle karşı yüksek seçicilikte tanıma özelliğinde bağlanma bölgelerine sahip polimerik materyallerin sentezine olanak veren ve gelişmekte olan bir teknolojidir (Lok ve Son, 2009).

Bu teknikte ilk olarak monomerler, kovalent veya non-kovalent etkileşimlerle uygun bir gözenek oluşturuvcu çözücü içerisinde kalıp molekül ile kompleks oluşturlar. Oluşan bu kompleks, uygun bir çapraz bağlayıcı ve radikal bir başlatıcının da kullanılmasıyla monomerler aracılığı ile polimerleşir. Polimerizasyondan sonra kalıp molekül kimyasal reaksiyon ve/veya ekstraksiyon ile ortamdan uzaklaştırılır. Böylece polimerde boyut, şekil ve fonksiyonel grup bakımından kalıp moleküle özgü yüksek seçicilikte bağlanma bölgeleri oluşmaktadır (Haupt, 2003; Yan ve Row, 2006) .

Moleküler baskılı polimerlerin (MIPs), biyolojik olarak benzerlerine göre birçok üstünlükleri bulunmaktadır.

- Hedef moleküle yüksek ilgi ve seçicilik,
- Hazırlama kolaylığı,
- Maliyet düşüklüğü,
- Fiziksel (yüksek sıcaklık ve basınca dayanıklılık) ve kimyasal kararlılığının (organik çözücüler, asitler, bazlar ve metal iyonlarına dayanıklılık) yüksek olması
- Tanıma yeteneklerini kaybetmeden uzun yıllar saklanabilmeleri bunlar arasında sayılabilir.

Kimya, ilaç, mühendislik, materyal bilimi ve biyoteknolojik endüstriler gibi çeşitli alanlarda potansiyel uygulanabilirliği nedeniyle bu teknoloji alanındaki araştırmalar, hızlı bir ilerleme kaydetmiştir (Vasapollo ve Sole, 2011; Yan ve Row, 2006; Lok ve Son, 2009).

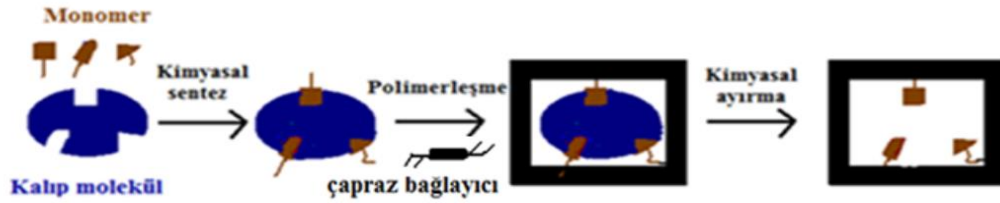
2.1.1. Moleküler Baskılı Polimerlerde Baskılama Yöntemleri

Moleküler baskılı polimer hazırlamada üç farklı yöntem bulunmaktadır.

1. Kovalent baskılama yöntemi
2. Non-kovalent (kovalent olmayan) baskılama yöntemi
3. Yarı-kovalent (semi-kovalent) baskılama yöntemi (Lok ve Son, 2009; He ve diğ., 2007)

2.1.1.1. Kovalent Baskılama Yöntemi

Kovalent baskılama, ilk kez Wulff ve arkadaşları (1972) tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntemde, öncelikle kalıp molekül, polimerleşebilen bir monomer ile kovalent bağ ile kimyasal olarak bağlanır. Fonksiyonelleştirilmiş kalıp molekül uygun gözenek oluşturuucu çözücü içerisinde çapraz bağlayıcı ile polimerleştirilir. Polimerizasyondan sonra kimyasal tepkimeyle bağ kırılır ve kalıp molekül ortamdan uzaklaştırılır (Khasawneh ve diğ., 2001; He ve diğ., 2007).



Şekil 2.1: Kovalent baskılama yönteminin genel şematik gösterimi (Yan ve Row, 2006).

Üstünlükleri

Kovalent baskılama yöntemi ile elde edilen bağlanma bölgeleri, non-kovalent baskılama yönteminde elde edilenlere kıyasla daha kesin ve karardır. Bu da daha geniş polimerizasyon koşullarında (yüksek veya düşük sıcaklık, pH) çalışma imkânı sağlamaktadır.

Sakıncaları

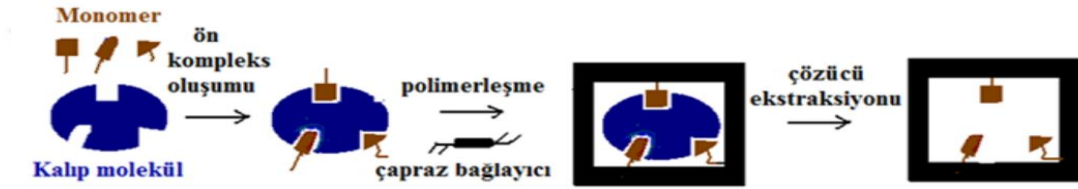
Kalıp moleküle özgü bağlanma bölgelerinin oluşumunda ve kalıp molekülün ortamdan uzaklaştırılması sırasında bağın tekrar kırılması işlemleri zor, yavaş ve maliyetlidir.

Ayrıca kovalent bağın kırılması esnasında baskılama etkisi azalmaktadır.

Bu gibi nedenler çalışma alanlarını sınırladığından bu yöntem literatürde ender olarak rastlanmaktadır (Khasawneh ve diğ., 2001; Komiyama ve diğ., 2003).

2.1.1.2. Non-kovalent (kovalent olmayan) baskılama yöntemi

Non-kovalent baskılamada bağlanma, hidrojen bağı, π - π etkileşimleri, elektrostatik etkileşimler gibi nispeten daha zayıf kovalent olmayan etkileşimlerle sağlanır. Polimerleşme sonrasında kalıp molekül çözücü ekstraksiyonu ile ortamdan basit bir şekilde uzaklaştırılır.



Şekil 2.2: Non-Kovalent baskılama yönteminin genel şematik gösterimi (Yan ve Row, 2006).

Üstünlükleri

- Polimerin hazırlanması deneysel olarak kolaydır.
- Kalıp molekülün uzaklaştırılması işlemi, uygun çözücü veya çözücü karışımlarıyla yıkanarak kolay ve hızlı bir şekilde gerçekleştirilir.
- Kalıpların MIP'lere hızlı bağlanması ve geniş bir hedef molekül aralığına potansiyel uygulanabilirliği gibi bazı üstünlükleri vardır (Caro ve diğ., 2002 ; He ve diğ., 2007).

Sakıncaları

- Baskılama işleminin kesinliği düşüktür.
- Polimerizasyon koşullarının seçilmesi oldukça zor ve zaman alıcıdır.
- Fonksiyonel monomerlerin çok aşırı sıklıkla spesifik olmayan bağlanma bölgeleri oluşturur ve bu da bağlanma seçiciliğini azaltır (Komiyama ve diğ., 2003).

2.1.1.3. *Semi kovalent (yarı kovalent) baskılama yöntemi*

Semi kovalent baskılama, kovalent baskılama ve non-kovalent baskılama yöntemlerinin birleşiminden ortaya çıkan bir yöntemdir. Polimerleşmeden önce kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki bağlanma kovalent bağ ile gerçekleşirken, kalıp molekülün polimer matriksinden uzaklaştırılmasından sonra analitin moleküler baskılı polimere (MIP) geri bağlanması non-kovalent etkileşimler yoluyla gerçekleşir. Bu nedenle her iki yöntemin başlıca avantajları olan, kovalent baskılamadaki kesinlik ve kararlılık özellikleri ile non-kovalent baskılamadaki hızlı geri bağlanabilme özelliğinin her ikisini de bünyesinde barındırır (He ve diğ., 2007 ; Caro ve diğ., 2006).

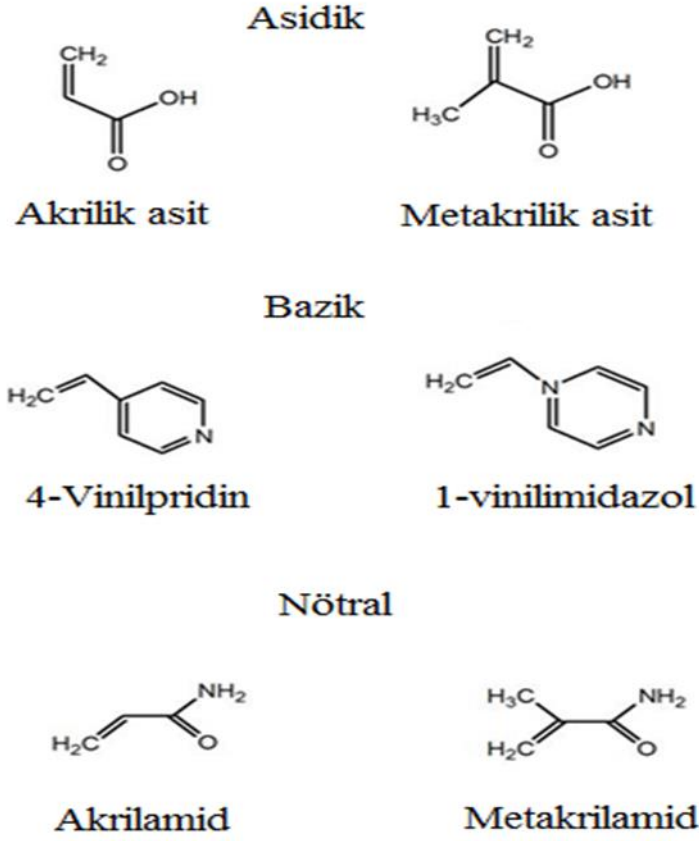
2.1.2. Moleküler Baskılı polimerleri Oluşturan Başlıca Bileşenler

2.1.2.1. *Kalıp Molekül*

Kalıp moleküller monomerler üzerindeki fonksiyonel gruplarla doğrudan etkileşime girdiklerinden dolayı tüm moleküler baskılama yöntemleri için merkezi öneme sahiptirler. İdeal bir kalıp molekül yapısında polimerleşebilen gruplar taşınmalıdır. Serbest radikal polimerizasyonuna uyumluğu açısından kalıp molekül, polimerizasyon şartlarında kimyasal olarak inert olmalıdır. Ayrıca yüksek sıcaklıklara ve UV ışınlarına dayanıklı olması istenen özellikleridir. Amino asitler, peptidler, steroid hormonlar, karbohidratlar, bazı ilaçlar, pestisitler, proteinler, nükleik asitler ve şekerler çalışılan bazı kalıp moleküllere örnek verilebilir (Vasapollo ve Sole, 2011).

2.1.2.2. *Fonksiyonel Monomer*

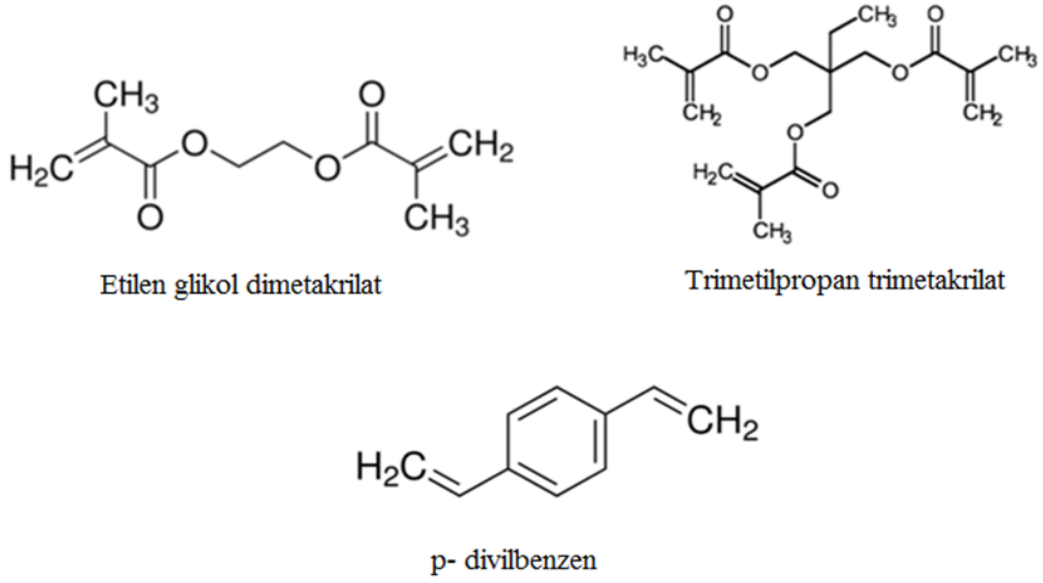
Fonksiyonel monomerlerin doğru seçimi, fonksiyonel grupların kalıp molekül ile etkileşiminin MIP'lerin seçimliliğini etkilemesinden dolayı moleküler baskılamada önemlidir. Fonksiyonel monomer ile kalıp molekül arasındaki etkileşimi arttırmak için non-kovalent bağlanma yönteminde monomer miktarı kalıp moleküle oranla daha fazla kullanılır. Kalıp molekülün sahip olduğu fonksiyonel grupların karakterine göre monomer seçilmelidir. Metakrilik asit (MAA), triflorometakrilik asit (TFM) gibi asidik yapıdaki monomerler, hidrojen bağı veya proton alıcısı kalıp moleküller ile uygundur ve genellikle bazik karakterli kalıplar kullanılır. Örneğin indol 3-asetik asit 'in baskılanması için de tercihen bazik gruplar taşıyan 4-vinilpiridin (4-VP) veya 2-vinilpiridin (2-VP) kullanılır (Masqu  , Marce ve diğ., 2001).



Şekil 2.3: Moleküler baskılamada kullanılan monomerlere örnekler.

2.1.2.3. Çapraz Bağlayıcı

Çapraz bağlayıcılar, polimerin morfolojisinin kontrolünden sorumludurlar (Vasapollo ve Sole, 2011). Polimere mekanik kararlılık, kimyasal inertlik sağlamak ve baskılama ile oluşan moleküler hafızayı korumak çapraz bağlayıcıların başlıca görevlerindendir (Masqu  , Marce ve diğ., 2001). Makro gözenekli yapıların mekanik kararlılığını sağlayabilmek için sentez sırasında kullanılan çapraz bağlayıcı miktarı (%70-90) yüksek tutulmalıdır (Yan, Row, 2006). Etilen glikol dimetakrilat (EDMA), p- divinilbenzen (DVB), ve trimetilolpropan trimetakrilat (TRIM) yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcılara örnek verilebilir.



Şekil 2.4: Moleküler baskılamada en çok kullanılan çapraz bağlayıcılara örnekler.

2.1.2.4. Gözenek Oluşturucu Çözücü

Moleküler baskılama için gerekli olan monomer, kalıp molekül, başlatıcı ve çapraz bağlayıcı gözenek oluşturucu çözücü içerisinde tek bir faz oluşturur (Vasapollo ve Sole., 2011). Porojen çözücüler, makromoleküller olarak bilinen MIP'lerin yapısındaki gözeneklerin oluşumunda önemli rol oynarlar (Yan, Row, 2006). Gözenek oluşturucu çözücünün yapısı ve miktarı, polimer morfolojisinin etkilerini ve non-kovalent etkileşimlerin gücünü belirler. Monomer ile kalıp molekül arasındaki kompleks oluşumunda etkili olan H bağıını bozacağı ve istenmeyen ürünlerin oluşumuna sebep olacağından düşük polariteye sahip çözücüler seçilmelidir. Düşük çözünürlüğe sahip çözücülerde erken faz ayrılması ve düşük yüzey alanına sahip geniş gözenekli formlar oluşur. Tam tersi yüksek çözünürlüğe sahip çözücülerde ise daha geç faz ayrılması ve geniş yüzey alanına sahip küçük gözenekli yapılar oluşur. Gözenek oluşturucu çözücünün hacminin artması gözenek boyutunu da artırır. Termodinamik açıdan iyi bir çözücü kullanımı, iyi oluşmuş gözenek yapıları ve yüksek seçicilikte yüzey alanları oluşmasını sağlar. SPE (katı-faz ekstraksiyonu) uygulamaları için MIP hazırlamada en çok kullanılan çözücüler (ACN), kloroform, diklorometan, toluendir (Masquè, Marce ve diğ., 2001). Hidrofobik etkileşimlere dayalı polimer sentezinde ise en uygun çözücü sudur (Vasapollo ve Sole, 2011; Yan ve Row, 2006).

2.1.2.5. Başlatıcı

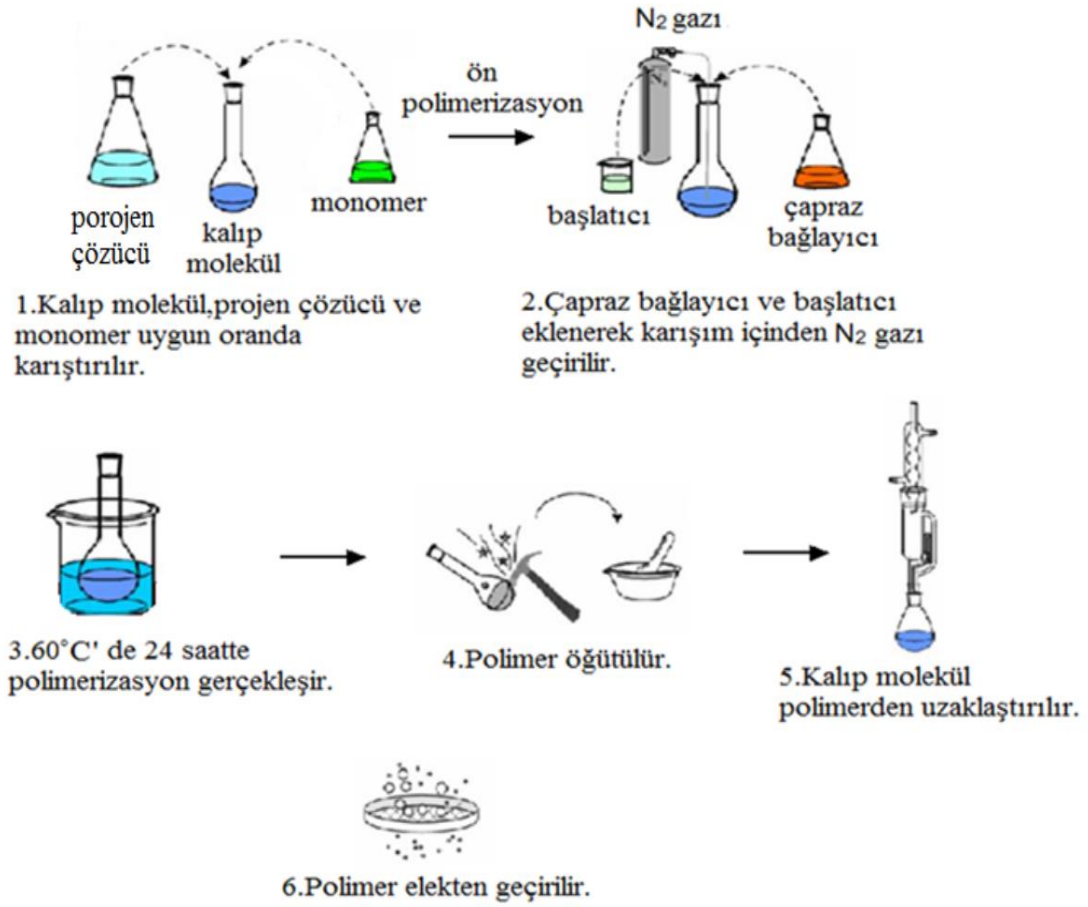
Farklı özelliklere sahip birçok başlatıcı serbest radikal polimerizasyonunda radikal kaynağı olarak kullanılabilir. Başlatıcının düşük miktarda kullanılması, polimerizasyon karışımının ulaştığı sıcaklığı düşürür ve bu da nitelikli baskı boşluklarının oluşumu açısından çok önemlidir (Mijangos ve diğ., 2006). Başlatıcıların radikal yapısına dönüşebilme hızı ve şekli kimyasal yapısına bağlı olarak ısı, ışık veya kimyasal/elektrokimyasal olaylardan etkilenir (Yan ve Row, 2006). Oksijen gazının varlığı radikal polimerizasyonunu engellediğinden ultranikasyon yöntemiyle veya tepkime ortamından azot ve argon gibi bir gaz geçirilerek ortamdan uzaklaştırılmalıdır. Yaygın olarak kullanılan başlatıcılara 2,2'-azobisisobutyronitril (AIBN) ve 2,2'-azobis-(2,4-dimetilvaleronitril) (ADVN) örnek verilebilir.

2.1.3. Moleküler Baskılı Polimer Sentezleme Yöntemleri

Moleküler baskılı polimerlerin hazırlanmasında kullanılan birden fazla yöntem vardır. Bunlar; yığın (bulk) polimerizasyonu, çok adımlı şişme polimerizasyonu, süspansiyon polimerizasyonu, çöktürme polimerizasyonu, emülsiyon polimerizasyonu ve yüzey baskılama polimerizasyonudur. Bu yöntemler arasında yığın polimerizasyonu uygulama kolaylığı nedeniyle en çok kullanılan yöntemdir (Moral ve Mayes, 2004). Bu tez çalışmasında da KAT-MIP bu yöntemle hazırlanmıştır.

2.1.3.1. Yığın (Bulk) Polimerizasyonu

Kronolojik olarak MIP'lerin sentezlenmesinde kullanılan ilk metot yığın (bulk) polimerizasyonu metodudur (Moral ve Mayes, 2004). Bu metot, basit cihaz kullanımı gerektirmesi ve kolay uygulanabilirliğinden dolayı yaygın olarak kullanılır (Moral ve Mayes, 2004; Lok ve Son, 2009). Kalıp molekül, monomer, projen çözücü, çapraz bağlayıcı ve başlatıcının belirli oranda karıştırılıp UV ışınması altında ve uygun sıcaklıkta polimerleştirilmesiyle polimerik bloklar oluşur. Polimeri öğütme aşamasında 20-50 µm aralığında düzensiz şekil ve boyutlara sahip partiküller elde edilir. Polimerin kromatografik analizler için sabit faz olarak kullanıldığı durumlarda oluşan bu düzensiz partiküller sorun oluşturmaktadır. Diğer bir dezavantajı ise öğütme ve eleme aşamasında yaşanan madde kaybıdır (Moral ve Mayes, 2004).



Şekil 2.5: Yığın polimerizasyonu oluşum şeması.

2.1.4. Moleküler Baskılı Polimerlerin Uygulama Alanları

Moleküler baskılı polimerlere özgü özellikler, ayırma ve saflaştırma bilimi, sensör ve biyosensör, kataliz ve ilaç dağıtımı gibi farklı uygulama alanları için onları oldukça ilgi çekici kılmaktadır.

2.1.4.1. Ayırma Teknikleri

a). Katı faz ekstraksiyonu

Katı faz ekstraksiyonu (Solid phase extraction, SPE), analitlerin bir mobil fazdan seçimli olarak ayrılması için yaygın olarak kullanılan örnek hazırlama tekniğidir. Analitler, örnek hazırlama

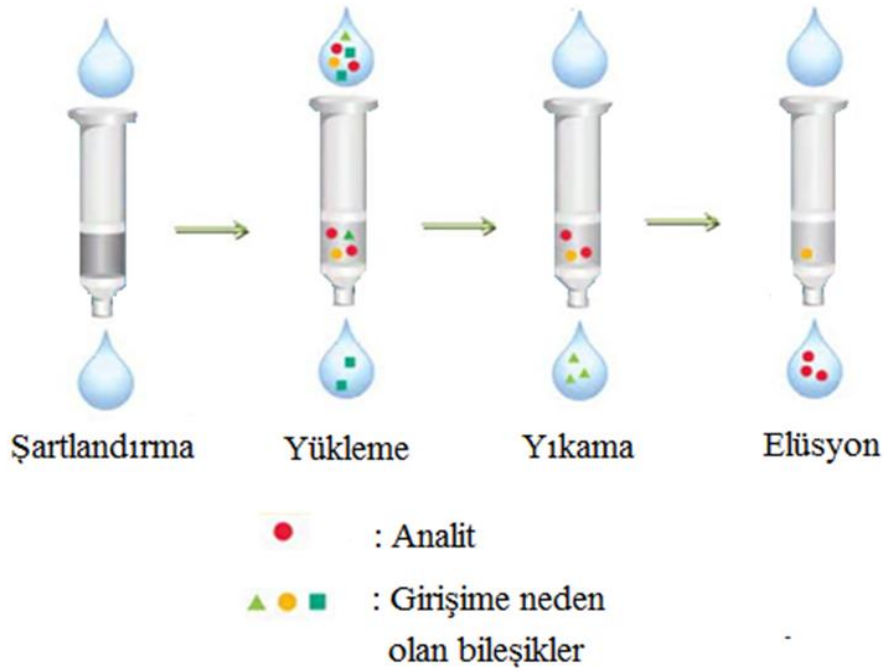
işlemi boyunca alıkonuldukları bir katı faza yüklenir. Bundan sonra katı faz, örnekten izole edilir ve analitler bir sıvı kullanılarak elüsyon yoluyla veya gaz faza termal desorpsiyon yoluyla geri kazanılır. SPE nin temel amaçları; derişiklendirme, örnek saflaştırma ve ortam değişimi (örnek matriksinden bir başka çözücü ortamına veya faza geçiş) dir.

SPE ilk olarak sıvı-sıvı ekstraksiyonu için tamamlayıcı ve ortam değiştirici olarak geliştirilmiştir. Günümüzde ise kimyanın çevre, ilaç, gıda ve endüstri gibi birçok alanında en yaygın olarak kullanılan örnek hazırlama tekniği haline gelmiştir (Poole, 2000). Bu teknik geleneksel sıvı-sıvı ekstraksiyonuna göre daha hızlı, ekonomik, çevre dostu ve basittir. Çok kullanılan sabit fazlar (iyon-değiştirme veya ters faz materyalleri) ile doldurulmuş katı faz ekstraksiyonu kolonlarının başlıca problemi, alıkonma mekanizmasının düşük seçimliliğidir. Gerçekte, söz konusu dağılım dengesinin çok sınırlı seçimliliği nedeniyle istenen analit(ler) ile birlikte benzer hidrofobikliğe/hidrofilikliğe sahip pek çok istenmeyen girişim yapan maddeler alıkonur ve derişiklenir (Baggiani ve diğ., 2007).

Moleküler baskılı katı faz ekstraksiyon yöntemi (MISPE), ilk olarak 1994 yılında Sellergren tarafından ilaç uygulamasında kullanılmıştır (Masqueè, 2001). Daha sonraki yıllarda farklı alanlarda da bu yöntemden faydalanılmıştır.

MISPE yöntemi dört aşamadan oluşmaktadır (Şekil 2.6)

- Polimerin şartlandırılması
- Yükleme
- Yıkama
- Elüsyon (Vasapollo ve Sole, 2011; Baggiani ve diğ., 2007; Eiroa ve diğ., 2006).



Şekil 2.6: Sorban olarak MIP'in kullanıldığı katı faz ekstraksiyon şeması (Eiroa ve diğ., 2016).

- Polimerin şartlandırılması

Bu basamakta polimer ile örnek etkileşimini en üst düzeye çıkarmak için MIP'e özgü bağlanma bölgeleri uygun çözücü ile aktive edilir.

- Yükleme

Bu basamakta SPE kartuşu içine doldurulmuş sorban üzerine örneğin yüklemesi yapılır. Örnek hazırlamada kullanılan çözücü, analit ve MIP üzerindeki spesifik bağlanma bölgeleri arasındaki etkileşimlerin sayısını arttırdığı için polimerizasyon işleminde kullanılan çözücüye benzer polaritede olmalıdır (Vasapollo ve Sole, 2011). Örnek hazırlamada kullanılan çözücünün polaritesinin düşük olması hedef molekül ile MIP arasındaki etkileşimi artırır. Bu şekilde MIP üzerinde yalnızca hedef molekülün tutunduğu seçimli bir adsorpsiyon gerçekleşmiş olur.

- Yıkama

Seçilen yıkama çözücüsü, MIP ile hedef molekül arasındaki seçimli etkileşimleri bozmaksızın spesifik olmayan etkileşimleri engellemelidir. Bu amaçla diklorometan, toluen ve kloroform gibi düşük polariteye sahip çözücüler yaygın olarak kullanılırlar (Masqu  ve diğ., 2001). Bazı çalışmalarda metanol ve asetonitril gibi polaritesi yüksek olan       ler kullanıldığında da iyi sonuçlar elde edildiği görülmüştür. Bazı yazarlar ise       hafızası etkisinden yola çıkararak polimer sentezinde kullanılan gözenek oluşturucu       lerin yıkama       s  olarak kullanılabileceğini ifade etmektedir. Hedef molekülün alıkonması (kolonda tutulu kalmasının sağlanması) için yıkama       s n n miktarı, pH değeri ve kimyasal yapısı optimize edilmelidir (Qiao ve diğ., 2006; Caro ve diğ., 2006).

- Elüsyon

Analit ile MIP arasındaki bağı kırmak için metanol ve asetonitril gibi polar       ler veya bunların düşük miktarda asetik asit veya pridin içeren       karışımları kullanılır (Masqu  ve diğ., 2001).

Moleküler baskılı katı faz ekstraksiyonu hem kesiksiz (on-line) hem de kesikli (off-line) işlemlerle uygulanır.

On-line MISPE metodu direkt olarak HPLC gibi spesifik analitik bir sistem ile birleştirilir. MIP'ler, seçimli sorbent olarak bir HPLC  n kolonuna doldurularak kullanılır. Bu uygulama ile kirlilik riski, analit kayıpları ve ön işlem süresi azaltılmış olur (Vasapollo ve Sole, 2011).

Off-line MISPE metodu klasik SPE prosedürünün aynısıdır. MIP boş kartuşlara doldurulup şartlandırılır.  rnek polimer üzerine yüklenir. Girişim yapan maddeler yıkama basamağında uygun       lerle uzaklaştırılır. En son hedeflenen molekül elüe edilerek sıvı kromatografisi, gaz kromatografisi ve kapiler elektroforez gibi bir analitik sistem ile analiz edilir. On-line MISPE metodunun üstünlüklerine rağmen, off-line MISPE metodu basitliğinden dolayı en çok kullanılan metottur (Vasapollo ve Sole, 2011). Ayrıca bu metotta ardışık ayırma metotları üzerindeki etkisine bakılmaksızın fazla sayıda       kullanılabılır.

b) Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Çoğu araştırmacı HPLC yöntemini sentezlenen MIP'lerin niteliğini değerlendirmek amacıyla kullanmaktadır. Spesifik ve spesifik olmayan bağlanma arasındaki farkın belirlenmesini sağlar (Andersson, 2000). MIP'ler amino asit türevleri ve ilaçlar gibi farklı bileşiklerin rasemik çözeltilerinin enantiyomerik ayrımlarını sağlamak için HPLC' de kiral sabit faz olarak kullanılır. MIP'lerin LC de sabit faz olarak kullanıldığı ilk çalışma Mosbach tarafından aminoasit türevlerinin ayrılması için yapılmıştır.

HPLC kolonlarında MIP 'lerin kullanılmasının, ticari olarak kullanımının sınırlı olması, pik genişlemesi ve kuyruklanması gibi sakıncaları bulunmaktadır (Vasapollo ve Sole, 2011).

c) Kapiler Elektrokromatografi (CEC)

CEC, elektroforezin elektroosmotik mobil faz taşınımı ile LC'nin sabit fazının kombinasyonundan oluşan hibrit (melez) bir ayırma tekniğidir. Doğal olarak daha etkili olan bu kromatografi tekniği (CEC), LC'de elde edilene kıyasla baskılı polimerlerin performans verimini artırır. LC'ye kıyasla diğer bir üstünlüğü ise; baskılı türleri içeren ve kimyasal tüketimini en aza indiren mikro kolonların kullanılmasıdır (Andersson, 2000).

2.1.4.2. Sensör Uygulamaları

Gıda analizleri, çevresel analizler ve klinik araştırmalardan doğan taleplerden dolayı son yıllarda modern analitik kimya alanlarında sensör ve biyosensörlere olan ilgi artmıştır. MIP'ler, kimyasal inertlik, su ve çoğu organik çözücülerde çözünmeme, uzun süre kararlılık özelliklerine sahiptirler. Bu nedenle MIP tekniği, yüksek seçimli ve duyarlı antikor benzeri materyaller ile kimyasal sensör yapmak için kullanılabilir (Vasapollo ve Sole, 2011).

2.1.4.3. Kataliz Uygulamaları

MIP'lerin kataliz uygulamaları oldukça önemli bir konudur. Kataliz uygulamalarında, MIP'lerin yüksek sıcaklık ve basınç ve organik çözücülere karşı dayanıklı olmak gibi üstünlüklerinden yararlanılarak bazı tepkimelerde enzim ve katalitik antikorların yerine MIP katalizörler kullanılır. MIP katalizörler, reaksiyon ortamında enzim ve antikorların bağlanma seçimliliğini ve stereospesifikliğini taklit ederler (Vasapollo ve Sole., 2011).

2.1.4.4. İlaç Dağıtım Uygulamaları

MIP'lerin biyoaktif moleküllere seçimli ve güçlü bağlanabilme kabiliyetlerinin olması biyolojik sistemlere uygulanabilme özelliği kazandırmıştır.

Etkili bir ilaç dağıtım sistemi, ilacın doğru zaman aralığında, uygun dozda, doğru bölgeye bırakılmasını sağlamalıdır.

İlaç dağıtım uygulamaları için MIP'ler karakteristik özelliklere sahip olmalıdır. Kalıp molekül yokluğunda MIP kalıba özgü bağlanma bölgelerini içermelidir. Ayrıca MIP enzimatik ve kimyasal ataklara ve mekanik baskılara karşı dayanıklı olmalıdır (Lorenzo ve Concheiro, 2004).

MIP'lerin sentezinde organik çözücüler kullanılır ve bu çözücüler biyolojik hücrelere zarar vermektedir. Bu nedenle baskılı-ilaç dağıtım sistemlerinin klinik çalışmalarda kullanılabilmesi için öncelikle MIP'lerin toksikolojik problemlerine çözüm bulmak gerekmektedir. Bu amaçla ilaç dağıtım uygulamalarında biyolojik sistemlere uygun hidrofilik polimerler kullanılmaktadır (Vasapollo ve Sole, 2011).

2.1.5. MIP Etkinliğinin Belirlenmesi

Moleküler baskılama tekniği ile sentezlenen polimerlerin etkinliğinin belirlenmesi (yani; kalıp moleküle özgü oluşturulan hafızanın doğru ve yeterli olup olmadığı), polimer sentezi kadar önemli bir husustur. Moleküler baskılama etkinliğinin büyüklüğü, baskılı polimerlerle (MIP), aynı şartlar altında sentezlenen baskısız polimerin (NIP) kıyaslanmasıyla elde edilir.

MIP'e bağlanan madde miktarının, NIP'e bağlanan madde miktarına oranı ile baskılama faktörü (BF) elde edilir.

$$\text{Baskılama Faktörü (BF): } Q_{\text{MIP}}/Q_{\text{NIP}} \quad (2.1)$$

Q_{MIP} : MIP'e bağlanan madde miktarı ($\mu\text{g g}^{-1}$)

Q_{NIP} : NIP'e bağlanan madde miktarı ($\mu\text{g g}^{-1}$)

Polimerlerin adsorpsiyon (tutma) kapasitelerinin belirlenmesinde kesikli temas (batch) testi ve kopma (breakthrough) eğrisi yönteminden yararlanılır.

2.1.5.1. Kesikli Temas (Batch) Testi

Bu yöntemde baskılı polimerlerin bağlama aktivitesini belirlemek için farklı derişimlerde hedef molekül içeren çözeltiler belli miktardaki polimer üzerine belli hacimde eklenir. Bu karışım çalkalayıcı veya manyetik karıştırıcı yardımıyla polimer doygunluğa ulaşınca kadar çalkalanır. Dengeye ulaştıktan sonra adsorbanlar süzülerek adsorplanan madde miktarı ve adsorpsiyon yüzdesi HPLC, UV veya diğer analitik yöntemlerle eşitlik (2.2) ve (2.3) ile belirlenir (Komiya ve diğ., 2003).

$$Q = [(C_e - C_e) \times V \times M_A] / m \quad (2.2)$$

$$\% \text{ Adsorpsiyon} = [(C_e - C_e) \times 100] / C_o \quad (2.3)$$

Q: Birim polimer başına adsorplanan madde miktarı ($\mu\text{g g}^{-1}$)

C_o: Polimer tarafından adsorplanacak maddenin başlangıç derişimi (μM)

C_e: Denge de adsorplanmadan kalan madde derişimi (μM)

V: Çözelti hacmi (mL)

M_A: Mol kütlesi (g mol^{-1})

m: Polimer miktarı (g)

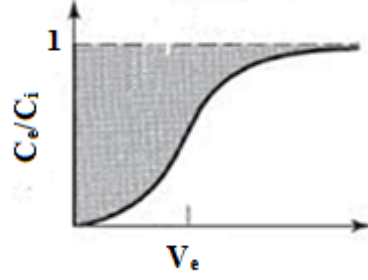
2.1.5.2. Kopma (Breakthrough) Eğrisi Tekniğı

SPE kolonuna doldurulmuş MIP üzerinden belirli derişimlerde kalıp molekül içeren çözelti kısımlar halinde $C_e/C_i=1$ olana kadar yani polimer doygunluğa ulaşana kadar geçirilir. Bu değer polimerin etkin kapatesini belirler. Etkin kapasite 1 g kuru adsorban veya 1 ml şişmiş adsorban birimine karşılık gelen milimol, miligram, mikrogram birimleri ile ifade edilir. C_e/C_i oranı ordinata, V_e değeri apsise yerleştirilerek bir eğri elde edilir. Eğrinin toplam alanından $C_e/C_i=1$ doğrusu altındaki alan çıkarıldığında polimerin etkin (dinamik) tutma kapasitesi elde edilir (Hennion, 1999; Karaman Ersoy, 2016).

C_e: Kolona yüklenen çözeltinin başlangıç derişimi

C_i: Kolondan ayrılan çözeltinin derişimi

V_e : Kolona yüklenen çözelti hacmi



Şekil 2.7: Dinamik tutma kapasitesinin breakthrough (kopma) tekniğine göre belirlenmesi.

2.1.6. MIP'lerin Adsorpsiyon Büyüklüklerinin Belirlenmesi

Moleküler baskılı polimerlerin adsorpsiyon büyüklüklerinin belirlenmesi için Freundlich ve Langmuir izotermelerinden yararlanılır.

2.1.6.1. Freundlich İzotermi

Freundlich izotermi, Herbert Max Finley Freundlich tarafından 1926 yılında heterojen çok tabakalı yüzeylerdeki ideal olmayan sorpsiyon için önerilmiştir. Freundlich izotermi, en kolay şekilde uygulanabilen dağılım modelidir. Çeşitli yüzeylerde gözlenen sorpsiyon işlemlerinde yüzey heterojenliğinin ve enerji dağılımının sürekliliğini tanımlamak için Freundlich izoterminden yararlanılmıştır (García-Calzón ve Díaz-García, 2007; Rampey ve diğ., 2004).

Freundlich izotermi aşağıdaki eşitliklerle ifade edilir;

$$Q_e = K_f C_e^{1/n} \quad (2.4)$$

Eşitlik doğrusal hale dönüştürülebilir;

$$\log Q_e = \log K_f + 1/n \log C_e \quad (2.5)$$

Q_e = Adsorbanın birim kütlesi başına adsorplanan madde miktarı ($\mu\text{g g}^{-1}$)

C_e = Çözeltide adsorplanmadan kalan madde derişimi (μM)

K_f değeri adsorpsiyon kapasitesini, $1/n$ ise adsorpsiyon şiddetini ifade etmektedir.

n değeri, sorbanın heterojenliği ve adsorpsiyonun elverişli olup olmadığı konusunda fikir verir. n'nin değeri 1 ile 10 ($1 < n < 10$) arasında olmalıdır. Bu aralık adsorpsiyonun elverişli olduğunu gösterir.

Eşitlik (2.5)'e göre $\log C_e$ 'ye karşı $\log Q_e$ grafiği çizilerek eğim ve kayım değerlerinden K_f ve n değerleri hesaplanır. Adsorpsiyonun Freundlich izotermine uygunluğu belirlenir (Serencam ve diğ., 2013).

2.1.6.2. Langmuir İzotermi

Langmuir izotermi ilk olarak 1930 yılında Butler ve Ockrent tarafından geliştirilmiştir (Choy ve diğ., 2000). Adsorpsiyon çalışmalarında sıklıkla kullanılan oldukça basit olan bu model adsorpsiyon oranı ve bağlanma bölgelerinin sayısı arasındaki doğrusal bağıntıya dayanır. Langmuir izotermi üç temel varsayıma dayanır;

- i. Adsorpsiyon tek tabakalı olarak gerçekleşir.
- ii. Bağlanma bölgelerinin tüm yüzeyi eşdeğerdir ve adsorban yüzeyindeki her bir nokta tek bir molekül adsorplayabilir.
- iii. Kalıp molekülün belirli bir bölgeye bağlanma kabiliyeti komşu bölgelerin dolmuş olmasına bağlı değildir.

Langmuir izotermine göre adsorpsiyon adsorban içindeki spesifik homojen bağlanma bölgelerinde gerçekleşir. Bir kalıp molekül bir bağlanma bölgesine bir kez bağlanır bundan sonra bu bölgede bağlanma gerçekleşmez. Teorik olarak bir doygunluğa ulaşılır. Yani adsorplanan madde miktarı sabitlenir. Bu doygunluk değeri, adsorplama kapasitesinin hesaplanmasına olanak sağlar (Garcia-Calzón ve Diaz-Garcia, 2007).

Langmuir izotermine göre adsorpsiyon kapasitesi ve enerjisi şu denklemlerle belirlenir.

$$Q_e = Q_{\max} \cdot b \cdot C_e / (1 + b \cdot C_e) \quad (2.6)$$

Eşitlik doğrusal forma dönüştürülürse;

$$C_e / Q_e = 1 / (Q_{\max} \cdot b) + C_e / Q_{\max} \quad (2.7)$$

C_e = Çözültide adsorplanmadan kalan madde derişimi (μM)

Q_e = Adsorbanın birim kütlesi başına adsorplanan madde miktarı ($\mu\text{g g}^{-1}$)

b = Adsorpsiyon enerjisini ifade eden Langmuir sabiti ($\text{L } \mu\text{mol}^{-1}$)

Q_{max} = Adsorpsiyon kapasitesini ifade eden Langmuir sabiti ($\mu\text{g g}^{-1}$)'dir.

Eşitlik (2.7)' ye göre C_e/Q_e değerinin, C_e değerine karşı değişiminin grafiği çizildiğinde elde edilen doğrunun eğimi $1/q_{\text{max}}$ sabitinin değerini, kesim noktası da $1/b \cdot q_{\text{max}}$ değerini ifade eder. Buradan b sabiti hesaplanır.

Langmuir izotermine göre adsorpsiyonun elverişli olup olmadığını belirlemek için boyutsuz ayırma R_L sabiti hesaplanır.

$$R_L = 1 / (1 + b \cdot C_0) \quad (2.8)$$

b = Langmuir sabiti ($\text{L } \mu\text{mol}^{-1}$)

C_0 = Maddenin çözeltideki başlangıç derişimi ($\mu\text{mol L}^{-1}$)

Eşitlik (2.8)'den bulunan R_L değerleri; $R_L > 1$, $R_L = 1$, $0 < R_L < 1$ ve $R_L = 0$ olması durumunda sırasıyla adsorpsiyon izotermine elverişsiz, doğrusal, elverişli ve tersinmez olduğunu gösterir (Karaman Ersoy, 2014).

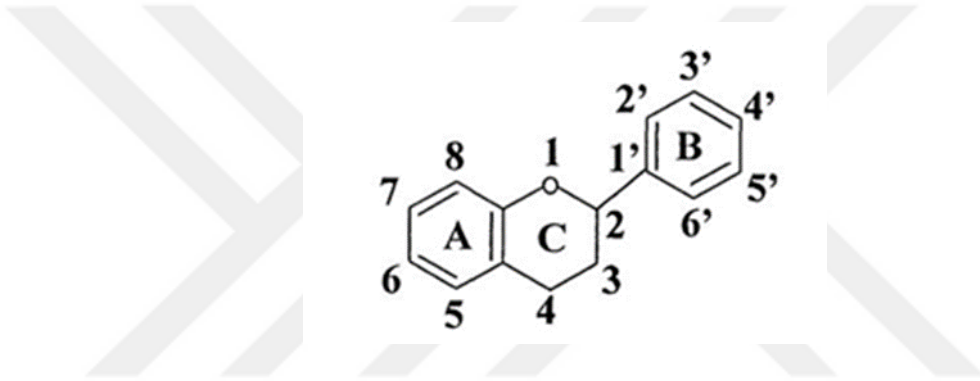
2.2. FENOLİK BİLEŞİKLER

Fenolik bileşikler, tıbbi bitkilerden, sebze ve meyvelerden, baharat ve tahıllardan elde edilen insan sağlığı için faydalı doğal antioksidanlardır. Bu bileşikler başlıca serbest radikallerden, reaktif oksijen türlerinin zararlı etkileri engellemekte önemli rol oynarlar (Stratil ve diğ., 2007). Serbest radikallerin oluşumunu engelleyerek kanser, kalp-damar ve alzheimer gibi hastalıklara yakalanma riskini azaltırlar (Apak ve diğ., 2007). Fenolik bileşiklerin antioksidan etkileri kimyasal yapıları ile ilişkilidir. Fenolik bileşiklerin antioksidan aktiviteleri, başlıca onların indirgen madde, hidrojen atomu verici, singlet oksijen söndürücü ve metal iyonu kelatlayıcı olarak davranmalarını sağlayan redoks özellikleri nedeniyle (Kaur ve Kapoor, 2002).

Fenolik bileşikler, flavonoidler, fenolik asitler, fenolik polimerler (tanenler) olmak üzere üç gruba ayrılırlar.

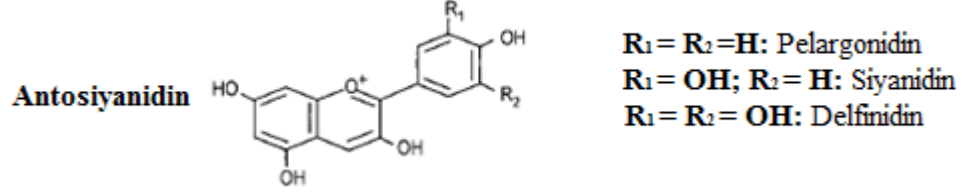
2.2.1. Flavonoidler

Flavonoidler, (C₆C₃C₆) karbon iskeletine sahip düşük moleköl ağırlıklı fenolik bileşiklerdir. Bu üç halkadan A ve B yi 6 karbonlu iki aromatik halka C yi ise 3 karbonlu piran halkası oluşturur. Flavonoidlerin biyokimyasal aktiviteleri, onların kimyasal yapısına ve moleköl üzerindeki fonksiyonel grupların sayısına, türüne ve konumlarına bağlıdır (Cook ve Samman, 1995). Bitki yaprak, kabuk, çekirdek ve köklerinde 4000' den fazla flavonoid bulunmaktadır. Flavonoidler, kimyasal yapılarına göre kendi içlerinde antosiyaninler ve antoksantinler olarak; antoksantinler ise flavon, flavonol, flavanol, flavanon, izoflavon ve dihidrokalkonlar olarak sınıflandırılırlar.



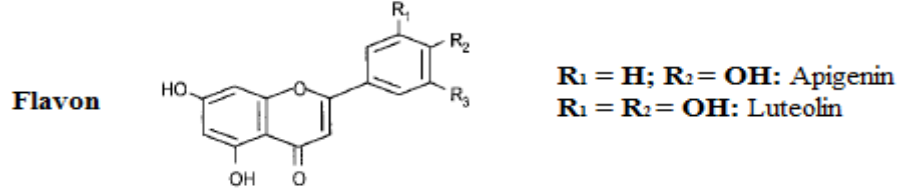
Şekil 2.8: Flavonoidlerin genel yapısı (Heim ve diğ., 2002).

Antosiyaninler, antosiyanidinlerin glikoziti olup çoğu meyve ve sebzedeki renkten sorumludurlar. Antosiyanidinler B halkasındaki grupların konumuna göre karakterize edilirler. Yapısındaki elektron eksikliği onları oldukça reaktif yapar ve kararlılıkları pH ve sıcaklığa bağlıdır. Antosiyaninler aglikonları olan antosiyanidinlerden daha karardır. Delfinidin, siyanidin, malvidin ve pelargonin antosiyaninlere örnek verilebilir (Gracia ve diğ., 1997). Antosiyaninler en çok meyvelerde bulunmakla birlikte, kırmızı şarapta, bazı tahıl çeşitlerinde, bazı yeşil yapraklı ve köklü sebzelerde (patlıcan, lahana, fasulye, turp) bulunur (Manach ve diğ., 2004).



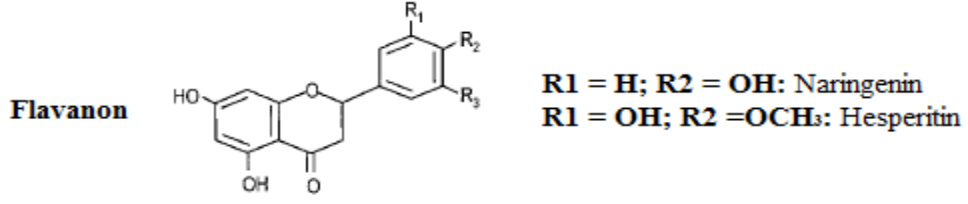
Şekil 2.9: Antosiyanidinlerin kimyasal yapıları.

Flavonlar, C_3 konumunda hidroksil grubunun bulunmadığı durumda C_2 ile C_3 arasında çift bağın bulunduğu bir molekül yapısına sahiptir. Bu bileşiklerin önemli farmakolojik özelliklerinin olduğu bilinmektedir. Flavonlar bitkilerde aglikonları ve glikozitleri halinde bol miktarda bulunmaktadır (Garrido ve Borges, 2013). En çok bilinen flavonlar, luteolin ve apigenindir. Maydanoz ve kereviz en önemli flavon kaynaklarıdır (Rice-Evans ve diğ., 1997, Manach ve diğ., 2004).



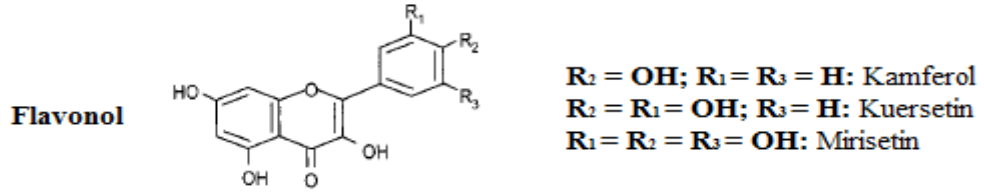
Şekil 2.10: Flavonların kimyasal yapıları.

Flavanonlar, flavonun dihidro türevleridir. Bu nedenle daha çok dihidroflavon olarak isimlendirilirler. C_2 ile C_3 arasında doymuş hidrokarbon zinciri bulunur. Flavanonlar domates ve nane gibi bazı aromatik bitkilerde bulunurlar. Ancak narenciye türü meyvelerde yüksek derişimlerde bulunurlar. Flavanon grubundan hesperitin portakalda, naringenin greyfurtta bol miktarda bulunurlar (Manach ve diğ., 2004).



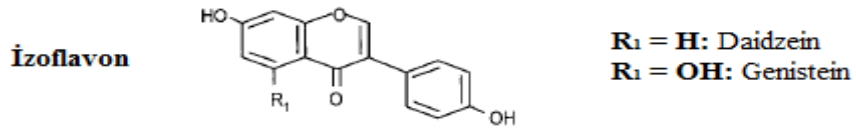
Şekil 2.11: Flavanonların kimyasal yapıları.

Flavonoller, C₂ ile C₃ arasında çift bağın bulunduğu flavon yapısına ek C₃ konumunda hidroksil grubunun bulunması nedeniyle 3-hidroksiflavon olarak adlandırılırlar. Kuersetin, mirisetin, kamferol ve izoramnetin bilinen flavonollerdendir. Flavonoller gıdalarda bulunan en yaygın flavonoidlerdir. Soğan, elma kabuğu ve kırmızı üzüm kabuğu, brokoli ve yaban mersini bol miktarda bulunmaktadır.



Şekil 2.12: Flavonollerin kimyasal yapıları.

İzoflavon, flavonların izomerleridir. Bilinen izoflavonlardan genistein ve daidzein soya fasülyesinde bulunmaktadır.

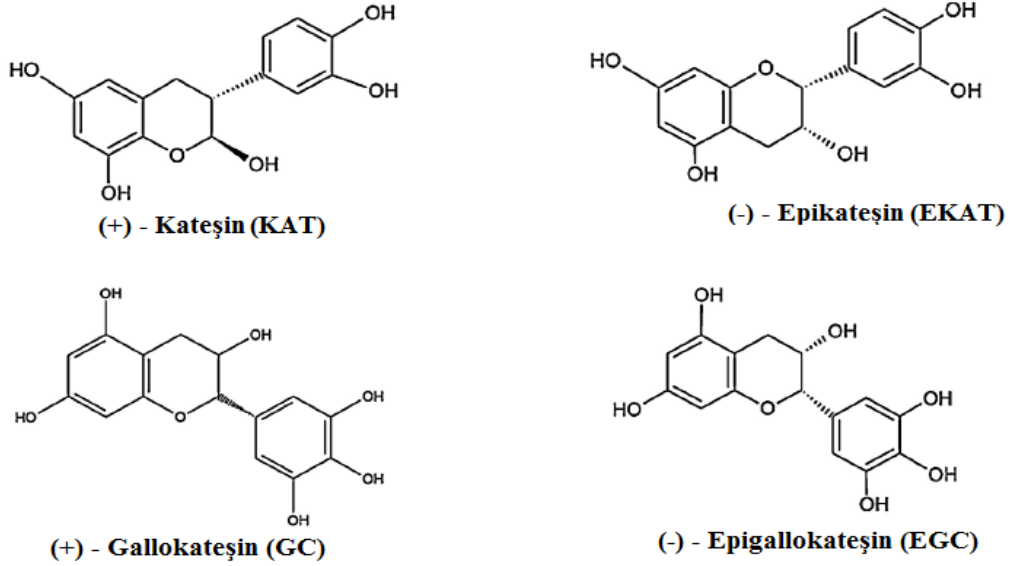


Şekil 2.13: İzoflavonların kimyasal yapıları.

Flavanoller (kateşinler), C₂ ile C₃ arasında doymuş hidrokarbon zinciri ve C₃ de bir hidroksil grubu bulunup ve C₄ de karbonil grubunun bulunmadığı molekül yapısına sahiptirler. Flavan-

3-ol olarak bilinirler. Flavan-3-oller doğada en çok kateşin ve onun enantiyomeri olarak bulunur.

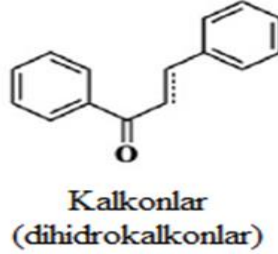
Kateşinleri, serbest kateşinler ve esterleştirilmiş kateşinler olarak iki gruba ayırmak mümkündür. Serbest kateşinler, kateşin, epikateşin, gallokateşin (GC), epigallokateşindir (EGC). Esterleştirilmiş kateşinler ise epigallokateşin gallat (EGCG), epikateşin gallat (ECG), gallokateşin galat ve kateşin galattır. Yeşil çayda EGCG yüksek derişimde bulunur. Bunu sırasıyla EGC, ECG, GC takip eder. Esterleşmiş kateşinler serbest kateşinlere nazaran daha acımsı tattadırlar. Kateşinler, meyve, sebze ve içeceklerde yüksek derişimlerde bulunan fenolik bileşiklerdir. Üzüm, elma, kiraz, yeşil çay, şarap önemli kateşin kaynaklarıdır. Şaraptaki polifenol içeriğini başlıca kateşin, epikateşin ve epikateşin gallat oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalara göre kateşinler dejeneratif hastalıklara karşı koruma sağlarlar. Kateşinler, kanser tedavinde tümör önleyici ve bağışıklık güçlendirici olarak hareket ederler. Ayrıca diyetle kateşin ve epikateşin alımının kalp hastalıklarına bağlı ölümleri azalttığı görülmüştür (Gadkari ve Balaraman, 2014, Garrido ve Borges, 2013).



Şekil 2.14: Flavanollerin kimyasal yapıları.

Kalkonlar, iki aromatik halkaya α,β doymamış karboksil grubunun bağlı olduğu flavonoidlerdir. Dihidroalkonlar ise kalkonların indirgenmesiyle elde edilirler. Kalkon

türevleri, önemli ara maddelerdir ve üzüm ve şarap örneklerinde bulunan flavonoid türevlerinin öncüsüdürler.



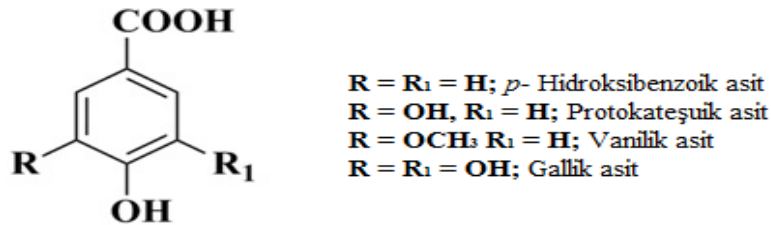
Şekil 2.15: Kalkonların (dihidroalkonların) kimyasal yapıları.

2.2.2. Fenolik Asitler

Fenolik asitler, 6 karbonlu (C6-C1) hidroksibenzoik asitler ve 9 karbonlu (C6-C3) hidroksisinamik asitler olmak üzere iki gruba ayrılır.

2.2.2.1. Hidroksibenzoik asitler

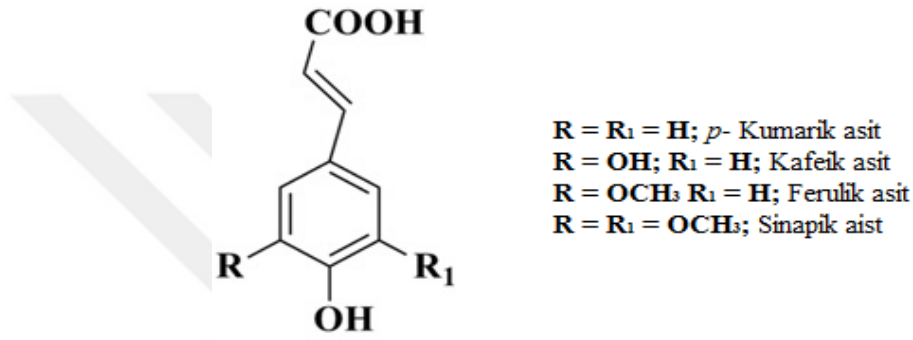
Hidroksibenzoik asitler, yapısındaki aromatik halkaya bağlanan hidroksi ve metoksi gruplarına göre adlandırılırlar. Gallik asit, p- hidroksibenzoik asit, protokateşuik asit, vanilik asit, siringik asit bilinen hidroksibenzoik asitlerdendir. Gallik asit, tüm hidrolizlenebilen tanenlerin öncüsü olan en önemli fenolik bileşiktir. Siyah turp ve soğan ve bazı kırmızı meyveler hariç sebzelerdeki hidroksibenzoik asit miktarı düşüktür. Çay önemli bir gallik asit kaynağıdır (Manach ve diğ., 2004).



Şekil 2.16: Hidroksibenzoik asitlerin kimyasal yapıları.

2.2.2.2. Hidroksisinnamik asitler

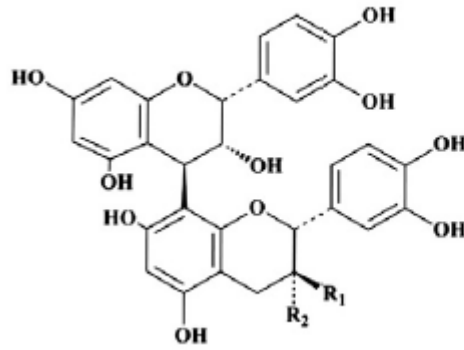
Hidroksisinnamik asitler cis ve trans izomerik formda bulunurlar. Doğada en çok bulunan formu trans formudur. Enzimatik olarak veya UV ışması etkisiyle trans formdan cis forma dönüşebilirler. Doğal hidroksisinnamik asit genellikle kunik asit ve glukoz molekülü ile bağlanmış esterleri halinde bulunurlar. p- kumarik asit, kafeik asit, ferulik asit ve sinapik asit üzüm ve şarapta bulunan hidroksisinnamik asitlerdir. Hidroksisinnamik asitler ayrıca şaraptaki esmerleşme sürecinde görevlidirler ve uçucu fenolik bileşiklerin öncüleridirler.



Şekil 2.17: Hidroksisinnamik asitlerin kimyasal yapıları.

2.2.3. Fenolik Polimerler (Tanenler)

Fenolik bileşiklerin üçüncü grubunu oluşturan tanenler, yüksek moleküllü bileşiklerdir. Kendi içinde kondanse tanenler ve hidrolizlenebilen tanenler olmak üzere iki alt gruba ayrılırlar. Protoantosiyeninler, polimerik flavonoidlerdir. En yaygın olarak çalışılan kondanse tanenler, kateşin ve epikateşin yapılarıdır. Hidrolizlenebilen tanenler ise gallik asit türevleridirler. Metal iyonu kelatlayıcı, protein çöktürme ve biyolojik antioksidan olma gibi özelliklerinden dolayı biyolojik sistemler üzerinde de etkilidirler. Kondanse tanenler; elma, armut ve üzüm, hidrolizlenebilen tanenler ise; nar ve ahududu gibi meyvelerde bulunmaktadır (Ignat ve diğ., 2011).



$R_1 = OH; R_2 = H$ Prosiyanidin B1
 $R_1 = OH; R_2 = H$ Prosiyanidin B2

Şekil 2.18: Fenolik polimerlerin (tanen) kimyasal yapısı.

2.3. KATEŞİN VE TÜREVLERİ BASKILI POLİMERLERLE YAPILMIŞ ÇALIŞMALAR

Tablo 2.1’de kalıp molekül ve/veya ekstrakte edilen ürünün KAT ve türevleri olduğu çalışmalar özetlemiştir.

Tablo 2.1: KAT ve türevleri ile yapılan çalışmalar.

Kalıp molekül (K)	Monomer (M)-Çapraz bağlayıcı (ÇB)	Gözenek oluşturuç çözücü	Polimerizasyon tekniği	Mol oranı (K:M:ÇB)	Doğal örnek	MIP uygulama alanı	Seçimliliği araştırılan fenolik bileşikler	Geri bağla(n)ma çözücüsü	Baskılama Faktörü (BF)	Referans
KAT	AA-EDMA	ACN	Bulk polimerizasyonu	1:5:25	Organik yeşil çay	MISPE	KAT, EKAT, EGCG, ECG, GC, GCG	ACN	3,84	Bhalová ve diğ., 2004
KAT	AA-EDMA	ACN	Bulk polimerizasyonu	1:5:30	Yeşil çay	MISPE	KAT, EKAT, EGCG	ACN	—	Jin ve diğ., 2011

Tablo 2.1 (devam):

KUE	4-VP-EDMA	Aseton:ACN (3:1 h/h)	Termal polimerizasyon	1:4:20	Çay (Beyaz, kırmızı, siyah, yeşil), kakao, üzüm atıkları	MISPE	KAT, EKAT, EGCG, Kafein	H ₂ O	4,6	López ve diğ., 2012
EKAT	AA-EDMA	Aseton	Bulk polimerizasyonu	1:5:50	Shimen yeşil çay yaprağı	MISPE	EKAT	H ₂ O	3,84	Ding ve diğ., 2006
EGCG	Chitosan-Glutaraldehit	H ₂ O	—	—	Ham çay bitkisi	HPLC	EGCG	MeOH	1,32	Chen ve diğ., 2012
EGCG	AA-EDMA	PS-THF::ISO (7:3, h/h)	Monolitik baskılama	1:6:18	Ham yeşil çay	MISPE	EGCG	—	9,67	Sun ve diğ., 2015
EGC, EKAT,GC	2-VP, EDMA	Sikloheksanol	Çok adımlı şişme polimerizasyonu	1:7:25	Yeşil çay	HPLC	EGC, EKAT, GC	EtOH:H ₂ O	—	Haginaka ve diğ., 2006
KAT (Bizim çalışmamız)	4-VP, EDMA	ACN:DMSO (%2, h/h)	Bulk polimerizasyonu	1:4:20	Şarap endüstrisi atıkları (çekirdek)	MISPE	KAT, EKAT, KLA, GA, KUE	ACN:DMSO (%1, h/h)	2,89	

Blahavo ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, ACN ortamında fonksiyonel monomer olarak AA, çapraz bağlayıcı olarak EDMA' nın kullanıldığı 1:5:25 mol oranına sahip kateşin baskılı ve baskısız polimerler bulk polimerizasyonuna göre sentezlenmiştir. Sentezlenen kateşin baskılı polimerler ile organik yeşil çay ekstraktlarından kateşin ve türevlerinin seçimli ayrımı için MISPE uygulaması gerçekleştirilmiş, örnekler HPLC ile analiz edilmiştir. KAT-MIP ile yeşil çay ekstraktından kateşin % 95 verimle, epikateşin ise % 77 verimle geri kazanılmıştır. GC, EGC, EGCG, ECG, GCG'ın ise adsorplama kapasiteleri oldukça düşük bulunup yüzde verimleri % 10'u geçmemiştir (Blahová ve diğ., 2004).

Jin ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, kateşin ve bazı kateşin türevleri (EKAT, EGCG) kateşin baskılı polimer sentezlenip MISPE basamakları uygulanarak yeşil çaydan ekstrakte edilmişlerdir. Monomer olarak AA, çapraz bağlayıcı olarak EDMA, başlatıcı olarak AIBN kullanılarak ACN ortamında 1:5:30 mol oranına sahip KAT-MIP ve NIP bulk polimerizasyonu metoduna göre sentezlenmiştir. KAT-MIP ile KAT, EKAT ve EGCG' ın seçimli ayrılması gerçekleştirilmiştir (Jin ve diğ., 2011).

López ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada, porojen çözücü olarak Aseton:ACN (3:1 h/h) çözücü karışımı, fonksiyonel monomer olarak 4-VP ve çapraz bağlayıcı olarak EDMA kullanılarak 1:4:20 mol oranına sahip KUE-MIP ve NIP termal polimerizasyon metodu ile sentezlenmiştir. Sentezlenen KUE-MIP ile kateşinlerin ön derişiklendirilmesi hedeflenmiştir. KUE-MIP ile KUE, KAT, EKAT ve EGCG için seçimlilik denemeleri yapılmış ve en iyi adsorpsiyon kapasitesi KAT ve EKAT için bulunmuştur (López ve diğ., 2012).

Ding ve ekibinin yaptıkları çalışmada aseton ortamında monomer olarak AA ve çapraz bağlayıcı olarak EDMA kullanılarak 1:5:50 mol oranında EKAT-MIP ve NIP bulk polimerizasyon metoduna göre sentezlenmiştir. EKAT-MIP ile çay ekstraktlarına MISPE uygulanmış ve EKAT, % 95 verimle geri kazanılmıştır (Ding ve diğ., 2006).

Chen ve çalışma arkadaşları EGCG'ın seçimli ayrımı için fonksiyonel monomer olarak biyoyumlu kitosan ve çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit kullanarak EGCG-MIP sentezlemişlerdir. EGCG-MIP'in moleküler tanıma kabiliyeti HPLC ile hesaplanmış ve en yüksek baskılama faktörü 1,32 bulunmuştur. EGCG, EGCG-MIP ile içeriğinde EKAT, EGC ve ECG de bulunan ham çay ekstraktından % 90 verimle geri kazanılmıştır (Chen ve diğ., 2012).

Sun ve arkadaşları yeşil çay ekstraktlarından EGCG ayırmak için monolitik baskılama metodu ile EGCG-MIP (1:6:18, mol oranı) tasarlamışlardır. Fonksiyonel monomer olarak AA, çapraz bağlayıcı olarak EDMA, çözücü olarak THF:ISO (7:3, h/h) çözücü karışımı kullanılmıştır. EGCG-MIP monolit için baskılama faktörü 9,67 olarak hesaplanmış ve EGCG, ham yeşil çay ekstraktından % 87 verimle ayrılmıştır (Chen ve diğ., 2015).

1:7:25 mol oranındaki EGCG, ECG ve GCG baskılı ve baskısız polimerler Haginaka ve araştırma grubu tarafından çok adımlı şişme polimerizasyon metodu ile sentezlenmiştir. Polimer sentezi için, monomer olarak 2-VP, çapraz bağlayıcı olarak EDMA ve porojen çözücü

olarak sikloheksanol kullanılmıştır. Her bir baskılı polimer en yüksek tanıma özelliğini kendi kalıp molekülüne karşı göstermiştir. Ayrıca GC-MIP ile yeşil çay ekstraktlarından EKAT, EGC'nin izolasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir (Haginaka ve diğ., 2007)

2.4. ÜZÜM

Üzüm eski Roma ve Yunan medeniyetlerinden günümüze uzanan derin tarihe sahip bir meyvedir. Günümüzde üç çeşit üzüm türü bulunmaktadır; Avrupa üzümleri (*vitis vinifera*), kuzey Amerika üzümleri (*vitis labrusca* ve *vitis rotundifolia*) ve Fransız melezleridir. Sofralık üzümler kendi içinde şaraplık üzümler, kurutulmuş üzümler ve çekirdekli veya çekirdeksiz üzümler olarak sınıflandırılır. İnsanlar üzümleri meyve, meyve suyu ve şarap olarak tüketirler (Xia ve diğ., 2010).

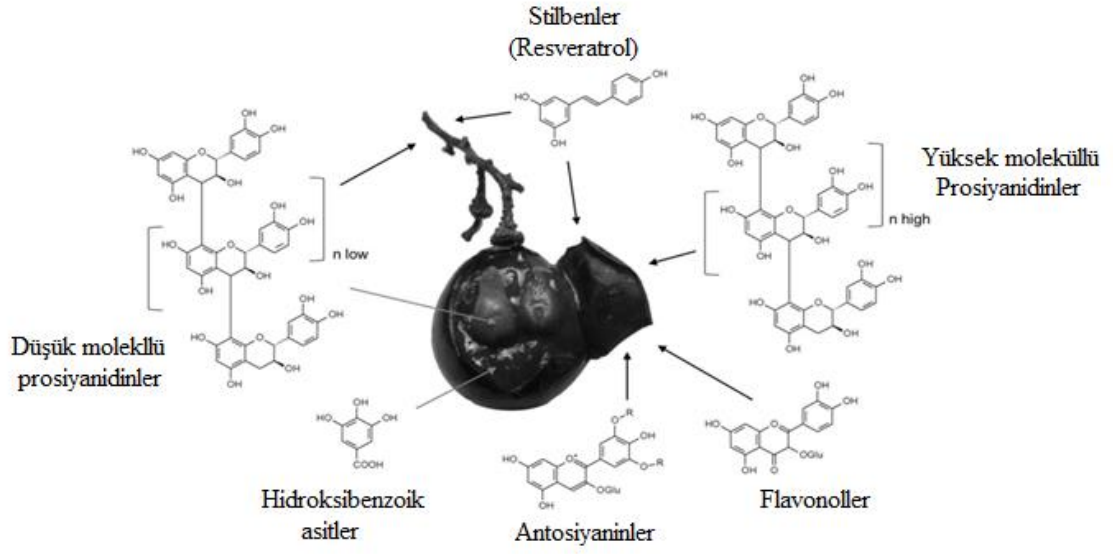
Türkiye’de bölgelere göre üzüm üretimi; Ege Bölgesinde çekirdeksiz kuru üzüm, Marmara bölgesinde sofralık ve şaraplık, Akdeniz bölgesinde turfanda, Orta Anadolu ve güneydoğu Anadolu bölgesinde şaraplık, şıralık, sofralık, çekirdekli kurutmalık üzüm olarak dağılım göstermektedir (Sırlı ve diğ., 2015).

Üzüm, vitaminler, mineraller, karbonhidratlar, yenilebilir lifler ve fitokimyasalları içinde barındıran besin değeri oldukça yüksek bir meyvedir. Besin içeriği yüksek olması nedeniyle dünyada üretim ve tüketimi en çok olan meyvelerden biridir (Rockenbach ve diğ., 2011). Dünya genelinde yıllık üzüm üretimi 68 milyon ton iken bunun 38 milyon tonu işlenmektedir. Şarap ve meyve suyu endüstrisinden yıllık ortalama 2.5 milyon ton atık ortaya çıkmaktadır (Newshehri ve diğ., 2015). Oluşan bu atıkların değerlendirilmesi, sürdürülebilir tarımsal uygulamalara katkıda bulunulmasına yardımcı olması nedeniyle oldukça önemlidir. Bu atıklar, hayvan yemi olarak, yakıt üretiminde ve fonksiyonel gıda üretiminde kullanılmaktadır (Martins ve diğ., 2016).

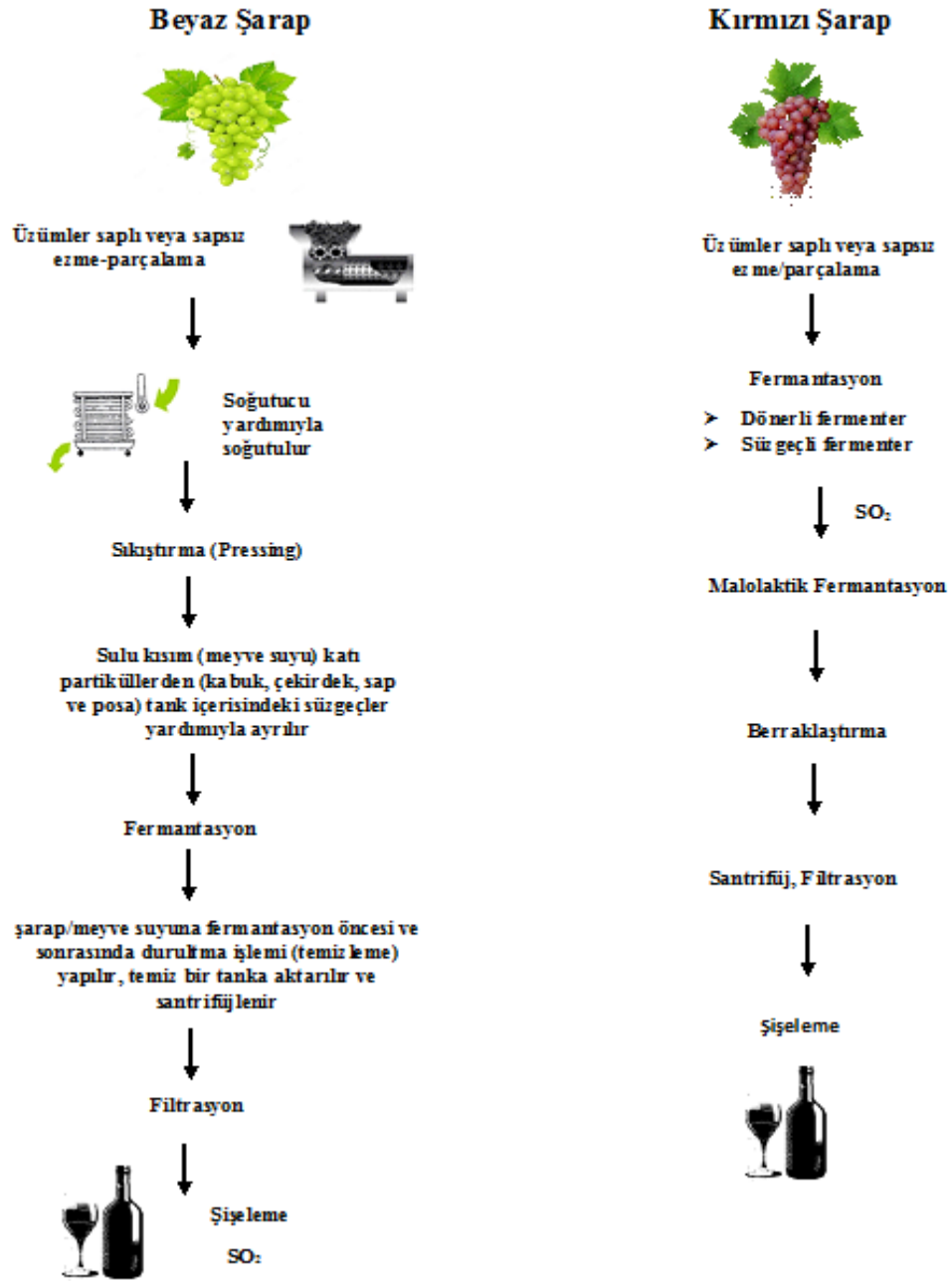
Fenolik bileşikler, üzümdeki en önemli fitokimyasallardır. Bu fenolik bileşiklerin çoğu antioksidan özellikleriyle insan sağlığına yararlı etki gösterirler. Fransız toplumunun Amerikan toplumuna nazaran daha fazla doymuş yağ tüketmelerine karşın kalp-damar hastalıklarına bağlı ölüm oranının düşük bulunması yani ‘Fransız paradoksu’, şarap ve üzümdeki fenolik bileşiklerin bazı dejeneratif hastalıkları, kalp–damar hastalıkları, kanser türleri ve plazmadaki oksidatif stresi azaltıcı ve yavaşlatıcı etki gösterdiğinin kanıtlanmasıyla açıklanmıştır (Xia ve diğ., 2010; Aceto ve diğ., 2014).

Üzümdeki fenolik madde içeriği ve miktarı üzümün çekirdek, kabuk, sap ve etli kısımlarında farklılık göstermektedir (Şekil 2.19). Üzümün fenolik madde miktarı en az olan bölümü etli kısım olan meyvenin öz kısmıdır ve flavonoid olmayan polifenollerden oluşur. Fenolik madde miktarı daha fazla olan kabuk ve çekirdek kısmı, şarap üretimi sırasında atık olarak açığa çıkmaktadır (Şekil 2.20). Şarap üretiminden kalan bu ürünler antioksidan bileşiklerin ekstraksiyonu için ucuz bir kaynak oluşturmaktadır ki bu, ekonomik açıdan önemli bir avantajdır.





Şekil 2.19: Üzüm çekirdek, kabuk, meyve ve sap kısmında bulunan fenolik bileşiklere örnekler.



Şekil 2.20: Beyaz ve kırmızı üzüm üretim şeması (Pretorius, 2000).

Üzüm çekirdeği, başlıca %40 lif, %16 esansiyel yağ, %11 protein, %7 fenolik bileşik ve geri kalan kısmı ise şeker, mineral ve diğer bileşiklerden oluşmaktadır (Rockenbach ve diğ., 2001). Çekirdek üzümün en zengin kısmıdır ve başlıca gallik asit, flavan 3-oller (kateşin, epikateşin vb.) ve prosiyanidin polimerleri bulunur. Bu fenolikler, buruk tat, sertlik ve şarabın yapısından sorumludurlar (Montealegre ve diğ., 2005).

Üzüm kabuğu, antosiyanin ve antosiyanidin, flavonoller (kuersetin, mirisetin vb.) ve resveratrol bakımından oldukça zengindir. Bu bileşikler üzüm ve şaraptaki tadın keskinliğine katkıda bulunurlar. Antosiyaninler, özellikle kırmızı üzüm ve şaraptaki renkten sorumludurlar. Antosiyaninler, daha kararlı pigmentler oluşturmak için flavonollerle tepkimeye girebilir. Kırmızı üzüm türleri şarap kalitesinde daha etkili olduklarından beyaz üzüm, kabuklarından fermente edilmez.

Ayrıca şarap endüstrisinde fermantasyon işleminden önce üzümün tamamen uzaklaştırılan sap kısımları da proantosiyanin ve stilbenlerce zengindirler.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. CİHAZ VE MALZEME LİSTESİ

- Waters Breeze 2 Model HPLC cihazı (Milford, MA, USA): 1525 model ikili pompa, termostatl kolon fırını, 2998 model fotodiyot dizisi dedektör (PDA) (Chelmsford, MA, USA), Hamilton marka 50 µl-şırınga, ZORBAX Eclipse XDB-C18analitik kolon (4.6 mm×250 mm, 5 µm) (HPLC analizleri için)
- Cary UV-Vis spektrofotometre (Müllheim, Germany), absorbans ölçümleri ve spektrum çizimleri için; HELMA marka 10 mm ışıma yollu bir çift kuartz küvet;
- Hamilton marka (Bonaduz, Switzerland)1 mL'lik ve 3 mL'lik boş katı faz ekstraksiyon kartuşları,
- Diaphragm vakum pompası ve Agilent (Waldbronn, Germany) 12 port katı faz ekstraksiyon sistemi (katı faz ekstraksiyon işlemleri için),
- Millipore Simpак 1 Synergy 185 bidistile su sistemi (France),
- Select BioProduct marka girdap karıştırıcı (çözeltileri karıştırmak için),
- Biosan OS-20 orbital çalkalayıcı (Latvia), kesikli temas (batch) testleri için; çalkalayıcı,
- Shimadzu ATX224 analitik terazi (Philippines)
- Bandelin Sonorex ultrasonik banyo (Berlin, Germany),
- BUCHI marka döner buharlaştırıcı (Flawil, Switzerland),

3.2. KİMYASAL MADDELER

Deneyler sırasında kullanılan kimyasal maddeler; Gallik asit (GA), (+) kateşin hidrat (KAT), (-) epikateşin (EKAT), kuersetin hidrat (KUE), klorojenik asit (KLA), asetonitril (ACN), aseton, asetik asit, 2,2'- azobisizobütironitril (AIBN), etilenglikol dimetakrilat (EDMA), dimetilsülfoksit (DMSO), %37'lik hidroklorik asit (HCl), metanol (MeOH), metakrilik asit (MAA), o-fosforik asit (o-H₃PO₄), sodyum sülfat, 4-vinilpiridin (4-VP), tetrahidrofuran (THF).

3.3. ŞARAP ENDÜSTRİSİ ATIKLARINDAN FENOLİK BİLEŞİK EKSTRAKTLARININ HAZIRLANMASI

Kırmızı ve beyaz olmak üzere iki farklı üzüm çeşidine ait üzüm cibresi (atığı) Doluca Bağcılık ve Şarapçılık A.Ş.'nin Tekirdağ'daki üretim tesisinden 2015 yılı eylül ayında temin edildi.

Bu atıklardan elle ayrılan üzüm çekirdekleri freeze-dryer'da -40°C'de yaklaşık 24-48 saat süreyle dondurularak kurutulduktan sonra porselen havanda ince toz haline gelinceye kadar öğütüldü.

Dondurularak kurutulmuş beyaz üzüm çekirdekleri % 50 ve % 70 MeOH (h/h) çözeltileri ile ekstrakte edildi. Bu amaçla; 15 g örnek, önce çözücünün 20 mL'si ile 30 dakika, ikinci bir 20 mL'si ile yine 30 dakika ve daha sonra 10 mL'si ile 30 dakika ultrasonik banyoda ağızları kapalı cam erlenler içinde üç kademede ekstrakte edildi. Bu üç ekstrakt bir araya getirilerek son hacim 50 mL'ye tamamlandı. Ekstraktlar önce siyah bant süzgeç kağıdından daha sonra GF/PET (Glass fiber/polietilentereftalat) 1,0/ 0,45 µm'lik enjektör uçlu mikrofiltreden geçirildi. Üzüm ekstraktlarındaki su ve metanol içeriği polimerin polifenollerini adsorplamasını engelleyeceği için ekstraktlar, tamamen kuruyuncaya kadar döner buharlaştırıcıda 30°C'de uçuruldu. Daha sonra 10 mL ACN:DMSO (99:1, h/h) çözücü karışımı ile çözüldü. Analize kadar derin dondurucuda saklandı.

Dondurularak kurutulmuş kırmızı üzüm çekirdekleri de (20 g), % 50 ve % 70 (h/h) MeOH çözeltileri ile aynı şartlarda ekstrakte edilmiştir. Tamamen kuruyuncaya kadar döner buharlaştırıcıda 30°C'de uçurulduktan sonra 5 mL ACN:DMSO (99:1, h/h) çözücü karışımı ile çözüldü. Analize kadar derin dondurucuda saklandı.

Çekirdeklerin ayrılması sonrası kalan çoğunlukla kabuktan oluşan şarap endüstrisi atıklarından, beyaz üzüm kabuğundan 3 g, kırmızı üzüm kabuğundan 4 g tartılarak % 50 ve % 70 MeOH (h/h) ile üzüm çekirdekleri ile aynı şartlarda ekstrakte edildi.

3.4. UYGULANAN YÖNTEMLER

3.4.1. Fenolik Bileşiklerin Analizi için HPLC Yönteminin Geliştirilmesi

Şarap endüstrisi atıklarındaki çekirdeklerde bulunan fenolik bileşiklerin HPLC’de ayrımını gerçekleştirmek için hareketli faz olarak Metanol (A) ve % 0,2 o-H₃PO₄ içeren bidistile suyun (B) kullanıldığı gradient elüsyon sistemi geliştirilmiştir.

Akış hızı 1 mL dak⁻¹, dedeksiyon (belirleme) dalga boyu 280 nm’ dir.

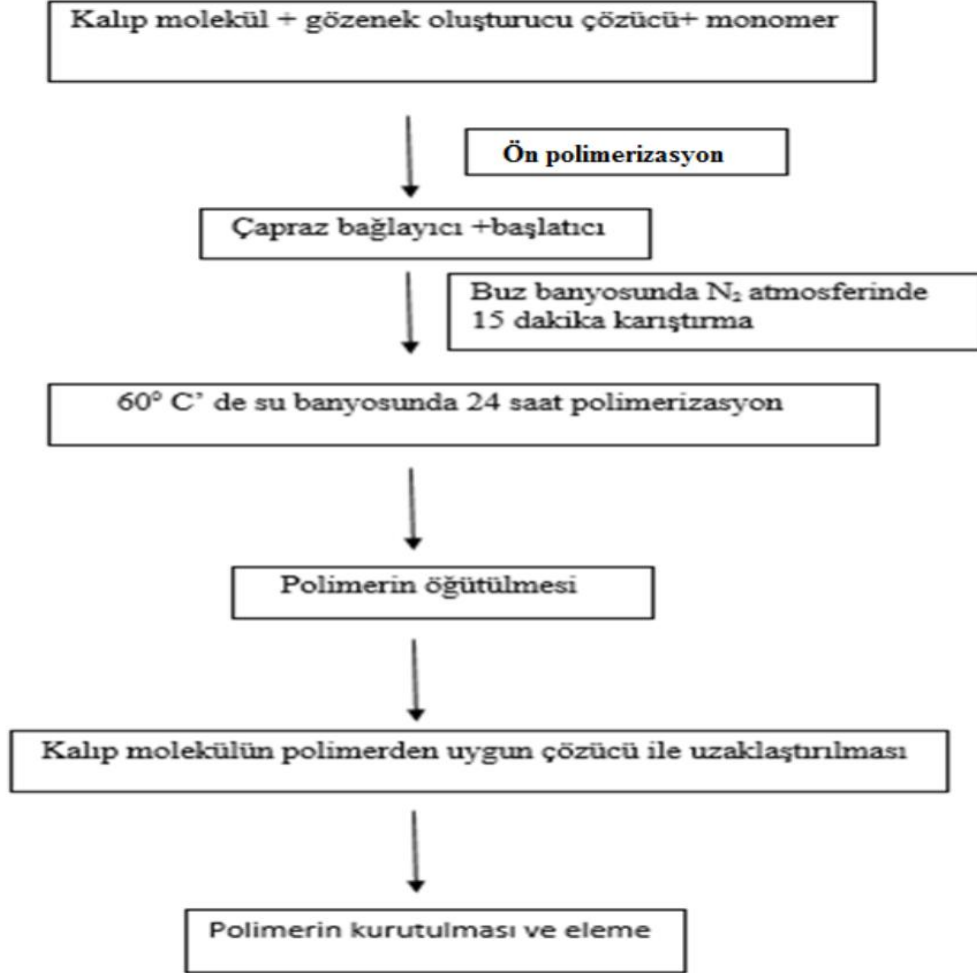
Tablo 3.1: Kırmızı ve beyaz üzüm çekirdeği ekstraktlarındaki bileşenlerin analizi için geliştirilen HPLC metodu.

Zaman (dak)	% A	%B	Eğim
0-3	5	95	6
3-5	20	80	6
5-7	25	75	6
7-9	30	70	6
9-11	35	65	4
11-16	80	20	6
16-30	100	0	6

3.4.2. Moleküler Baskılı Polimer Sentezleri

Bu çalışmada şarap endüstrisi atıklarından elde edilen kırmızı ve beyaz üzüm çekirdeklerinde bulunan kateşin ve türevlerinin seçimli ayrımını sağlayabilmek için kateşin baskılı (KAT-MIP) polimerler sentezlendi. Kateşine (KAT) özgü polimerler, uygun çözücü ortamında farklı kalıp

molekül:monomer:çapraz bağlayıcı mol oranlarında non-kovalent yığın polimerizasyonuna göre sentezlenmiştir. Ayrıca tüm baskılı polimerle aynı koşullarda baskısız polimerler (NIP) sentezlendi.



Şekil 3.1: MIP sentezi genel şeması.

3.4.2.1. Uygun Monomerin Belirlenmesi

Fonksiyonel monomer olarak MAA ve 4-VP seçilip her biri ile ayrı ayrı KAT baskılı ve baskısız polimerler sentezlendi. Örneğin; 1:4.20 oranında KAT baskılı polimeri sentezlemek için 0,744 mmol kateşin kapaklı bir tüp içerisinde 12 mL asetonitril dimetilsülfoksit (ACN:DMSO) (98:2, h/h) çözücü karışımı ile çözüldükten sonra 2,976 mmol monomer ilave edilip N₂ (g) altında 10 dakika karıştırılarak ön polimerizasyon gerçekleştirildi. Daha sonra 14,88 mmol çapraz

bağlayıcı (EDMA) ve 0,02 g başlatıcı (AIBN) eklenip buz banyosunda 15 dakika daha N_2 (g) geçirildi. Bu işlemlerden sonra tüpün ağzı kapatılarak 60°C su banyosunda 24 saat bekletilerek polimer sentezleme işlemi tamamlandı. Sentezlenen polimer tüpten alınarak bir havan yardımıyla toz haline getirildi. Toz haline getirilen polimer içerisindeki kalıp molekülü (KAT) uzaklaştırmak için 30 mL MeOH:HAc (9:1, h/h) çözücü karışımı ile UV spektrometresinde kateşin absorbansı görülmeyinceye kadar çalkalayıcı yardımı ile defalarca yıkandı. Daha sonra asitliği gidermek için de MeOH ile yıkandı. Yıkanan polimerler 50°C de vakumlu etüvde kurutularak kullanıma hazır hale getirildi. Baskısız polimerler (NIP) içinde aynı sentez işlemi kalıp molekül kullanılmadan uygulandı.

3.4.2.2. Uygun Gözenek Oluşturucu Çözücünün Belirlenmesi

KAT-MIP için en uygun monomer olarak 4-VP belirlendikten sonra aseton, THF ve ACN:DMSO (98:2, h/h) gözenek oluşturucu (porojen) çözücüleri kullanılarak 1:4:20 oranındaki polimer sentezlendi ve bu polimerlerden 30'ar mg tartılarak batch (kesikli temas) adsorpsiyon testi uygulanarak en uygun çözücü belirlendi.

3.4.2.3. Uygun Kalıp Molekül: Monomer: Çapraz Bağlayıcı Oranının Belirlenmesi

KAT-MIP sentezlerinde farklı kalıp molekül: monomer: çapraz bağlayıcı mol oranları kullanılarak (1:4:20, 1:5:25) 4-VP monomeri ve ACN:DMSO (98:2, h/h) çözücü karışımıyla KAT baskılı ve baskısız polimerler sentezlendi. Mol oranları ile batch (kesikli temas) testi sonucunda elde edilen adsorplanan kateşin miktarları karşılaştırılarak en uygun mol oranına karar verildi.

3.4.3. Moleküler Baskılı Polimerlerde Kalıp Molekülün Geri Bağla(n)ma Büyüklüklerinin İncelenmesi

3.4.3.1. Geri Bağla(n)maya Zaman Etkisi

1:4:20 KAT-MIP polimerlerinden 6 ayrı tübe 30'ar mg tartılıp üzerine ACN-DMSO (99:1, h/h) çözücü karışımında hazırlanan 400 μ M KAT çözeltisinden 4'er mL ilave edilerek 1, 2, 4, 6, 18 ve 24 saat oda sıcaklığında (200 rpm) çalkalandı. Süzüntüler 1.0/0.45 μ m'lik GF/PET mikrofiltrelerden geçirilerek adsorplanan kateşin miktarları, 280 nm dalga boyundaki

absorbanslarından yararlanılarak belirlendi. Zamanla adsorplanan KAT miktarı arasında çizilen grafikten optimum adsorpsiyon süresine karar verildi.

3.4.3.2. Geri Bağla(n)maya Çözücü Etkisi

1:4:20 KAT-MIP ve NIP'den 30'ar mg tartılıp üzerine ACN ve ACN-DMSO (98:2, 99:1 h/h) çözücü karışımlarında hazırlanan 1000 μ M kateşin çözeltilerinden 4'er mL ilave edilerek oda sıcaklığında 2 saat (200 rpm) çalkalandı. Süzüntüler 1.0/0.45 μ m'lik GF/PET enjektör uçlu mikrofiltrelerden geçirilerek adsorplanan KAT miktarları, 280 nm dalga boyundaki absorbanslarından yararlanılarak hesaplandı. Adsorplanan kateşin miktarlarından yararlanılarak en uygun adsorpsiyon çözücüsüne karar verildi.

3.4.3.3. Geri Bağla(n)maya Kalıp molekül Derişimi Etkisi

KAT-MIP'lerde geri bağla(n)maya KAT derişimi etkisini incelemek için; 1:4:20 mol oranındaki MIP ve NIP'lerden 100'ar mg alınıp üzerlerine ACN:DMSO (99:1, h/h) çözücü karışımında hazırlanan farklı derişimlerdeki KAT çözeltilerinden 4'er mL ilave edildi. 2 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda 200 rpm'de çalkalandı ve 1,0/0,45 μ m'lik GF/PET enjektör uçlu mikrofiltreden geçirilerek elde edilen süzüntülerdeki KAT miktarı UV spektrumlarıyla 280 nm dalga boyundaki absorbanslardan yararlanılarak belirlendi. Adsorplanan kateşin miktarlarından yararlanılarak polimerin doygunluğa ulaştığı derişim değerine ve polimerin adsorpsiyon kapasitesine karar verildi.

3.4.4. Moleküler Baskılı Polimerlerin Adsorpsiyon Özelliklerinin Belirlenmesi

3.4.4.1. Batch (Kesikli Temas) Adsorpsiyon Testi

KAT-MIP VE NIP'ler için farklı derişimlerde hazırlanmış KAT standartları ile batch (kesikli temas) adsorpsiyon testi uygulandı. 1:4:20 KAT- MIP ve NIP'den 100'er mg tartılıp üzerlerine ACN:DMSO (99:1, h/h) çözücü karışımında hazırlanmış 50-1000 μ M KAT standartlardan 4'er mL eklenerek 2 saat oda sıcaklığında (200 rpm) çalkalandı. Polimerler, 1,0/0,45 μ m'lik GF/PET enjektör uçlu mikrofiltreden geçirilerek elde edilen süzüntülerdeki KAT miktarı UV spektrumlarıyla 280 nm dalga boyundaki absorbanslardan yararlanılarak belirlendi.

3.4.4.2. Kolon Denemeleri

Üç mL'lik boş SPE kartuşun 200 mg 1:4:20 KAT-MIP ile doldurulmasıyla hazırlanan kolondan, ACN:DMSO (99:1, h/h) çözücü karışımında hazırlanmış 150 µM KAT çözeltisinin yaklaşık 0,2 mL dak⁻¹ akış hızıyla geçirilmesiyle gerçekleştirildi. KAT standardının kartuşa yüklenmesi işlemine polimer doygunluğa ulaşınca kadar (elüatlarda başlangıç derişimine ulaşınca kadar) devam edildi. Elüatlardaki KAT miktarı UV spektrumlarından yararlanılarak hesaplandı.

3.4.4.3. Seçimlilik Denemeleri

1:4:20 mol oranındaki KAT-MIP ve 0:4:20 mol oranındaki NIP için fenolik bileşiklerin seçimlilik denemeleri, KAT gibi flavonoidlerin flavanol sınıfından olan EKAT, flavonol sınıfından KUE, fenolik asitlerin hidroksisinnamik asit sınıfından KLA ve hidroksibenzoik asit sınıfından GA ile gerçekleştirilmiştir.

Bunun için, MIP ve NIP'lerden ayrı ayrı tüplere 50'şer mg tartılıp üzerlerine 4'er mL 700 µM fenolik bileşik çözeltilerinden ilave edilip 200 rpm'de 2 saat çalkayıcıda oda sıcaklığında çalkalanmıştır. Süzüntülerdeki fenolik bileşikler UV spektrumları alınarak maksimum absorplama yaptıkları dalgaboyunda (λ_{maks}: EKAT için, 280 nm; KUE için, 370 nm; KLA için, 320 nm; GA için, 280 nm absorpsanları okunmuştur.

3.4.5. Üzüm Çekirdeği Ekstraktları için Moleküler Baskılı Katı-Faz Ekstraksiyonu Uygulamaları

3.4.5.1. Beyaz Üzüm Çekirdeği Ekstraktı için KAT-MISPE Uygulaması

ACN varlığında kromatogramlardaki pikler düzgün olmadığı için MISPE uygulamasının her bir basamağından sonra örnekler N₂ gazı ile kuruluğa kadar buharlaştırıldıktan sonra % 50 MeOH ile çözülerek kromatografik analiz gerçekleştirildi.

Yükleme basamağı (0,2 mL dak⁻¹ akış hızı ile)

Buharlaştırıldıktan sonra ACN:DMSO (99:1, h/h) çözücü karışımında çözülmüş beyaz üzüm çekirdek ekstraktının 0,7 mL'si Na₂SO₄ ile nemi giderildikten sonra 10 mL ACN ile şartlandırılmış 50 mg 1:4:20 KAT-MIP içeren 3 mL'lik SPE kartuşa yüklendi.

Kartuştan çıkan yükleme sonrası çözelti HPLC'ye enjekte edilip, yükleme öncesi ve sonrası kromatogramlar karşılaştırıldı.

Yıkama basamağı (1 mL dak⁻¹ akış hızı ile)

Bu basamaktaki amacımız polimere spesifik olmayan şekilde tutunan kateşin dışındaki polifenollerin polimerin uygun çözücü ve/veya çözücü karışımlarıyla yıkanarak uzaklaştırılmasıdır.

- Yıkama 1= 1 mL ACN
- Yıkama 2= 1 mL ACN
- Yıkama 3= 1 mL bidistile H₂O
- Yıkama 4= 1 mL bidistile H₂O

Her bir yıkama basamağı HPLC ile analiz edildi.

Elüsyon basamağı (0,5 mL dak⁻¹ akış hızı ile)

Yükleme sonrasında polimerde spesifik olarak tutunan kateşin;

- Elüsyon 1= 1 mL MeOH: HAc (4:1, h/h)
 - Elüsyon 2= 0,5 mL MeOH:HAc (4:1, h/h) olmak üzere iki basamakta elüe edildi.
- Kromatogramlardan geri kazanılan KAT ve EKAT miktarı ve verim yüzdesi hesaplandı.

3.4.5.2. Kırmızı Üzüm Çekirdeği Ekstraktı için KAT-MISPE Uygulaması

Yükleme basamağı (0,2 mL dak⁻¹ akış hızı ile)

Buharlaştırıldıktan sonra ACN: DMSO (99:1, h/h) çözücü karışımında çözölmüş kırmızı üzüm çekirdek ekstraktının 1,5 mL'si Na₂SO₄ ile nemi giderildikten sonra 10 mL ACN ile şartlandırılmış 50 mg 1:4:20 KAT-MIP içeren 3 mL'lik SPE kartuşa,

Yıkama basamağı (1 ml dak⁻¹ akış hızı ile)

- Yıkama 1= 1 mL ACN
- Yıkama 2= 1 mL ACN
- Yıkama 3= 1 mL bidistile H₂O

- Yıkama 4= 1 mL bidistile H₂O
- Yıkama 5= 1 mL ACN:H₂O (1:99, h/h)
- Yıkama 6= 1 mL ACN:H₂O (2:98, h/h)
- Yıkama 7= 1 mL ACN:H₂O (3:97, h/h)
- Yıkama 8= 1 mL ACN:H₂O (4:96, h/h)
- Yıkama 9= 1 mL ACN:H₂O (4:96, h/h)
- Yıkama 10= 1 mL ACN:H₂O (5:95, h/h)

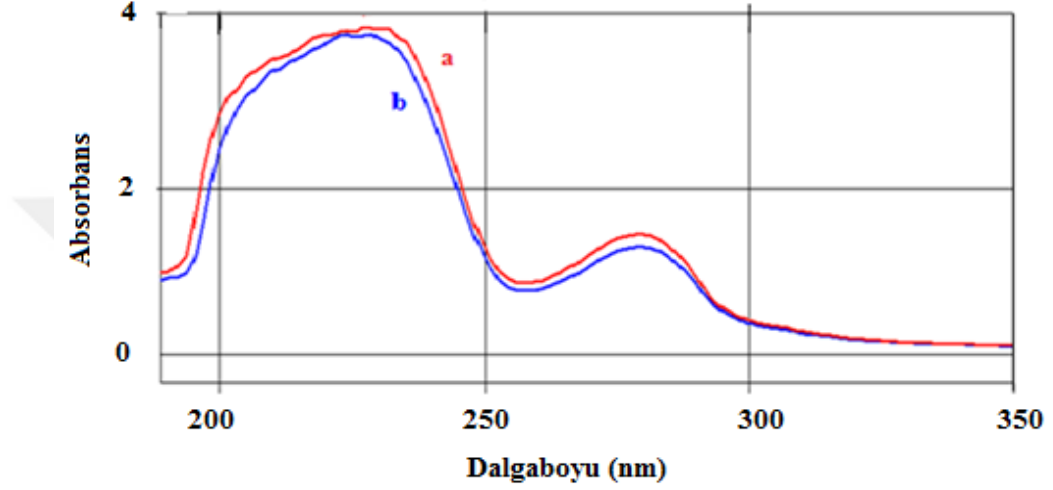
Elüsyon basamağı (0,5 mL dak⁻¹ akış hızı ile)

- Elüsyon 1= 1 mL MeOH:HAc (4:1, h/h)
- Elüsyon 2= 0,5 mL MeOH:HAc (4:1, h/h) olmak üzere iki basamakta elüe edilip, kromatogramdan geri kazanılan KAT, EKAT miktarı ve verim yüzdesi hesaplandı.

4. BULGULAR

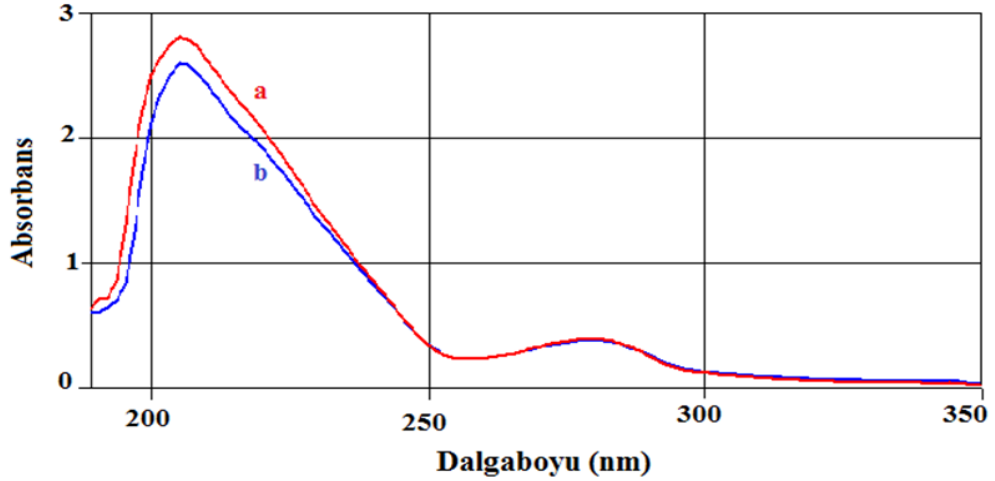
4.1. UYGUN EKSTRAKSİYON ÇÖZÜCÜSÜNÜN BELİRLENMESİ

Şekil 4.1 ve 4.2'deki spektrumlarda görüldüğü gibi hem kırmızı hem de beyaz üzüm çekirdeklerinin ekstraksiyonu için en uygun çözücü %50 MeOH, (h/h)'dür.



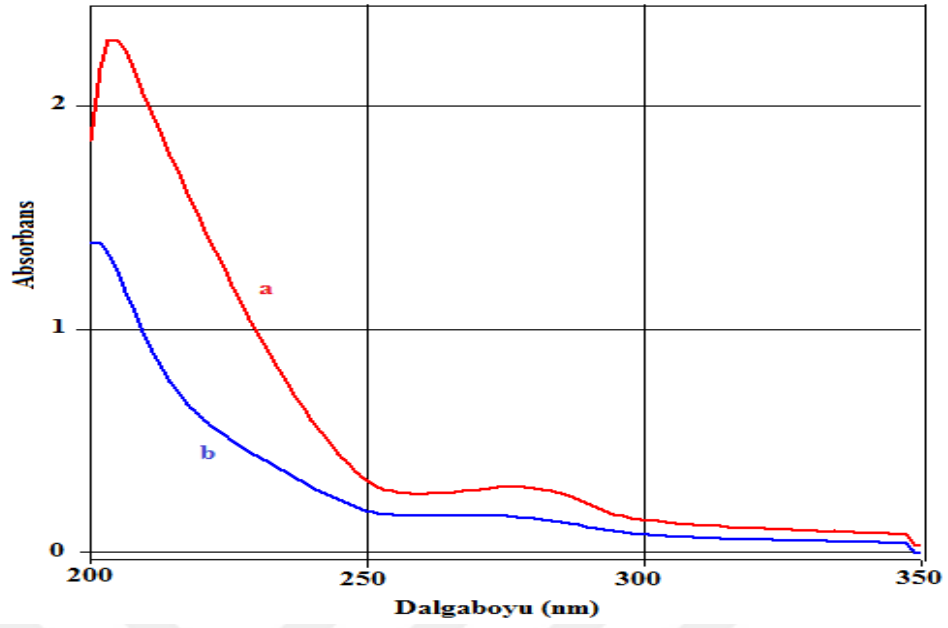
Şekil 4.1: Beyaz üzüm çekirdeği ekstraktı spektrumu (1:40 seyreltilmiş).

(a: %50 MeOH; b: %70 MeOH)



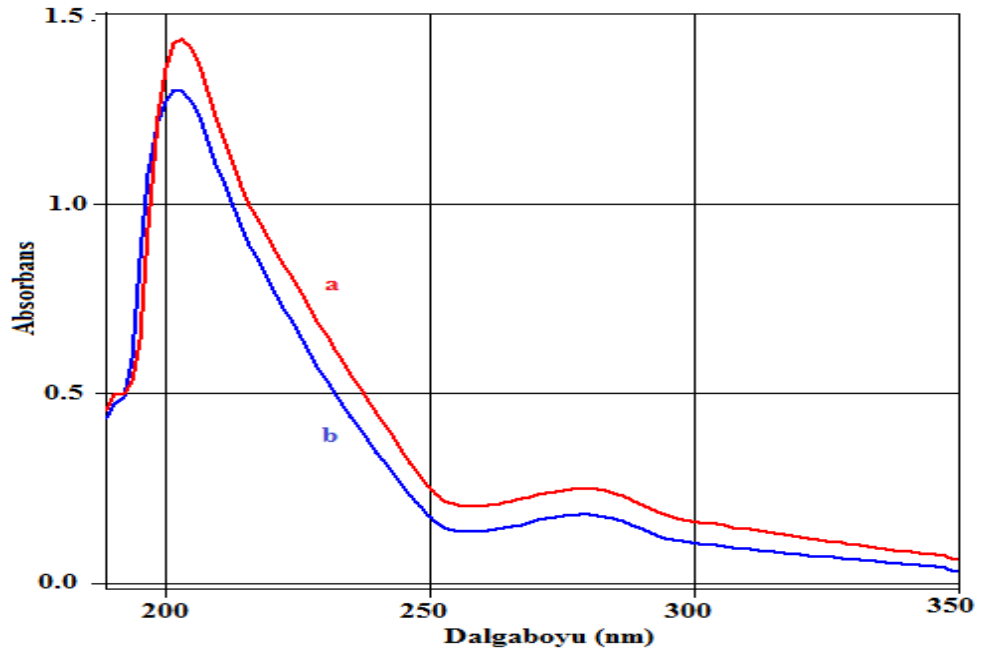
Şekil 4.2: Kırmızı üzüm çekirdeği ekstraktı spektrumu (1:40 seyreltilmiş).

(a: %50 MeOH; b: %70 MeOH)



Şekil 4.3: Beyaz üzüm kabuğu ekstraktı spektrumu (1:20 seyreltilmiş).

(a: %50 MeOH; b: %70 MeOH)



Şekil 4.4: Kırmızı üzüm kabuğu ekstraktı spektrumu (1:40 seyreltilmiş).

(a: %50 MeOH; b: %70 MeOH)

Beyaz ve kırmızı üzüm kabuğu ekstraktlarının Şekil 4.3 ve 4.4’de görülen spektrumlarından da aynı sonuca varılmıştır.

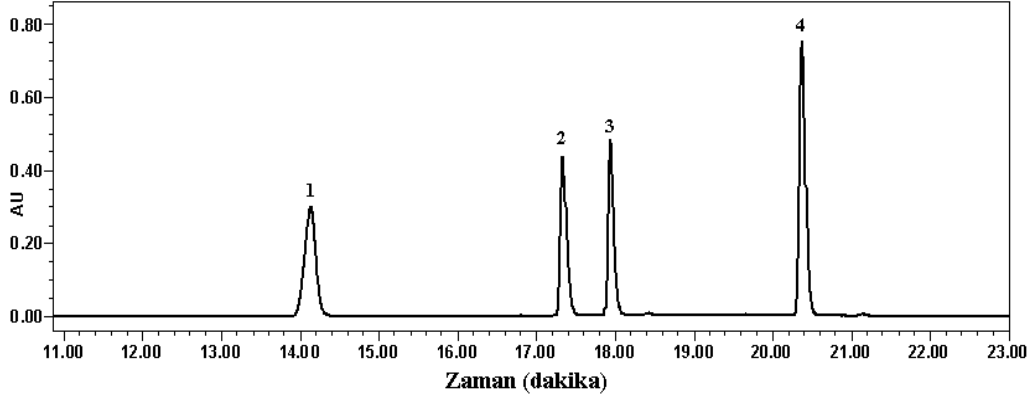
4.2. ÇALIŞILAN FENOLİK BİLEŞİKLERİN HPLC KALİBRASYONLARININ SONUÇLARI

Metanol (A) ve % 0,2 o-H₃PO₄ içeren bidistile su (B)’dan oluşan ikili hareketli faz sisteminin kullanıldığı gradient elüsyon metodu ile % 50 MeOH (h/h)’de hazırlanan KAT, EKAT, GA, KUE standartları ile kalibrasyon çalışması yapıldı. y eksenine pik alanları, x eksenine standart derişimleri (C) konularak doğrusal regresyon grafikleri çizilerek doğrusal regrasyon denklemleri hesaplandı. Denklemler, Tablo 4.1’de, standartlar karışımına ait kromatogram ise Şekil 4.5’de görölmektedir.

Tabloda, y: pik alanı, x: Milimolar derişim ve R: korelasyon (uyum) katsayısını ifade etmektedir.

Tablo 4.1: Çeşitli fenolik bileşiklerin HPLC verileri

Fenolik Bileşik	Doğru Denklemi	(R ²)	Doğrusal aralık (mol L ⁻¹)
Kateşin	$y=5,6 \times 10^6 x + 22$	0,9988	$5 \times 10^{-5} - 4 \times 10^{-4}$ M
Epikateşin	$y=5,7 \times 10^6 x + 24$	0,9988	$5 \times 10^{-5} - 4 \times 10^{-4}$ M
Gallik asit	$y=1,5 \times 10^7 x - 30$	0,9992	$1 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-4}$ M
Kuersetin	$y=1,1 \times 10^7 x + 140$	0,9982	$5 \times 10^{-5} - 4 \times 10^{-4}$ M



Şekil 4.5: Fenolik bileşik standartlarının HPLC kromatogramı.

4.3. KAT-MIP SENTEZİ İÇİN OPTİMİZASYON ÇALIŞMALARI

4.3.1. Uygun Monomerin Belirlenmesi

KAT baskılı polimer sentezinde en uygun monomeri belirleyebilmek için, ACN:DMSO (98:2, h/h) çözücü karışımında 1:4:20 kalıp molekül:monomer:çapraz bağlayıcı mol oranında MAA ve 4-VP olmak üzere iki farklı monomer kullanılarak baskılı ve baskısız polimerler sentezlendi. Bu polimerlerle 100 µM KAT kullanılarak yapılan adsorpsiyon (kesikli temas) denemeleri sonucunda MAA monomeri ile hazırlanan baskılı ve baskısız her iki polimerin de kateşini tutmadığı görüldüğünden 4-VP, uygun monomer olarak belirlendi. Bu monomerin KUE ve kafeik asit (KA) gibi fenolik bileşik baskılı polimer için uygun olduğunu gösteren çalışmalar literatürde yer almaktadır (Karaman Ersoy ve diğ., 2016; Pakade ve diğ., 2012, López ve diğ., 2012; Li ve diğ., 2013).

4.3.2. Uygun Gözenek Oluşturucu Çözücünün Belirlenmesi

Kateşin baskılı polimer sentezinde en uygun monomer olarak 4-VP belirlendikten sonra aseton, THF ve ACN:DMSO (98:2, h/h) gözenek oluşturucu (porojen) çözücüler kullanılarak 1:4:20 oranındaki polimer sentezlendi ve bunlara batch (kesikli temas) adsorpsiyon testi uygulanmıştır. Sonuçlar, Tablo 4.2’de görülmektedir.

Tablo 4.2: Farklı gözenek oluşturuvcu çözücüler kullanılarak sentezlenen 1:4:20 K:M:ÇB mol oranındaki KAT-MIP ve NIP' lerin karşılaştırılması.

Çözücü	Polimer	Adsorplanan Kateşin miktarı ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Baskılama Faktörü
ACN:DMSO (98:2, h/h)	1:4:20	2990	2,89
	0:4:20	1033	
Aseton	1:4:20	3176	1,99
	0:4:20	1591	
THF	1:4:20	Polimer oluşumu gözlenmedi.	Polimer oluşumu gözlenmedi
	0:4:20		

Bu sonuçlara göre ACN:DMSO (98:2, h/h) çözücü karışımının KAT baskılı polimer sentezi için en uygun gözenek oluşturuvcu çözücü olduğuna karar verildi.

4.3.3. Uygun Kalıp molekül:Monomer:Çapraz bağlayıcı Mol Oranının Belirlenmesi

Kateşin baskılı polimer sentezlerinde literatürde sıklıkla kullanılan iki farklı kalıp molekül:monomer:çapraz bağlayıcı mol oranında (1:4:20 ve 1:5:25) 4-VP monomeri ve ACN:DMSO (98:2, v/v) çözücü karışımıyla KAT baskılı ve baskısız polimerler sentezlendi. Tablo 4.3'te polimer mol oranları ile adsorplanan KAT miktarları karşılaştırıldı.

Tablo 4.3: Farklı K:M:ÇB molar bileşim oranlarındaki KAT-MIP ve NIP'lerin karşılaştırılması.

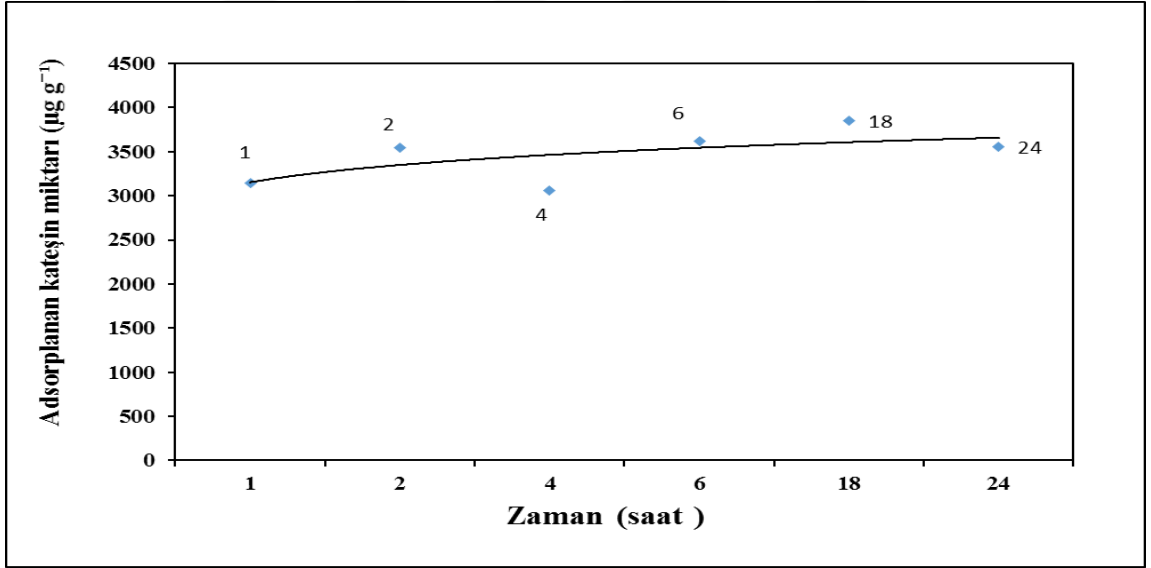
Mol oranı	Adsorplanan kateşin miktarı ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Baskılama Faktörü
1:4:20	2990	
0:4:20	1033	2,89
1:5:25	3258	
0:5:25	1942	1.67

1:4:20 kalıp molekül:monomer:çapraz bağlayıcı mol oranına sahip polimer, en yüksek baskılama faktörüne sahip olduğu için denemelerde bu polimerin kullanılmasına karar verildi. Bu oran çalışma grubumuzun KUE-MIP için belirlediği oranla aynıdır (Karaman Ersoy, 2016)

4.4. MOLEKÜLER BASKILI POLİMERLERDE KALIP MOLEKÜLÜN GERİ BAĞLA(N)MA BÜYÜKLÜKLERİNİN İNCELENMESİ

4.4.1. Geri Bağla(n)maya Zaman Etkisi

1:4:20 KAT-MIP polimerlerinden 6 ayrı tübe 30'ar mg tartılıp üzerine ACN:DMSO (99:1, h/h) çözücü karışımında hazırlanan 400 μ M KAT çözeltisinden 4'er mL ilave edilerek 1, 2, 4, 6, 18 ve 24 saat oda sıcaklığında (200 rpm) çalkalandı. Adsorplanan kateşin miktarları, 280 nm dalga boyundaki absorbanslarından yararlanılarak hesaplandı. Şekil 4.6' da görüldüğü üzere 2 saatte tutulmanın pratikte sabitlenmesi nedeniyle bu süre, uygun adsorpsiyon süresi olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.6: 1:4:20 KAT-MIP'e ait adsorpsiyon-zaman grafiği.

4.4.2. Geri Bağla(n)maya Çözücü Etkisi

1:4:20 KAT-MIP ve NIP'den 100'er mg tartılıp üzerine ACN ve ACN:DMSO (98:2, 99:1 h/h) çözücü karışımlarında hazırlanan 700 μ M kateşin çözeltilerinden 4'er mL ilave edilerek oda sıcaklığında 2 saat (200 rpm) çalkalandı. Adsorplanan KAT miktarları, süzüntülerin 280 nm

dalga boyundaki absorbanlarından yararlanılarak hesaplandı. Elde edilen verilere göre en yüksek adsorpsiyon ACN-DMSO (99:1, h/h) çözücü karışımıyla elde edildi.

Tablo 4.4: Farklı çözücü ortamlarında KAT adsorpsiyonunun karşılaştırılması.

Polimer	Çözücü	Adsorplanan Katesin miktarı ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Baskılama Faktörü
MIP	ACN	4928	1,99
NIP		2472	
MIP	ACN:DMSO (98:2, h/h)	3732	2,2
NIP		1741	
MIP	ACN:DMSO (99:1, h/h)	2990	2,89
NIP		1033	

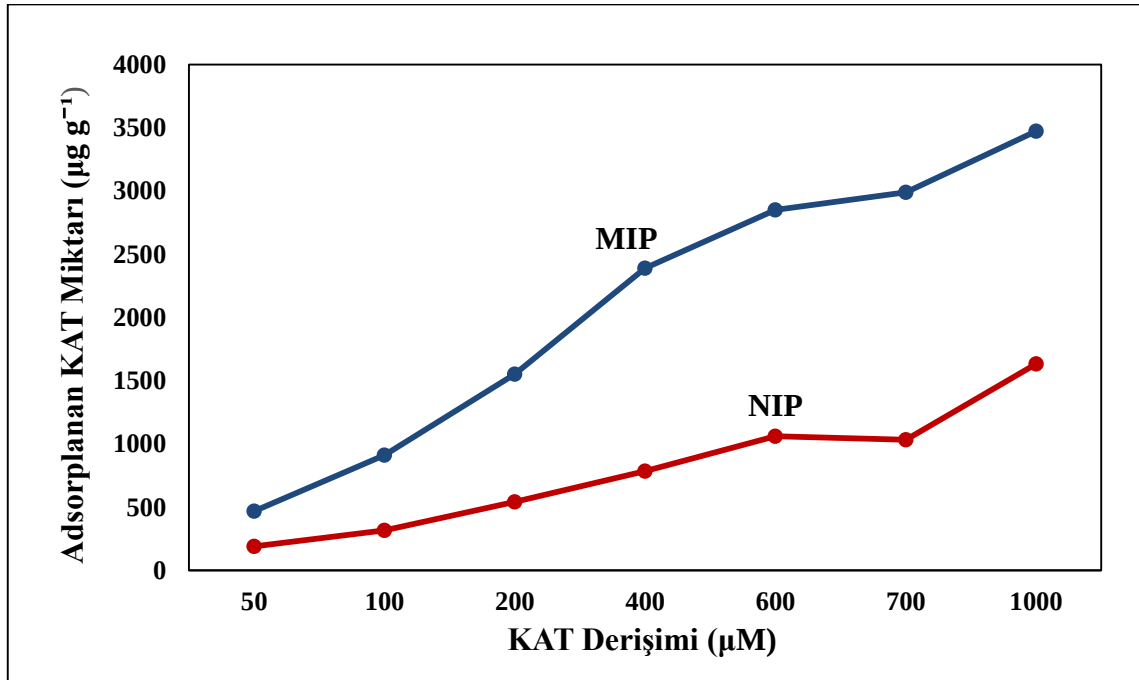
4.4.3. Geri Bağla(n)maya Kalıp Molekül Değişimi Etkisi

KAT miktarının polimerlerin tutma kapasitesine etkisini incelemek amacıyla farklı derişimlerde KAT (50-1000 μM) kullanılarak, sentezlenen 1:4:20 KAT-MIP ve 0:4:20 NIP polimerlerinden 100'er mg tartılarak batch (kesikli temas) adsorpsiyon testi uygulandı. Tablo 4.5'de KAT-MIP ve NIP için adsorplanan KAT miktarları ve baskılama faktörleri, Şekil 4.7'de derişime bağlı olarak KAT adsorpsiyonu grafiği görölmektedir.

Tablo 4.5: Farklı derişimlerde KAT çözeltilerinin MIP ve NIP’lerde adsorpsiyonu

Kateşin Miktarı (μM)	Adsorplanan Kateşin Miktarı ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Baskılama Faktörü
50	468 (190)*	2,46
100	911 (317)*	2,87
200	1551 (541)*	2,86
400	2391 (785)*	3,04
600	2850 (1060)*	2.68
700	2990 (1033)*	2,89
1000	3473 (1633)*	2,12

*Parantez içindeki değerler, NIP tarafından adsorplanan KAT miktarlarıdır.

**Şekil 4.7:** KAT-MIP ve NIP’e ait KAT derişimi-adsorplanan KAT miktarı grafiğı.

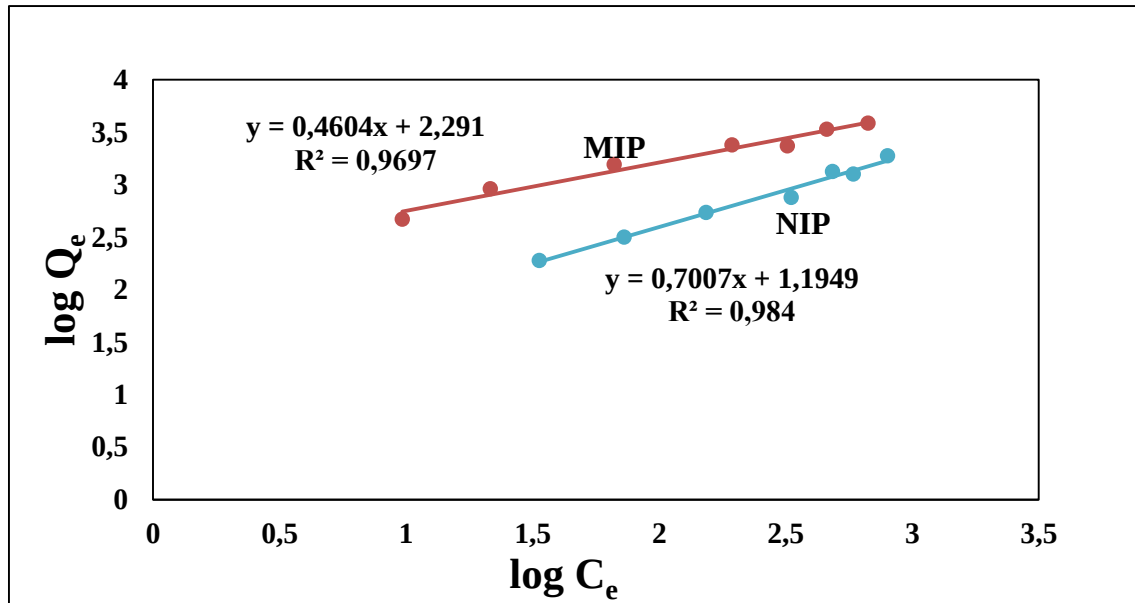
100 mg polimerle gerçekleştirilen bu denemelerin sonucunda 700 μM KAT derişimine kadar baskılama faktörü değerlerinde deney hatası kabul edilebilecek değişimler olurken, daha yüksek derişimde NIP'in tutma kapasitesinde gözlenen beklenmeyen artış nedeniyle baskılama faktöründe az da olsa düşüş gözlenmektedir. Bu şartlar altında en yüksek baskılama faktörü veren derişim, 400 μM olarak belirlenmesine rağmen 100-700 μM aralığının adsorpsiyon çalışmaları için uygun olduğu söylenebilir.

4.5. MOLEKÜLER BASKILI POLİMERLERİN ADSORPSİYON ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

4.5.1. Batch (Kesikli Temas) Adsorpsiyon Testi

KAT-MIP ve NIP'in adsorpsiyon özelliklerini belirlemek için Freundlich ve Langmuir adsorpsiyon izotermelerinden yararlanılmıştır.

KAT-MIP ve NIP için $\log C_e$ ve $\log Q_e$ değerleri arasında eşitlik (2.5)'e göre doğrusal Freundlich adsorpsiyon izotermi çizildi. Elde edilen doğrunun eğiminden $1/n$, kayım değerinden ise $\log K_f$ değerleri hesaplandı. Şekil 4.8'de KAT-MIP ve NIP'e ait Freundlich adsorpsiyon izotermeleri grafiği ve Tablo 4.6'da Freundlich adsorpsiyon izoterm değerleri verilmektedir.



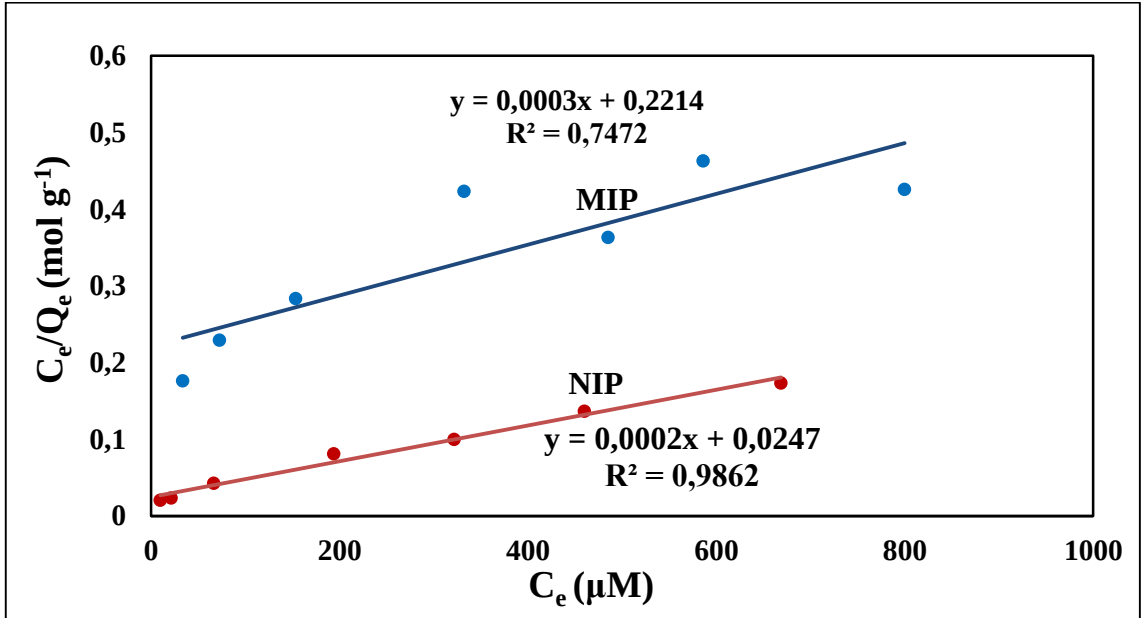
Şekil 4.8: KAT-MIP ve NIP için Freundlich adsorpsiyon izotermeleri.

Tablo 4.6: KAT-MIP ve NIP için Freundlich adsorpsiyon izotermi değerleri.

Polimer	Freundlich Sabitleri		
	K_f	n	R^2
MIP	195	2,17	0,9697
NIP	15,66	1,43	0,9840

Adsorpsiyonun yoğunluğunu ifade eden n sabitinin > 1 olarak bulunması ve uyum katsayılarının yüksekliği dikkate alınarak KAT baskılı polimerin Freundlich izotermine uyumlu olduğunu göstermektedir.

KAT-MIP ve KAT-NIP polimerleri kullanılarak eşitlik (2.7)'deki denkleme göre C_e ve C_e/Q_e değerleri arasında doğrusal Langmuir izotermi (Şekil 4.9) çizildi. Elde edilen doğrunun eğiminden Q_{maks} , kayım değerinden ise b değeri hesaplandı. KAT-MIP ve NIP'e özgü Langmuir adsorpsiyon büyüklükleri Tablo 4.7'de görülmektedir.

**Şekil 4.9:** KAT-MIP ve NIP için Langmuir izotermi.

Tablo 4.7: KAT-MIP ve NIP için Langmuir adsorpsiyon izoterm verileri.

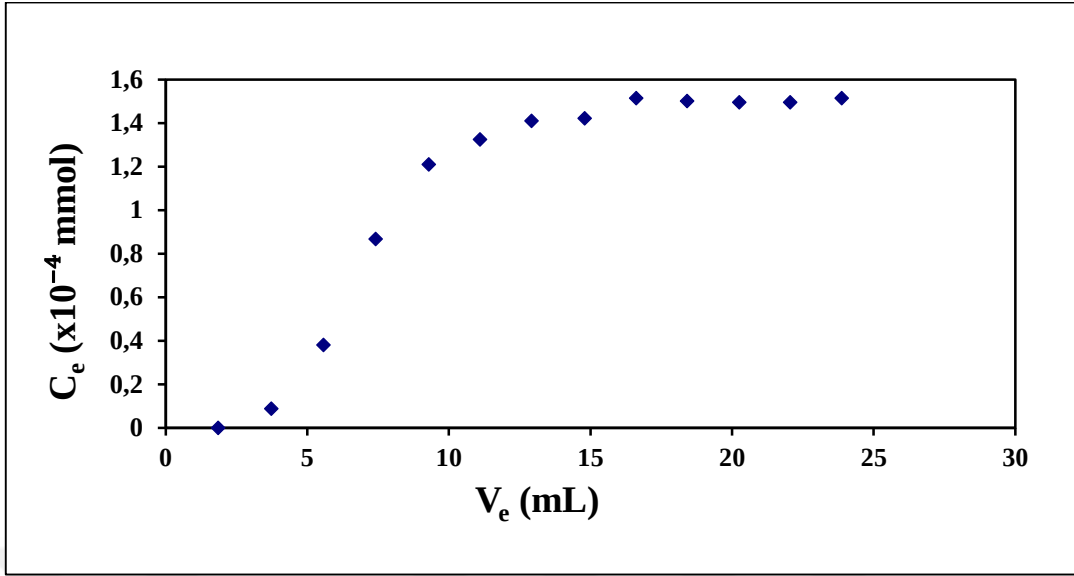
Polimer	Langmuir Sabitleri		
	$Q_{\max}$	b	R^2
MIP	5000	$8,01 \times 10^{-3}$	0,9862
NIP	3333	$1,35 \times 10^{-3}$	0,7472

R_L sabitinin (dağılma veya boyutsuz ayırma faktörü) <1 ($R_L = 0,72$) olarak bulunması ve uyum katsayılarının özellikle MIP için yüksekliği nedeniyle, KAT baskılı polimerin KAT adsorpsiyonuna Langmuir izotermine de uyumlu olduğunu söyleyebiliriz.

Yine de MIP’de her ne kadar analite seçimli bölgelerde tutulma olması bekleniyorsa da non spesifik etkileşimlerle polimerin diğer bölgelerinde de oluşan tutulmalar nedeniyle adsorpsiyonun tek tabaka adsorpsiyonuna dayanan Langmuir izoterminden ziyade heterojen adsorpsiyonu ifade eden Freundlich izotermine uygunluğunu kabul etmek daha gerçekçidir.

4.5.2. Kolon Denemeleri

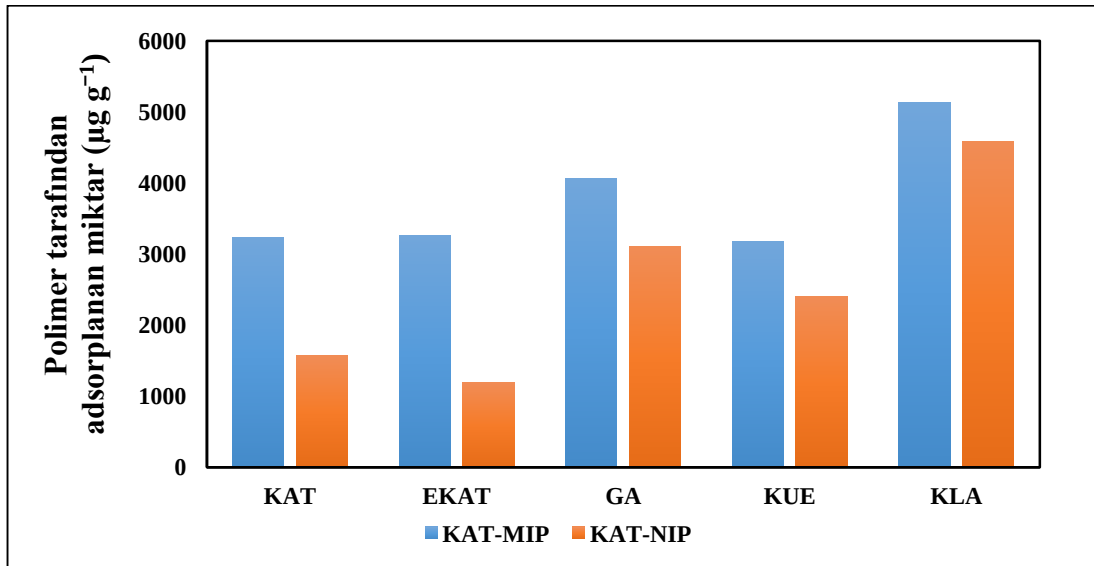
3 mL’lik boş SPE kartuşun 200 mg 1:4:20 KAT-MIP ile doldurulmasıyla hazırlanan kolondan, ACN:DMSO (99:1, h/h) çözücü karışımında hazırlanmış 150 μM KAT çözeltisinin yaklaşık 0,2 mL dak-1 akış hızıyla geçirilmesiyle gerçekleştirildi. Kolondan ayrılan çözelti derişiminin (C_e) dikey eksene, hacminin (V_e) ise yatay eksene yerleştirilmesiyle kopma (breakthrough) eğrisi (bkz. Şekil 4.10) çizildi. Bu eğrinin üstünün alanından polimerin dinamik tutma kapasitesi, $1,43 \times 10^{-3}$ mmol ($2075 \mu\text{g g}^{-1}$) olarak bulundu.



Şekil 4.10: 1:4:20 KAT-MIP için kopma (breakthrough) eğrisi.

4.5.3. Seçimlilik Denemeleri

1:4:20 KAT-MIP ve 0:4:20 NIP’de fenolik bileşiklerin seçimlilik denemeleri, 700 μ M derişimdeki KAT, EKAT, KUE, KLA ve GA çözeltileriyle gerçekleştirildi. Şekil 4.11’de fenolik bileşiklerin MIP ve NIP’ de adsorplanan miktarları gösterilmektedir.



Şekil 4.11: KAT-MIP ve NIP’de fenolik bileşiklerin adsorpsiyonunun karşılaştırılması.

Adsorplanan miktarlardan polimerin KAT seçimliliği EKAT, KUE, KLA ve GA'e göre hesaplanarak Tablo 4.8'de verilmiştir.

Tablo 4.8: KAT-MIP ve NIP'de farklı fenolik bileşiklerin baskılama ve seçimlilik faktörlerinin karşılaştırılması.

Fenolik Bileşik	Adsorplanan Madde Miktarı ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Baskılama Faktörü (BF)	Seçimlilik Faktörü
KAT	3237 (1571)	2,1	—
EKAT	3263 (1199)	2,7	0,77
GA	4066 (3108)	1,3	1,62
KUE	3172 (2406)	1,3	1,62
KLA	5135 (4587)	1,1	1,9

*Parantez içindeki değerler, NIP tarafından adsorplanan madde miktarlarıdır.

$$\text{Seçimlilik Faktörü (S)} = \text{BF}_{\text{MIP}} / \text{BF}_X \quad (4.1)$$

(Blahová ve diğ., 2004; López ve diğ., 2012; Spivak, 2005)

BF_X = Kalıp molekül (KAT) hariç, diğer fenolik bileşikler

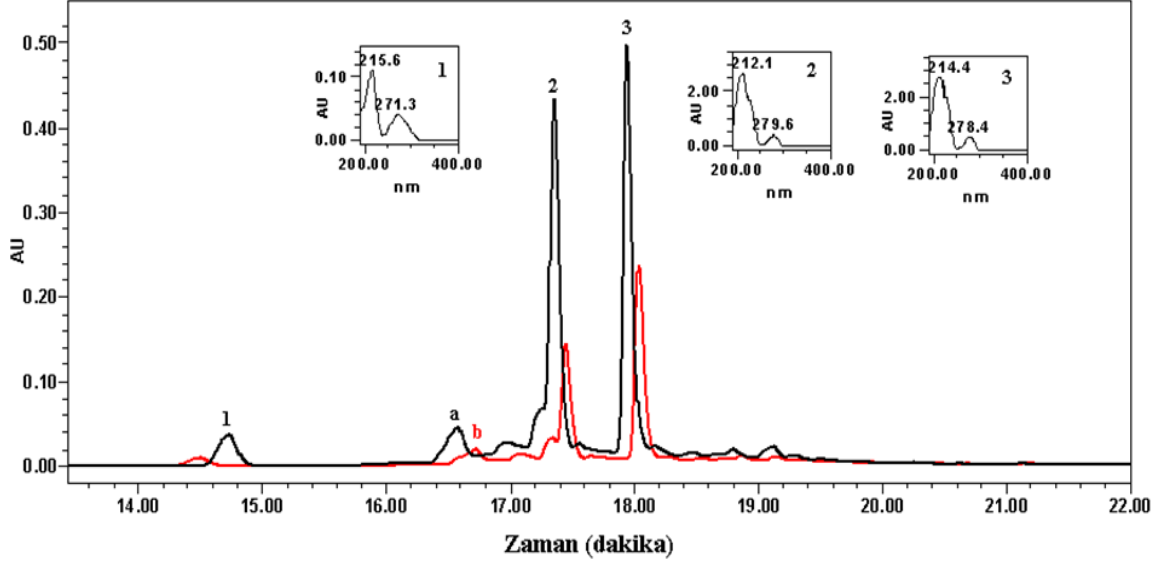
EKAT, KAT'nin izomeri olduğundan benzer miktarda adsorpsiyon ve seçimlilik faktörü gözlenmiştir. KUE, KLA ve GA'in ise MIP'de kalıba girmeden sadece yapılarındaki hidroksil grupları nedeniyle polimer yüzeyinde hidrojen bağı oluşturarak spesifik olmayan etkileşimlerle tutunduğu düşünülebilir. Belirlenen seçimlilik faktörleri de bunu doğrulamaktadır.

4.6. ÜZÜM ÇEKİRDEĞİ EKSTRAKTLARI İÇİN MOLEKÜLER BASKILI KATI FAZ EKSTRAKSİYONU UYGULAMALARI

4.6.1. Beyaz Üzüm Çekirdeği Ekstraktı için KAT-MISPE Uygulaması

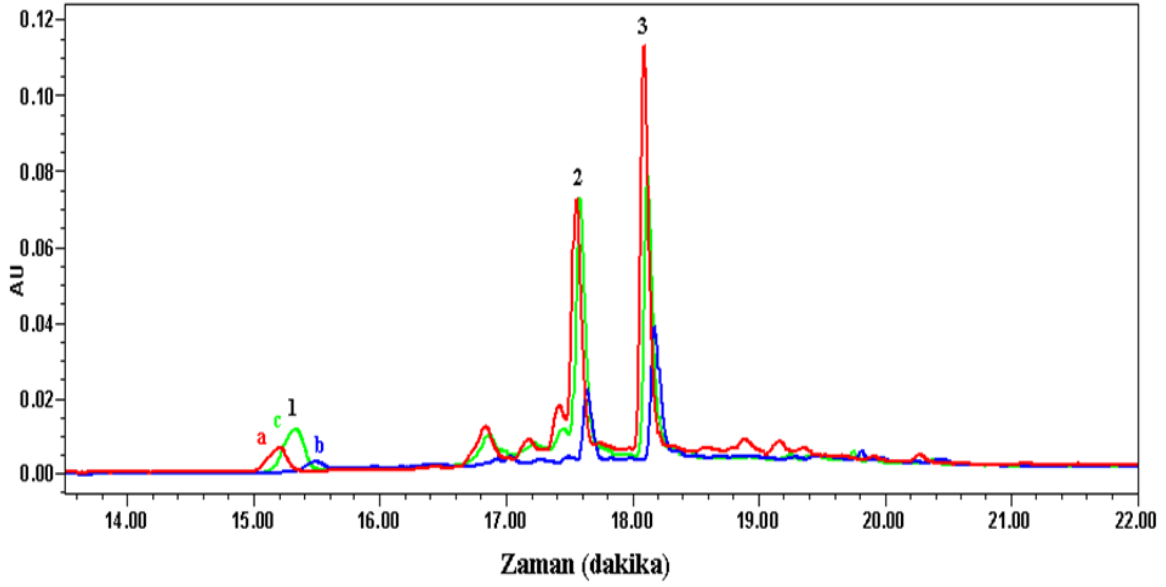
ACN:DMSO (99:1, h/h) çözücü karışımında çözülüp nemi giderilerek MISPE uygulamasına uygun hale getirilen beyaz üzüm çekirdeği ekstraktının 0,7 mL'si 3 mL'lik SPE kartuş içindeki 50 mg KAT-MIP üzerine 0,2 mL dak-1 hızla yüklenmiştir. Beyaz üzüm çekirdeği ekstraktının

yükleme öncesi ve yükleme sonrası kromatogramları karşılaştırılmalı olarak Şekil 4.12’de gösterilmektedir.



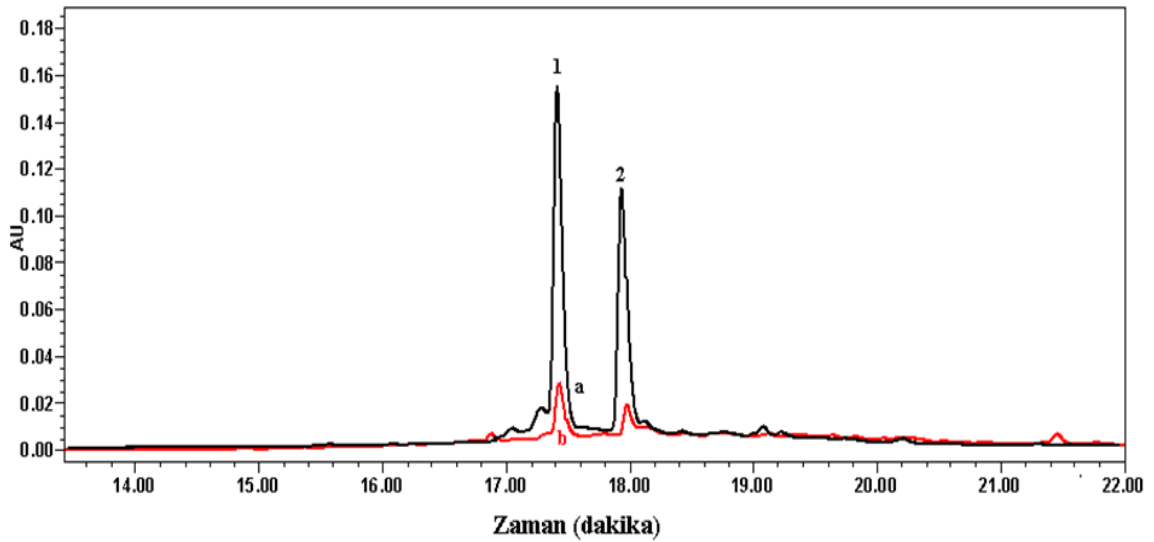
Şekil 4.12: Beyaz üzüm çekirdeği ekstraktının KAT-MISPE kartuşa yükleme öncesi (a) ve **yükleme sonrası (b)** kromatogramları (Belirleme dalga boyu: 280 nm)
(1: Gallik asit, 2: Kateşin, 3:Epikateşin)

Şekil 4.12’de görüldüğü beyaz üzüm çekirdeği ekstraktı gallik asit, kateşin ve epikateşin içermektedir. Fenolik bileşiklerin belirlenmesinde PDA spektrumlarından yararlanılmıştır. Belirleme dalga boyu olarak kateşin ve türevlerinin maksimum absorpsiyon gösterdiği 280 nm seçilmiştir. Şekil 4.12’deki kromatogramda kateşin ve izomeri olan epikateşinin polimerin kapasitesi ölçüsünde tutunduğu, bir miktarının tutunmadan kaldığı görülmektedir. Gallik asitin de fenolik yapıya sahip olmasından dolayı yapısındaki –OH gruplarıyla kalıba girmeden polimerle hidrojen bağı yapma yeteneğinde olması ve ayrıca polimerin heterojen bölgeleriyle spesifik olmayan iyonik etkileşimler gösterebilmesi olasılığı nedeniyle gözlenen tutulması, beklenen bir durumdur. Gallik asit yıkama aşamasında uygun çözücü ve çözücü karışımları ile kartuştan uzaklaştırılmıştır. Yıkama aşamalarına ait kromatogramlar Şekil 4.13’de verilmektedir.



Şekil 4.13: Beyaz üzüm çekirdeği ekstraktının KAT-MISPE yıkama kromatogramları.
(a: Yık 1 {1 mL ACN}; b: Yık 2 {1mL ACN}; c: Yık 3 {1 mL H₂O})

Elüsyon aşaması ise ilki 1 mL ve ikincisi 0,5 mL olmak üzere MeOH:HAc (4:1, h/h) karışımının iki basamakta 0,5 mL dak-1 akış hızıyla kartuştan geçirilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.14’de elüsyon kromatogramları görülmektedir.



Şekil 4.14: Beyaz üzüm çekirdeği ekstraktının elüsyon (a: Elüsyon 1, b: Elüsyon 2) kromatogramları
(1: Kateşin, 2: Epikateşin)

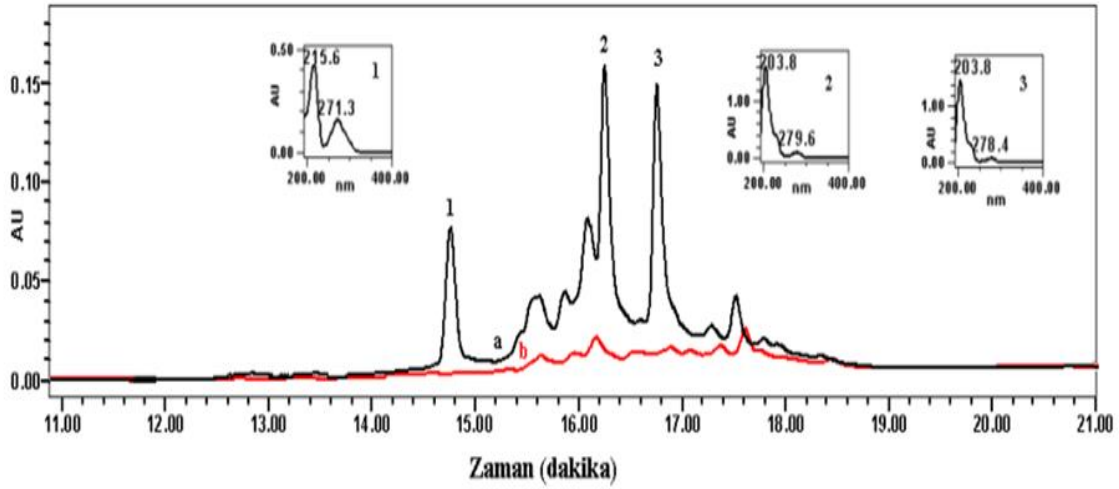
Elüsyon kromatogramında görüldüğü üzere yıkama aşamasında gallik asidin tamamı kartuştan uzaklaştırılmıştır. Kateşin, KAT-MIP ile beyaz üzüm çekirdeği ekstraktından % 69 verimle epikateşin ise % 52 verimle geri kazanılmıştır. Beyaz üzüm çekirdeği ekstraktı için MISPE sonuçları Tablo 4.8’de görülmektedir.

Tablo 4.9: Beyaz üzüm çekirdeği ekstraktı için KAT-MISPE sonuçları.

Aşamalar	KAT miktarı (mmol)	EKAT miktarı (mmol)
Yüklenen	$2,9 \times 10^{-4}$	$2,8 \times 10^{-4}$
Tutulan	$1,9 \times 10^{-4}$	$1,5 \times 10^{-4}$
Elüsyon 1	$1,2 \times 10^{-4}$	$0,71 \times 10^{-4}$
Elüsyon 2	$9,5 \times 10^{-6}$	$6,5 \times 10^{-6}$
% Verim (toplam)	%69	%52

4.6.2. Kırmızı Üzüm Çekirdeği Ekstraktı için KAT-MISPE Uygulaması

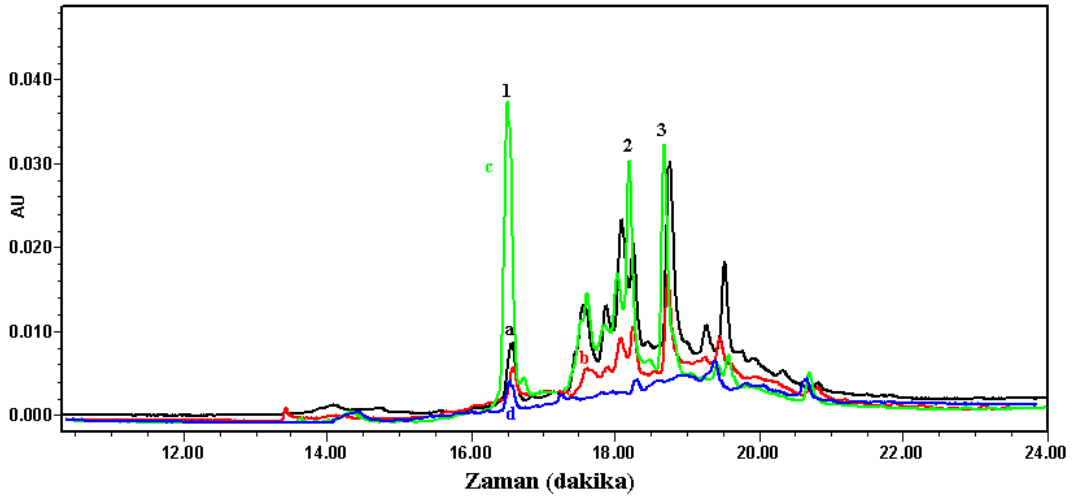
Kuruluğa kadar buharlaştırıldıktan sonra ACN:DMSO (99:1 h/h) çözücü karışımında çözülüp nemi giderilen kırmızı üzüm çekirdeği ekstraktının 1 mL’si 3 mL’lik SPE kartuş içindeki 50 mg KAT-MIP üzerine 0,2 mL dak-1 hızla yüklenmiştir. Kırmızı üzüm çekirdeği ekstraktının yükleme öncesi ve yükleme sonrası kromatogramları karşılaştırılmalı olarak Şekil 4.15’de gösterilmektedir.



Şekil 4.15: Kırmızı üzüm çekirdek ekstraktının KAT-MISPE kartuşa yükleme öncesi (a) ve yükleme sonrası (b) kromatogramları (Belirleme dalga boyu: 280 nm)

(1: Gallik asit, 2: Kateşin, 3:Epikateşin)

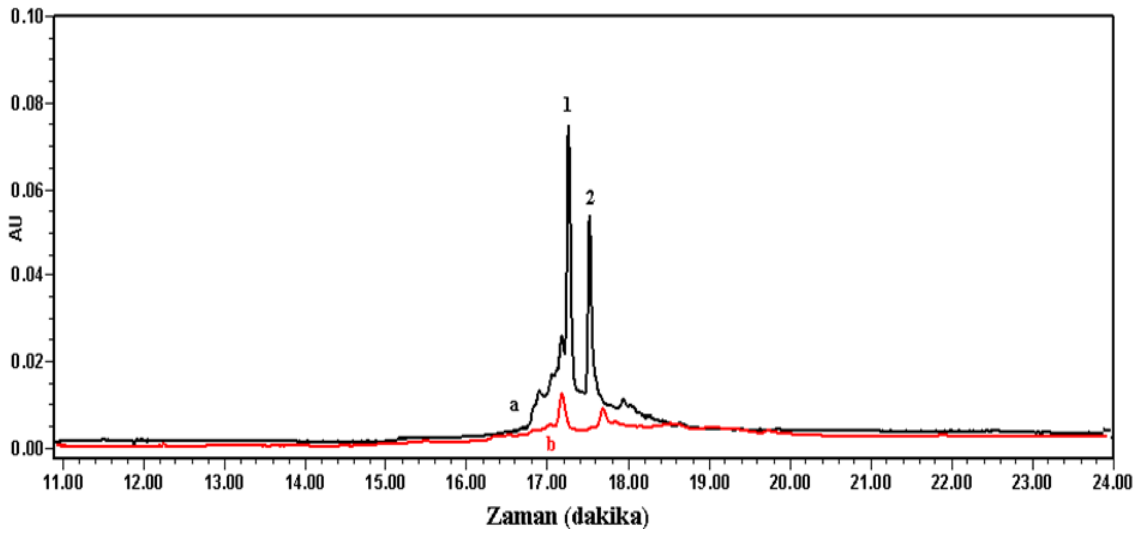
Kırmızı üzüm çekirdeği ekstraktının içeriğindeki gallik asit, kateşin ve epikateşin PDA spektrumlarından yararlanılarak belirlenmiştir. Yükleme sonrası kateşin ve izomeri epikateşinin büyük oranda kalıpta tutunduğu görülmektedir. Gallik asitin ise kalıba girmeden yapısındaki –OH grupları ile hidrojen bağına dayalı spesifik olmayan şekilde tutulduğu öngörülmektedir. MISPE'nun yıkama aşamasında farklı çözücü ve çözücü karışımları ile yıkanarak gallik asitin tamamı kartuştan uzaklaştırılmıştır. Şekil 4.16'da kırmızı üzüm çekirdeği ekstraktına ait yıkama kromatogramları gösterilmektedir.



Şekil 4.16: Kırmızı üzüm çekirdeği ekstraktının KAT-MISPE yıkama kromatogramları.

(a: Yık 1 {1 mL ACN}; b: Yık 2 {1mL ACN}; c: Yık 3 {1 mL H₂O}, d: Yık 4 {1 ml ACN:H₂O, 5:95, h/h })

(1: Gallik asit, 2: Kateşin, 3:Epikateşin)



Şekil 4.17: Kırmızı üzüm çekirdeği ekstraktının elüsyon (a: Elüsyon 1, b: Elüsyon 2) kromatogramları.

(1: Kateşin, 2: Epikateşin)

Kateşin, KAT-MIP ile kırmızı üzüm çekirdeği ekstraktından % 54 verimle epikateşin ise % 35 verimle geri kazanılmıştır. Kırmızı üzüm çekirdeği ekstraktı için MISPE sonuçları Tablo 4.9’da görülmektedir.

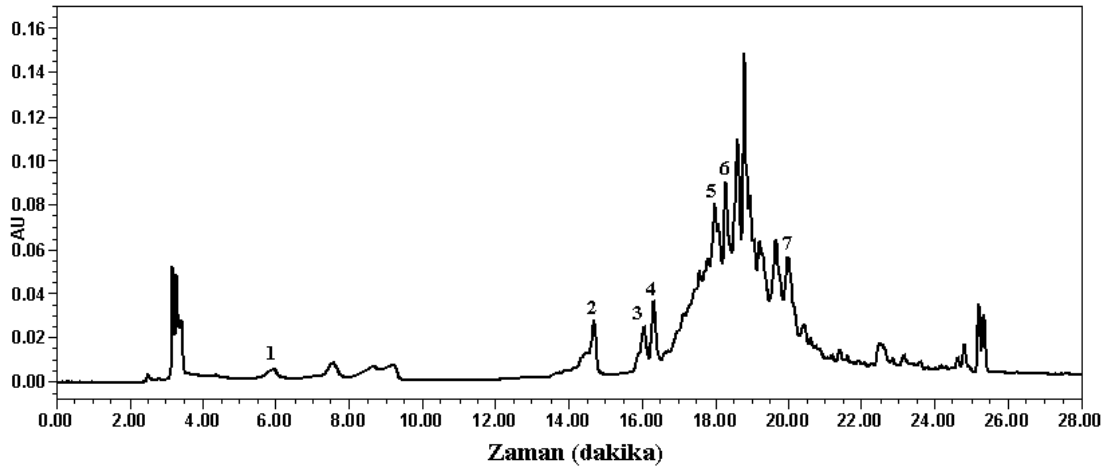
Tablo 4.10: Kırmızı üzüm çekirdeği ekstraktı için KAT-MISPE sonuçları.

Aşamalar	KAT miktarı (mmol)	EKAT miktarı (mmol)
Yüklenen	$2,5 \times 10^{-4}$	$1,3 \times 10^{-4}$
Tutulan	$2,3 \times 10^{-4}$	$1,3 \times 10^{-4}$
Elüsyon 1	$1,2 \times 10^{-4}$	$0,44 \times 10^{-4}$
Elüsyon 2	$6,5 \times 10^{-6}$	$2,0 \times 10^{-6}$
% Verim	%54	%35

4.7. ÜZÜM KABUĞU EKSTRAKTLARININ FENOLİK BİLEŞENLERİNİN BELİRLENMESİ

4.7.1. Beyaz ve Kırmızı Üzüm Kabuk Ekstrakt İçeriğinin Belirlenmesi

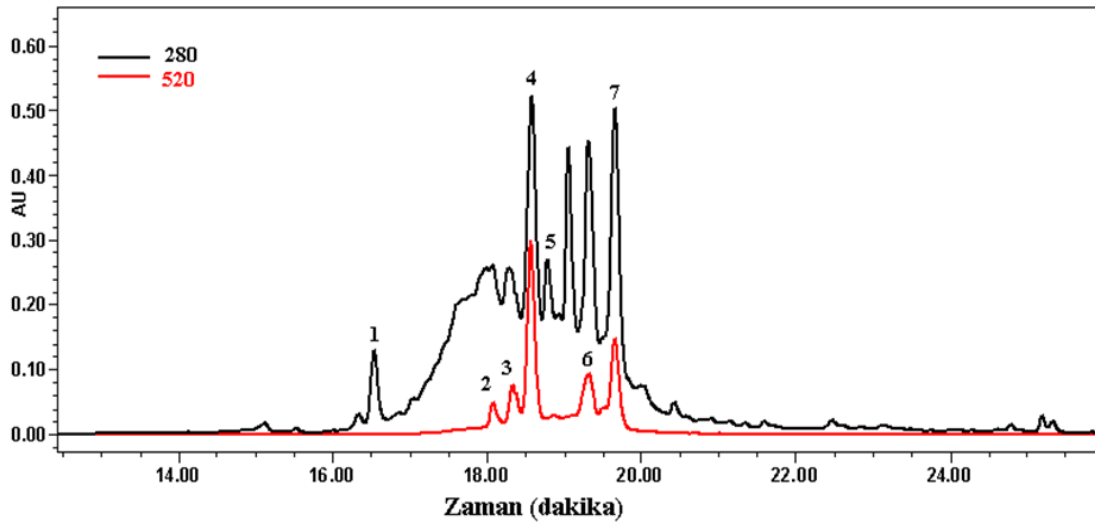
Beyaz ve kırmızı üzüm kabuğu ekstraktları % 50 MeOH (h/h) de hazırlanarak daha önce belirlediğimiz HPLC metodu ile analiz edilmiştir. Şekil 4.18’de beyaz üzüm kabuğu ekstraktının, Şekil 4.19’da ise kırmızı üzüm kabuğu ekstraktının kromatogramları verilmiştir.



Şekil 4.18: Beyaz üzüm kabuğu ekstrakt kromatogramı (Belirleme dalga boyu: 280 nm).

(1, 2, 3: Hidroksi benzoik asit türevi; 4: Gallik asit; 5: Protokateşuik asit 6: p-hidroksi benzoik asit; 7: kuersetin glikoziti)

Beyaz üzüm kabuğu ekstraktında fenolik bileşiklerin hidroksibenzoik asit grubundan gallik asit, protokateşuik asit, p-hidroksi benzoik asit ve türevleri, flavonollerden kuersetin glikoziti bulunduğu hem PDA spektrumlarından hem de literatür bilgilerinden yararlanılarak öngörülmüştür (Kelebek ve diğ., 2010, Sun, Liang ve diğ., 2007).



Şekil 4.19: Kırmızı üzüm kabuğu ekstrakt kromatogramı.

(1: Gallik asit, 2: Malvinidin 3-O-glukozit, 3: Malvinidin 3-O-p-coum-glukozit; 4: Siyanidin, 5: p-kumarik asit, 6: Antosiyanin türevi, 7: Delfinidin)

Kırmızı üzüm kabuğu ekstraktında, hidroksibenzoik asit türevlerinden gallik asit, antosiyanin ve türevleri bulunduğu, PDA spektrumlarından ve literatür bilgilerinden yararlanılarak öngörülmüştür.

Literatüre göre üzüm kabuklarının antioksidan özelliğini başta antosiyaninler olmak üzere flavonoller ve türevleri ile hidroksibenzoik asitler sağlamaktadır (Rockenbach ve diğ., 2011, Tomaz ve diğ., 2015). Şekil 4.18 ve 4.19’da görüldüğü üzere hem beyaz hem de kırmızı üzüm kabuğu ekstraktlarının içeriğinde kateşin ve türevlerine rastlanmamıştır. Bu nedenle KAT-MISPE uygulamasında üzüm kabuğu ekstraktlarından yararlanılamamıştır.



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Fenolik bileşiklerin flavanol grubunda bulunan kateşinler, güçlü antioksidan aktivite, antibakteriyel, antiviral ve antialerjik özellikler gösterirler (Blahová ve diğ., 2004 Gadkari ve Balaraman, 2014, Garrido ve Borges, 2013). Bu çalışmada kateşin baskılı polimer (KAT-MIP) sentezlenerek kateşin ve türevlerinin şarap endüstrisi atıklarından (çekirdek) geri kazanılması amaçlandı.

KAT-MIP için en uygun monomer, gözenek oluşturuucu çözücü türü, miktarı ve mol oranı belirlemek için optimizasyon çalışmaları yapıldı.

Bu çalışmalar sonucunda KAT-MIP için en uygun;

- Fonksiyonel monomer; 4-VP,
- Gözenek oluşturuucu çözücü; ACN:DMSO (98:2, h/h) çözücü karışımı,
- Kalıp molekül:Monomer:Çapraz bağlayıcı (KAT:4-VP:EDMA) mol oranının 1:4:20 olduğuna karar verildi.

KAT-MIP ve NIP için batch (kesikli temas) testleri uygulayarak KAT adsorpsiyonu üzerine zaman, çözücü ve derişim etkisi incelendi. Adsorpsiyon çözücüsü olarak baskılama faktörünün en yüksek (2,89) olduğu ACN:DMSO (99:1, h/h) çözücü karışımı seçildi. Pratikte doygunluğa ulaştığı 2 saat adsorpsiyon süresi olarak belirlendi. 100-700 μM derişim aralığının KAT-MIP için uygun çalışma aralığı olduğuna yapılan deneyler sonucunda karar verildi.

KAT-MIP için statik, dinamik ve teorik adsorpsiyon kapasite hesaplamaları yapıldı. Statik kapasite, KAT-MIP'e kesikli temas testi uygulanarak 3 mg g^{-1} bulundu. Dinamik kapasite ise kopma (breakthrough) eğrisi çizilerek hesaplandı. KAT-MIP için bu değer, $1,43 \times 10^{-3} \text{ mmol g}^{-1}$ ($2,1 \text{ mg g}^{-1}$) olarak bulundu. KAT-MIP ve NIP'a özgü Freundlich ve Langmuir adsorpsiyon izotermi sabitleri hesaplandı. Freundlich izotermine göre adsorpsiyon yoğunluğunu ifade eden n sabitinin > 1 , Langmuir izotermine göre RL sabitinin (dağılma ve boyutsuz ayırma faktörü) < 1 ($RL=0,72$) olarak bulunması ve her iki adsorpsiyon izotermine de MIP için uyum katsayılarının yüksek olması nedeniyle KAT adsorpsiyonunun hem Freundlich hem de Langmuir izotermine uyumlu olduğu sonucuna varıldı. Yine de MIP'de her ne kadar analite seçimli bölgelerde tutulma olması bekleniyorsa da non spesifik etkileşimlerle polimerin diğer bölgelerinde de oluşan tutulmalar nedeniyle adsorpsiyonun tek tabaka adsorpsiyonuna dayanan

Langmuir izoterminden ziyade heterojen adsorpsiyonu ifade eden Freundlich izotermine uygunluğunu kabul etmek daha gerçekçidir. Langmuir izotermi büyüklüklerinden Q_{maks} (teorik adsorpsiyon kapasitesi), 5 mg g^{-1} olarak hesaplandı.

1:4:20 KAT-MIP NIP için KAT, EKAT, KUE, KLA ve GA standartları ile seçimlilik testi uygulandı. Bu test sonucunda KAT ve izomeri EKAT'nin büyük oranda kalıba girerek tutunduğu KUE, KLA ve GA'in ise NIP ile benzer oranda tutulma göstermeleri nedeniyle kalıba girmeden sadece yapılarındaki hidroksil gruplarıyla polimer yüzeyinde hidrojen bağı oluşturarak spesifik olmayan etkileşimlerle tutunduğu sonucuna varıldı.

Tablo 2.1'de kalıp molekül ve/veya ekstrakte edilen ürünün KAT ve türevleri olduğu çalışmalar özetlemiştir. Bu çalışmalardan sadece birinde KUE baskılı polimerle üzüm atıklarından KAT ve EKAT derişiklendirilmiştir. Bazı çalışmalarda bulunan BF'leri bizim çalışmamızdakine kıyasla düşük bulunurken bazılarında ise yüksek bulunmuştur. Bunun nedeni kullanılan fonksiyonel monomer, kalıp molekül, gözenek oluşturucu çözücü, polimerizasyon metodu ve adsorpsiyon çözücüsünün farklılık göstermesidir. Mesela bazı çalışmalarda adsorpsiyon çözücüsü olarak su ve MeOH kullanılmıştır. MIP sentezinde kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki etkileşim, hidrojen bağı gibi zayıf etkileşimlere dayanmaktadır. Su gibi güçlü polar çözücü kullanılması, hedef molekülün kalıba girmesini engelleyeceğinden tutulmanın seçimliliği kaybolur. Bu nedenle bizim çalışmamızda bu tür çözücüler kullanılmadı.

Sentezlediğimiz 1:4.20 KAT-MIP ile şarap endüstrisi atıklarından olan beyaz ve kırmızı üzüm çekirdeği ekstraktlarına MISPE uygulaması gerçekleştirildi.

- Beyaz üzüm çekirdeği ekstraktından % 69 kateşin ve % 52 epikateşin,
- Kırmızı üzüm çekirdeği ekstraktından ise % 54 kateşin ve % 35 epikateşin geri kazanıldı.

Böylece azımsanamayacak boyutlardaki bir atıktan oldukça yüksek verimle kateşinlerin ayrılması ve derişiklendirilmesi gerçekleştirilerek şarap endüstrisi atıklarının değerli ürüne dönüştürülmesi sağlandı.

KAYNAKLAR

- Aceto, M., Clericuzio, M., Burlando, B., 2014, *Recovery of phenolic compounds from by-products of the winemaking chain*, In: Rayess, Y. (ed.), Chapter 11, Nova Science Publishers, Inc., Italy, ISBN: 978-1-63321-048-6, 281-312.
- Alvarez-Lorenzo, C., Concheiro, A., 2004, Molecularly imprinted polymers for drug delivery, *Journal of Chromatography B*, 804 (1), 231–245.
- Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S.E., Bektaşoğlu, B., Berker, K.I., Özyurt, D., 2007, Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay, *Molecules*, 12 (7), 1496-1547.
- Baggiani, C., Anfossi, L., Giovannoli, C., 2007, Solid phase extraction of food contaminants using molecular imprinted polymers, *Analytical Chimical Acta*, 591 (1), 29–39.
- Blahová, E., Lehotay, J., Skačáni, I., 2004, The use of molecularly imprinted polymer for selective extraction of (+)-catechin, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 27 (17), 2715–2731.
- Caro, E., Marcè, R.M., Borrull, F., Cormack P.A.G., 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), 143-154.
- Caro, E., Masquè, Marcè, N., R.M., Borrull F., Cormack, P.A.G., Sherrington D.C., 2002, Non-covalent and semi-covalent molecularly imprinted polymers for selective on-line solid-phase extraction of 4-nitrophenol from water samples, *Journal of Chromatography A*, 963 (1-2), 169–178.
- Chen, S., Luo, Z., Ma, X., Xue, L., Lan, H., 2012, Efficient separation and purification of epigallocatechin gallate (EGCG) based on EGCG imprinted polymer prepared with chitosan as matrix, *Analytical Letters*, 45 (16), 2300-2309.
- Cheung, L.M., Cheung P.C.K., Ooi, V.E.C., 2003, Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts, *Food Chemistry*, 81 (2), 249-255.
- Choy, K.K.H., Porter, J.F., McKay, G., 2000, Langmuir isotherm models applied to the multi component sorption of acid dyes from effluent onto activated carbon, *Journal of Chemical and Engineering Data*, 45 (4), 575-584.
- Cook, N.C., Samman, S., 1996, Flavonoids-chemistry metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources, *Nutritional Biochemistry*, 7 (2), 66-76.
- Ding, L., Li, H., Tang, F., Yao, S., 2006, Molecularly imprinted solid-phase extraction of epicatechin from tea beverage, *Analytical Letters*, 39 (12), 2373-2385.
- Eiroa, A.A., Canle, M., Cancellieri, V.L., Cerdà, V., 2016, Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I), *Trends in Analytical Chemistry*, 80, 641–654.

- Gadkari, P.V., Balaraman, M., 2014, Catechins: Sources, extraction and encapsulation: A review, *Food and Bioproducts Processing*, 93, 122-138.
- García-Calzón, J.A., Díaz-García, M.E., 2007, Characterization of binding sites in molecularly imprinted polymers, *Sensors and Actuators B*, 123, 1180–1194.
- Garrido, J., Borges F., 2013, Wine and grape polyphenols-A chemical perspective, *Food Research International*, 54, 1844–1858.
- Haginaka, J., Tabo, H., Ichitani, M., Takihara, T., Sugimoto, A., Sambe, H., 2007, Uniformly-sized, molecularly imprinted polymers for (–)-epigallocatechin gallate, -epicatechin gallate and -gallocatechin gallate by multi-step swelling and polymerization method, *Journal of Chromatography A*, 1156, 45–50.
- Haupt, K., 2003, Imprinted Polymers: The next generation, *Analytical Chemistry*, 376-383.
- He, C., Long, Y., Pan, J., 2007, Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of analytes from real samples, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70 (2), 133–150.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya D.J., 2002, Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships, *Journal of Nutritional Biochemistry* 13 (10), 572–584.
- Hennion, M.C., 1999, Solid-phase extraction: Method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 856 (1-2), 3-54.
- Ignat, I., Volf, I., Popa, V.I., 2011, A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables, *Food Chemistry* 126 (4), 1821–1835.
- Jara-Palacios, M.J., Gordillo, B., Gonzalez-Miret, M.L., Hernanz, D., Escudero-Gilete, M.L., Heredia, F.J., 2014, Comparative study of the enological potential of different winemaking byproducts: Implications in the antioxidant activity and color expression of red wine anthocyanins in a model solution, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62 (29), 6975–6983.
- Jin, Y., Xuan, Y.H., Jin, Y.S., Row, K.H., 2011, Multi-spe of caffeine and catechin compounds from green tea by caffeine and (+) catechin MIPs, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 34 (15), 1604-1616.
- Karaman Ersoy, Ş., Tütem, E., Sözgen Başkan K., Apak, R., Nergiz, C., 2016, Preparation, characterization and usage of molecularly imprinted polymer for the isolation of quercetin from hydrolyzed nettle extract, *Journal of Chromatography B*, 1017–1018, 89–100.
- Karaman Ersoy, Ş., 2014, *Fenolik bileşiklerin seçimli ayrımı ve tayininde yeni malzemelerden yararlanılması*, Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Kaur, C., Kapoor, H.C., 2002, Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables, *International Journal of Food Science and Technology*, 37 (2), 153-161.

- Kelebek, H., Canbasa, A., Jourdesc, M., Teissedre, P.L., 2010, Characterization of colored and colorless phenolic compounds in Öküzgözü wines from Denizli and Elazig regions using HPLC-DAD–MS, *Industrial Crops and Products*, 31 (3), 499–508.
- Khasawneh, M.A., Vallano¹, P.T., Remcho, V.T., 2001, Affinity screening by packed capillary high performance liquid chromatography using molecular imprinted sorbents II. Covalent imprinted polymers, *Journal of Chromatography A*, 922 (1-2), 87–97.
- Komiyama, M., Takeuchi, T., Mukawa, T., Asanuma, H., 2003, *Molecular imprinting From Fundamentals to Applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, ISBN: 3-527-30569-6
- Li, N., Ng, T.B., Wong, J.H., Qiao, J.X., Zhang, Y.N., Zhou, R., Chen, R.R., Liu, F., 2013, Separation and purification of the antioxidant compounds, caffeic acid phenethyl ester and caffeic acid from mushrooms by molecularly imprinted polymer, *Food Chemistry*, 139 (1-4), 1161–1167.
- Lok, C.M., Son, R., 2009, Application of molecularly imprinted polymers in food sample analysis, *International Food Research Journal*, 16, 127-140.
- López, M.M.C., Pérez, M.C.C., García, M.S.D., Vilariño, J.M.L., Rodríguez, M.V.G., Losada, L.F.B., 2012, Preparation, evaluation and characterization of quercetin-molecularly imprinted polymer for preconcentration and clean-up of catechins, *Analytical Chemical Acta*, 721, 68–78.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jime'nez, L., 2004, Polyphenols: Food sources and bioavailability, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79 (5), 727-747.
- Martins, I.M., Roberto, B.S., Blumberg, J.B., Chen, C.Y.O., Macedoa, G.A., 2016, Enzymatic biotransformation of polyphenolics increases antioxidant activity of red and white grape pomace, *Food Research International*, 89, 533–539.
- Masqueè, N., Marceè, R.M., Borrull, F., 2001, Molecularly imprinted polymers: New tailor-made materials for selective solid-phase extraction, *Trends in Analytical Chemistry*, 20 (9), 477-486.
- Mijangos, I., Navarro-Villoslada, F., Guerreiro, A., Piletska, E., Chianella, I., Karim, K., Turner, A., Piletsky, S., 2006, Influence of initiator and different polymerisation conditions on performance of molecularly imprinted polymers, *Biosensors and Bioelectronics*, 22 (3), 381–387.
- Montealegre, R.R., Peces, R.R., Vozmediano, J.L.C., Gascuena, J.M., Romero, E.G, 2006, Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate, *Journal of Composition and Analysis*, 19 (6-7), 687-693.
- Moral, N.P., Mayes, A.G., 2004, Comparative study of imprinted polymer particles prepared by different polymerisation methods, *Analytica Chimica Acta*, 504 (1), 15–21.
- Nowshehri, J.A., Bhat, Z.A., Shah, M.Y., 2015, Blessings in disguise: Bio-functional benefits of grape seed extracts, *Food Research International*, 77, 333–348.

- Pakade, V., Lindahl, S., Chimuka, L., Turner, C., 2012, Molecularly imprinted polymers targeting quercetin in high-temperature aqueous solutions, *Journal of Chromatography A*, 1230, 15–23.
- Pérez-Moral, N., Mayes, A.G., 2004, Comparative study of imprinted polymer particles prepared by different polymerisation methods, *Analytica Chimica Acta*, 504 (1), 15-21.
- Poole, C.F., 2003, New trends in solid-phase extraction, *Trends in Analytical Chemistry*, 22 (6), 362-373.
- Pretorius, I.S., 2000, Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking, *Yeast*, 16 (8), 675-729.
- Qiao, F., Sun, H., Yan, H., Row, K.H., 2006, Molecularly imprinted polymers for solid phase extraction, *Chromatographia*, 64, 625–634.
- Rampey, A.M., Umpleby, R.,J., Rushton, G.T., Iseman, J.C., Shah, R.N., Shimizu, K.D., 2004, Characterization of the imprint effect and the influence of imprinting conditions on affinity, capacity, and heterogeneity in molecularly imprinted polymers using the freundlich isotherm-affinity distribution analysis, *Analytical Chemistry*, 76 (4), 1123-1133.
- Rice-Evans, C.A., Miller N.J., Paganga, G., 1997, Antioxidant properties of phenolic compounds, *Trends in Plant Science*, 2 (4), 152-159.
- Rockenbach, I.I., Gonzaga, L.V., Rizelio, V.M., Gonçalves, E.L.S.S., Genovese, M.I., Fett, R., 2011, Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazilian winemaking, *Food Research International*, 44 (4), 897–901.
- Satuè-Gracia, M.T., Heinonen, M., Frankel, E.N., 1997, Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome systems, *Journal of. Agricultural and Food Chemistry*, 45 (9), 3362–3367.
- Schieber, A., Stintzing, F.C., Carle, R., 2001, By-products of plant food processing as a sources of functional compounds-recent developments, *Trends in Food Science and Technology*, 12 (11), 410-413.
- Serencam, H., Ozdes, D., Duran, C., Senturk H.B., 2013, Assessment of kinetics, thermodynamics, and equilibrium parameters of Cu(II) adsorption onto Rosacanina seeds, *Desalination and Water Treatment*, 52 (16-18), 3226-3236.
- Sırlı, B.A., Peşkircioğlu, M., Torunlar, H., Özaydın, K.A., Mermer, A., Kader, S., Tuğaç, M.G., Aydoğmuş O., Emeklier, Y., Yıldırım, Y.E., Kodal, S., 2015, Türkiye’de üzüm (*Vitis* spp.) yetiştirmeye uygun potansiyel alanların coğrafi bilgi sistemleri (CBS) teknikleri kullanılarak iklim ve topoğrafya faktörlerine göre belirlenmesi, *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 24 (1), 56-64.
- Spivak, D.A., 2005, Optimization, evaluation, and characterization of molecularly imprinted polymers, *Advanced Drug Delivery*, 57 (12), 1779-1794.

- Stratil, P., Klejdus, B., Kuban, V., 2007, Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals, *Talanta*, 71 (4), 1741–1751.
- Sun, J., Liang, F., Bin, Y., Li, P., Duan, C., 2007, Screening non-colored phenolics in red wines using liquid chromatography/ultraviolet and mass spectrometry/mass spectrometry libraries, *Molecules*, 12 (3), 679-693.
- Sun, X., Zhang, C., Huang, Y.P., Liu, Z.S., 2015, Separation of epigallocatechin gallate from natural plant extracts using crowding agents-assisted imprinted polymers, *Chromatographia*, 78 (15), 995–1003.
- Tomaz, I., Maslov, L., Stupić, D., Preiner, D., Ašperger, D., Kontića, J.K., 2015, Multi-response optimisation of ultrasound-assisted extraction for recovery of flavonoids from red grape skins using response surface methodology, *Phytochemical Analysis*, 27 (1), 13–22.
- Vasapollo, G., Sole, R., 2011, Molecularly imprinted polymers: Present and future prospective, *International Journal of Molecular Science*, 12 (9), 5908-5945.
- Xia, E.Q., Deng, G.F., Guo, Y.J., Li, H.B., 2010, Biological activities of polyphenol from grapes, *International Journal of Molecular Sciences*, 11 (2), 622-646.
- Yan, H., Row, K.H., 2006, Characteristic and synthetic approach of molecularly imprinted polymer, *International Journal of Molecular Sciences*, 7 (5), 155-178.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Seda ÖZEN
Doğum Yeri	Eminönü/İSTANBUL
Doğum Tarihi	18.07.1990
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	0506 576 87 50
E-Posta Adresi	sdzn90@gmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Balıkesir Üniversitesi
Fakülte	Fen-Edebiyat Fakültesi
Bölümü	Kimya Bölümü
Mezuniyet Yılı	27.07.2011

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Mühendislik Fakültesi
Anabilim Dalı	Kimya A.B.D
Programı	Analitik Kimya
Mezuniyet Tarihi	22.06.2017

Makale ve Bildiriler	
Sözgen Başkan, K., Tütem, E., Akyüz, E., Özen, S., Apak, R., 2016, Spectrophotometric total reducing sugars assay based on cupric reduction, <i>Talanta</i> , 147, 162-168.	