T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FENİKOL BİLEŞİKLERİNİN SÜT ÜRÜNLERİNDEN BASKILANMIŞ POLİMERLER İLE KATI FAZ EKSTRAKSİYONU OPTİMİZASYONU VE LC-MS/GC-MS ANALİZİ

Tayfun CEYHAN

YÜKSEK LİSANS

KİMYA ANA BİLİM DALI

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Kenan SEZER

EDİRNE-2017

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Prof. Dr. Murat YURTCAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

Prof.Dr. Mesut KAÇAN
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımca tarafımca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Kenan SEZER
Tez Danışmanı

Bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Kimya Anabilim Dalında bir Yüksek Lisans tezi olarak oy [SEÇİN] ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	İmza
Yrd. Doç. Dr. Kenan SEZER	
Doç. Dr. Dilek BAKIRCIOĞLU	
Doç. Dr. Mehmet Atilla TAŞDELEN	

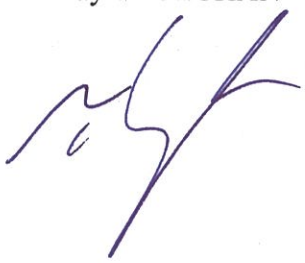
Tarih: 13/01/2017

T.Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
DOĞRULUK BEYANI

İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını beyan ederim.

13/01/2017

Tayfun CEYHAN



Yüksek Lisans Tezi

Fenikol Bileşiklerinin Süt Ürünlerinden Baskılanmış Polimer İle Katı Faz Ekstraksiyonu Optimizasyonu ve LC-MS/GC-MS Analizi

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

ÖZET

Çalışmamız kalıp molekül kloramfenikol, momomer metakrilik asit ve çapraz bağlayıcı etilenglikoldimetakrilat temelli moleküler baskılanmş polimer hazırlanmasını içerir. Sentezlenen MIP süt numunelerinden kloramfenikol (CAP), florfenikol (FF) ve tiyamfenikol (TAP)'ün LC-MS/MS analizini takip eden katı faz ekstraksiyonu için kullanılmıştır. Moleküler baskılanmış polimerler (MIP'ler) sulu süspansiyon polimerizasyonu ve çöktürme polimerizasyonu metotları ile sentezlendi. Elde edilen moleküler baskılanmış polimer mikro küreleri taramalı elektron mikroskobu (SEM), fourier dönüşümlü kızıl ötesi spektroskopi (FTIR), termogravimetrik analiz (TGA) ile karakterize edildi. CAP bileşiğinin sentezlenen polimer üzerindeki adsorpsiyon davranışı analit konsantrasyonu, polimer-analit etkileşim süresi ve çözelti pH'ı parametrelerini içerecek şekilde optimize edildi. MIP ve kontrol polimeri NIP için bağlanma izotermleri çizildi. Scatchard analizlerinde çöktürme polimerizasyonu ile sentezlenen MIP için spesifik ve spesifik olmayan bağlanma bölgeleri tayin edildi, buna karşın süspansiyon polimerizasyonu ile elde edilen MIP'ler kontrol polimerine göre zayıf adsorpsiyon özellikleri gösterdi. Çöktürme polimerizasyonu ile sentezlenen MIP ve kontrol polimeri NIP için adsorpsiyon özellikleri batch modu deneyleri ile karakterize edildi. Scatchard analizi çıktılarından MIP, yüksek seçici bölgeleri için Q_{max} = 2,238 mg g^{-1} ve K_d = 4,156 mg mL^{-1} değerleri verirken düşük seçici bölgeler Q_{max} = 3,68 mg g^{-1} ve K_d = 31,88 mg mL^{-1} değerlerini gösterdi. Kontrol polimeri NIP,

Q_{max} = 1,238 mg g^{-1} ve K_d = 20,38 mg mL^{-1} değerleri ile MIP'e kıyasla daha düşük bağlanma karakteristikleri göstermektedir.

CAP bileşiği için baskılama faktörü 3,44 (Q_{MIP}/Q_{NIP}) olarak tayin edildi ve göreceli baskılama faktörleri Q_{CAP}/Q_{FF} ve Q_{CAP}/Q_{TAP} sırasıyla 1,22 ve 1,24 olarak belirlendi. Sentezlenen MIP, süt numunelerinden fenikol bileşiklerinin katı faz ekstraksiyonunda başarı ile uygulandı. CAP, FF ve TAP fenikolleri ile spike edilen (0,01 – 10 mg L^{-1}) süt numunelerine MIP ile hazırlanmış SPE kartuşlarında katı faz ekstraksiyonu uygulandı. Önceden belirlenmiş SPE şartlarının süt numunelerine uygulanması ile CAP için 82,5±5,6 – 91,8±3,7; FF için 73±5,3 – 83,6±4,8; ve TAP için 71,2±4,1 – 72,6±3,6 aralığında geri kazanım değerleri elde edildi.

Kloramfenikol, florfenikol ve tiyamfenikolün süt numunelerinden çöktürme polimerizasyonu ile sentezlenen MIP'e dayalı katıfaz ekstraksiyonunun takip eden LC-MS/MS analizleri başarı ile gerçek numunelere uygulanabilir.

Yıl : 2017

Sayfa Sayısı : 89

Anahtar Kelimeler :Moleküler baskılanmış polimer, Kloramfenikol, Katıfaz ekstraksiyonu, Sıvı kromatografi kütle spektrometri.

Master's Thesis

Optimization Of Solid Phase Extractions Of Phenicol Compounds From Milk Products By The Use Of Molecularly Imprinted Polymers And LC-MS/GC-MS Analysis

Trakya University Institute of Natural Sciences

Chemistry

ABSTRACT

Our study involves preparation of molecularly imprinted polymer based on template molecule chloramphenicol, monomer metacrylic acid and crosslinker ethyleneglycoldimethacrylate, synthesized MIP is used for solid phase extraction of chloramphenicol (CAP), florfenicol (FF) and thiamphenicol (TAP) from milk samples followed by LC-MS/MS analysis. Molecularly imprinted polymers (MIP's) are synthesized by aqueous suspension polymerization and precipitation polymerization methods. Resulting molecularly imprinted polymer microspheres (MIPM's) were characterized with scanning electron microscope (SEM), fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR) and thermogravimetric analysis (TGA). Adsorption behavior of CAP on synthesized polymers were optimzed including parameters concentration of analyte, polymer-analyte contact time and pH of solution.

Binding isotherms for MIP and control polymer NIP are plotted. According to the Scatchard plot analysis specific and non-specific binding sites were determined for precipitation polymerization synthesized MIP while suspenson polymerization resulted MIP showed weak adsorption properties compared with control polymer. MIP synthesized by precipitation polimerization and its control polymer NIP's adsorption properties were characterized with batch mode experiments. Outcomes from Scatchard plot analysis of MIP gives Q_{max} = 2,238 mg g^{-1} and K_d = 4,156 mg mL^{-1} values for high affinity sites whereas low affinity sites showed Q_{max} = 3,68 mg g^{-1} and K_d = 31,88

mg mL^{-1}. Control polymer NIP gives Q_{max} = 1,238 mg g^{-1} and K_d = 20,38 mg mL^{-1} values showing low binding characteristics with respect to the MIP.

Imprinting factor (IF) for template compound CAP was defined as 3,44 (Q_{MIP}/Q_{NIP}) and relative imprinting factors in optimized batch mode experiments Q_{CAP}/Q_{FF} and Q_{CAP}/Q_{TAP} were 1,22 and 1,24 respectively. Synthesized MIP was applied succesfuly to the solid phase extraction (SPE) of fenicol compounds from milk samples. Milk samples spiked with phenicols CAP, FF and TAP (0,01-10 mg L^{-1}) were subjected to the solid phase extraction with MIP prepared SPE cartridges. Under pre-defined SPE conditions applied to the milk samples, recoveries were between 82,5±5,6 – 91,8±3,7 for CAP, 73±5,3 – 83,6±4,8 for FF and 71,2±4,1 – 72,6±3,6 for TAP compounds.

Precipitation polymerization synthesized MIP based SPE extraction of chloramphenicol, florfenicol and thiamphenicol from milk samples followed by LC-MS/MS analysis can be succesfully applied to the real samples.

Year : 2017
Number of Pages : 89
Keywords :Molecularly imprinted polymer, Chloramphenicol, Solid phase extraction, Liquid chromatography mass spectrometry.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda bana her türlü olanağı sağlayan ve her konuda yardımcı olup beni yönlendiren danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Kenan SEZER'e;

Bu eğitimi almam konusunda bana her türlü desteği veren Edirne Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürü Sayın Ayhan ORAN'a ve Tekirdağ Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürü Sayın İbrahim Halil BAKIR'a;

Maddi ve manevi sonsuz desteklerinden dolayı değerli Aileme;

Teşekkürü bir borç bilirim.

Tayfun CEYHAN

İÇİNDEKİLER

ÖZET……i
ABSTRACT……iii
TEŞEKKÜR……v
İÇİNDEKİLER……vi
KISALTMALAR……x
ŞEKİLLER DİZİNİ……xi
TABLOLAR DİZİNİ……xiii
BÖLÜM 1……1
GİRİŞ……1
BÖLÜM 2……3
GENEL BİLGİLER……3
2.1. Kloramfenikol ve Analogları……3
2.2 Katı Faz Ekstraksiyonu……6
2.2.1 Katı Faz Ekstraksiyonu Teknikleri……9
2.2.2.1 Batch Tekniği……9
2.2.2.2 Kolon Tekniği……9
2.2.2 Katı Faz Ekstraksiyonu Basamakları……10
2.2.3. Katı Faz Ekstraksiyonunun Avantajları……11
2.3 Moleküler Baskılanmış Polimerler……12
2.3.1 Kovalent Baskılama……14
2.3.1.1 Kovalent Baskılamanın Avantajları……15
2.3.1.2 Kovalent Baskılamanın Dezavantajları……15
2.3.2 Non-kovalent Baskılama……15
2.3.2.1 Non-kovalent Baskılamanın Avantajları……16
2.3.2.2 Non-kovalent Baskılamanın Dezavantajları……16
2.3.3 Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Sentez Teknikleri……17
2.3.3.1 Yığın (Bulk) Polimerizasyonu ……17

2.3.3.2 Süspansiyon Polimerizasyonu……..……..…..18
2.3.3.3 Çöktürme Polimerizasyonu....……...……..……..….18
2.3.3.4 Çok Adımlı Şişme Polimerizasyonu…….18
2.3.3.5 Yüzey Polimerizasyonu..…….……..……19
2.3.4 Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Uygulama Alanları…...……..……20
2.3.5 Moleküler Baskılanmış Polimer Sentezinde Kullanılan Temel Bileşenler...21
2.3.5.1 Kalıp Molekül……21
2.3.5.2 Fonksiyonel Monomer……..22
2.3.5.3 Çapraz Bağlayıcılar……...24
2.3.5.4 Porojen(Çözücü)……26
2.3.5.5 Başlatıcılar…….26
2.3.6 Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Karakterizasyonu……...28
2.3.6.1 Kimyasal Karakterizasyon…….29
2.3.6.1.1 Fourier-Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR)……..29
2.3.6.1.2 UV Spektroskopisi…….29
2.3.6.1.3 Katı Hal NMR'ı…….29
2.3.6.2 Morfolojik Karakterizasyon……..30
2.3.6.2.1 Civa Yüzey Porozimetresi…….30
2.3.6.2.2 Azot Soğurma Porozimetresi…….30
2.3.6.2.3 Solvent Tutulum Denemeleri…….30
2.3.6.2.4 Mikroskopik Yöntemler (SEM)…….30
BÖLÜM 3……31
MATERYAL ve METODLAR...……31
3.1 Materyal……31
3.1.1 Süt Örneği…….……31
3.1.2 Kullanılan Kimyasallar…….……31
3.1.3 Kullanılan Cihazlar……...……31
3.2 Metodlar ……...……...……32
3.2.1 Kloramfenikol Baskılanmış Polimerlerin Sentezi……32
3.2.1.1 Süspansiyon Polimerizasyonu ile Sentezlenen Polimerler……32
3.2.1.1.1 MIP-1-S Sentezi…….……32
3.2.1.1.2 MIP-2-S Sentezi…….……33

3.2.1.1.3 MIP-3-S Sentezi……33
3.2.1.1.4 NIP-3-S Sentezi……34
3.2.1.2 Çöktürme Polimerizasyonu ile Sentezlenen Polimerler……35
3.2.1.2.1 MIP-P-1 Sentezi……35
3.2.1.2.2 MIP-P-2 Sentezi……35
3.2.1.2.3 NIP-P-1 Sentezi…..……36
3.2.2 Süt Örneklerinden Fenikollerin Ekstraksiyonu……36
3.2.3 GC-MS Sistemi Çalışma Koşulları……..…36
3.2.4 LC-MS/MS Sistemi Çalışma Koşulları……37
3.2.5 Fenikol Bileşiklerinin GC-MS Analizlerinin Optimizasyonu……...37
3.2.6 Çöktürme Polimerizasyonu ve Süspansiyon Polimerizasyonu ile Sentezlenen MIP'lerin Adsorpsiyon Kinetiğinin Karakterizasyonu……..38
3.2.7 MIP-3-S, NIP-3-S, MIP-P-1 ve NIP-P-1'in Adsorpsiyon Kinetiğinin Karakterizasyonu……38
3.2.8 MIP-3-S, NIP-3-S, MIP-P-1 ve NIP-P-1'in Adsorpsiyon Kinetiğinde Konsantrasyonun Etkisinin Karakterizasyonu……...38
3.2.9 MIP-3-S, NIP-3-S, MIP-P-1 ve NIP-P-1'in Adsorpsiyon Kinetiğinde Sürenin Etkisinin Karakterizasyonu……...39
3.2.10 MIP-3-S, NIP-3-S, MIP-P-1 ve NIP-P-1'in Adsorpsiyon Kinetiğinde pH Etkisinin Karakterizasyonu……40
3.2.11 CAP Baskılı Polimerin Analog Bileşikler İçin Adsorpsiyon Kinetiğini ve Baskılama Faktörünün Tayini……....40
3.2.12. MIP-P-1 Baskılanmış Polimerin ve Geleneksel Sorbentlerin SPE Çalışmalarıyla Karşılaştırılması……41
3.2.13 MIP-P-1 İçin Geri Kazanım Çalışmalarında Seçici Olmayan Adsorpsiyonun Azaltılması……41
3.2.14 MIP-P-1'in geri kazanım çalışmaları……..42
3.2.15 Kloramfenikol Baskılanmış Polimerlerin Karakterizasyonu……..42
3.2.15.1 FTIR analizleri……42
3.2.15.2 SEM analizleri……42
3.2.15.3 Termo-gravimetrik analizler (TGA)……42
BÖLÜM 4……43

DENEYSEL SONUÇLAR...……...……43
4.1. Fenikol Bileşiklerinin GC-MS Analizlerinin Optimizasyonu…….43
4.2 Çöktürme Polimerizasyonu ve Süspansiyon Polimerizasyonu ile Sentezlenen MIP'lerin Adsorpsiyon Kinetiğinin Karakterizasyonu……...45
4.3 MIP-3-S, NIP-3-S, MIP-P-1 ve NIP-P-1'in Adsorpsiyon Kinetiğinin Karakterizasyonu……45
4.4 MIP-3-S, NIP-3-S, MIP-P-1 ve NIP-P-1'in Adsorpsiyon Kinetiğinde Konsantrasyonun Etkisinin Karakterizasyonu……45
4.5. MIP-3-S, NIP-3-S, MIP-P-1 ve NIP-P-1'in Adsorpsiyon Kinetiğinde Sürenin Etkisinin Karakterizasyonu…….50
4.6 MIP-3-S, NIP-3-S, MIP-P-1 ve NIP-P-1'in Adsorpsiyon Kinetiğinde pH Etkisinin Karakterizasyonu…….51
4.7 CAP Baskılı Polimerin Analog Bileşikler İçin Adsorpsiyon Kinetiği ve Baskılama Faktörünün Tayini…….52
4.8. MIP-P-1 Baskılanmış Polimerin ve Geleneksel Sorbentlerin SPE Çalışmalarıyla Karşılaştırılması……...……52
4.9 MIP-P-1 İçin Geri Kazanım Çalışmalarında Seçici Olmayan Adsorpsiyonun Azaltılması……..52
4.10 MIP-P-1'in geri kazanım çalışmaları……..53
4.11 Kloramfenikol Baskılanmış Polimerlerin Karakterizasyonu……..56
4.11.1 FT-IR Analizleri……..56
4.11.2 SEM Analizleri……59
4.11.3 Termogravimetrik Analizler……61
BÖLÜM 5……64
TARTIŞMA...……...……...……64
KAYNAKLAR……...……...……..70
ÖZGEÇMİŞ…...……...……...……76

KISALTMALAR

AIBN	: Azobisizobütironitril
CAP	: Kloramfenikol
EGDMA	: Etilen glikol dimetaakrilat
FF	: Florfenikol
FAR-FT-IR	: Uzak bölge Fourier dönüşümlü Infrared Spektroskopisi
FTIR	: Fourier Dönüşümlü Infrared Spektroskopisi
GC-MS	: Gaz kromatografi-Kütle Spektrometresi
LC-MS/MS	: Sıvı Kromatografisi-Kütle/Kütle Spektrometresi
MIP	: Moleküler Baskılanmış Polimer
MAA	: Metakrilik Asit
MISPE	: Moleküler Baskılanmış Polimer Katı Faz Ekstraksiyonu
MRL	: Maksimum Kalıntı Limiti
MSTFA	: N-metil-N-(trimetilsilil)trifloroasetamid
NIP	: Baskılanmamış polimer
NMR	: Nükleer manyetik rezonans
PVA	: Polivinil alkol
SIM	: Seçici İyon Görüntüleme
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
SPE	: Katı faz ekstraksiyonu
TAP	: Tiyamfenikol
TIC	: Toplam iyon kromatogramı
TGA	: Termo-gravimetrik analiz
TMS	: Trimetilsilil
UV/Vis	: Mor ötesi/görünür bölge spektroskopisi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Kloramfenikol…….…….…….…….4
Şekil 2.2 Florfenikol…….……5
Şekil 2.3 Tiyamfenikol……..……5
Şekil 2.4 Çeşitli SPE kolonlar ve diskleri…….……6
Şekil 2.5 SPE kolonu yapısı……..……7
Şekil 2.6 Vakum manifoldu……...……7
Şekil 2.7 Katı faz ekstraksiyonu basamakları……..……...10
Şekil 2.8 Moleküler baskılama tekniğinin şematik gösterimi…….……13
Şekil 2.9 Kovalent baskılama tekniğinin şematik gösterimi……..…….15
Şekil 2.10 Non-kovalent baskılama tekniğinin şematik gösterimi……...……...16
Şekil 2.11 Azobisizobutironitril (AIBN) ve Benzoil peroksit (BPO)'in serbest radikal oluşum reaksiyonları……..……...…..28
Şekil 4.1 Kloramfenikolün kütle spektrumu ve parçalanma ürünleri……..……...43
Şekil 4.2 Florfenikolün kütle spektrumu ve parçalanma ürünleri……..…….44
Şekil 4.3 Tiyamfenikolün kütle spektrumu ve parçalanma ürünleri……...……44
Şekil 4.4 MIP-S-3, NIP-S-3, MIP-P-1 ve NIP-P-1'in konsantrasyona bağlı adsorpsiyon izotermi……...….46
Şekil 4.5 MIP-P-1 polimerinin CAP adsorpsiyonu için Scatchard grafiği,(-a-): yüksek affinite ve düşük affinite bölgeleri adsorpsiyonu, (-b-): Toplam adsorpsiyon……..…..48
Şekil 4.6 NIP-P-1 polimerinin CAP adsorpsiyonu için Scatchard grafiği……..……49
Şekil 4.7 MIP-P-1 ve NIP-P-1polimerinin CAP adsorpsiyonu için Scatchard grafiği...49
Şekil 4.8 MIP-S-3, NIP-S-3, MIP-P-1 ve NIP-P-1'in CAP adsorpsiyon miktarına kontak süresinin etkisi……..……...50
Şekil 4.9 CAP adsorpsiyon miktarında pH'ın etkisi……..…….51
Şekil 4.10 Yıkama çözeltilerinin geri kazanım verimleri üzerine etkisi……..…...53
Şekil 4.11 1 ppm süt örneğinin LC-MS/MS ile alınan kromatogramı……..……..54

Şekil 4.12 1 ppm süt örneğinin LC-MS/MS ile alınan kromatogramı için m/z değerleri……..…….54
Şekil 4.13 5 ppm süt örneğinin LC-MS/MS ile alınan kromatogramı……..…..54
Şekil 4.14 5 ppm süt örneğinin LC-MS/MS ile alınan kromatogramı için m/z değerleri…….……..……55
Şekil 4.15 10 ppm süt örneğinin LC-MS/MS ile alınan kromatogramı……..……55
Şekil 4.16 10 ppm süt örneğinin LC-MS/MS ile alınan kromatogramı için m/z değerleri……..…….55
Şekil 4.17 MİP-P-1 polimeri için süt numunelerinden SPE ekstraksiyon ve LC-MS/MS analizinde % Geri Kazanım değerleri…….....56
Şekil 4.18 CAP içermeyen MIP-P-1 FT-IR spektrumu……..……57
Şekil 4.19 CAP içeren içeren MIP'e ait FTIR spektrumu……...……58
Şekil 4.20 NIP-P-1'e ait FTIR spektrumu……...……59
Şekil 4.21 MIP-P-1'e ait SEM görüntüsü……..……59
Şekil 4.22 NIP-P-1'e ait SEM görüntüsü……60
Şekil 4.23 MIP-3-S'e ait SEM görüntüsü……..…….60
Şekil 4.24 NIP-3-S'e ait SEM görüntüsü……..……..61
Şekil 4.25 MIP-P-1'e ait TGA Grafiği……61
Şekil 4.26 NIP-P-1'e ait TGA Grafiği…….……62
Şekil 4.27 MIP-3-S'e ait TGA Grafiği……62
Şekil 4.28 NIP-3-S'e ait TGA Grafiği…….……63

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1 Katı faz ekstraksiyonunda kullanılan adsorbanlar …….…….……8
Tablo 2.2 Katı faz ekstraksiyonunda sıklıkla kullanılan çözücüler……..…9
Tablo 2.3 Molekül Baskılı Polimerlerin Sentez Teknikleri Karşılaştırılması.……19
Tablo 2.4 Moleküler baskılamada kullanılan başlıca fonksiyonel monomerler…….23
Tablo 2.5 Moleküler baskılamada kullanılan başlıca çapraz bağlayıcılar ve açık yapıları…….....25
Tablo 2.6 Moleküler baskılamada kullanılan başlıca başlatıcılar……...27
Tablo 3.1 LC-MS/MS sıvı sistemi akış özellikleri…….....37
Tablo 4.1 Kloramfenikol bileşiğinin batch metodu ile adsorpsiyon kinetiği …….……45
Tablo 4.2 Polimer kütlesi tarafından tutulan CAP konsantrasyonu…..……..45
Tablo 4.3 MIP-S-3, NIP-S-3, MIP-P-1 ve NIP-P-1'in Q(mg/g) değerleri...…...……...46
Tablo 4.4 MIP-P-1 polimerinin CAP adsorpsiyonu Scatchard grafiği verileri……..47
Tablo 4.5 NIP-P-1 polimerinin CAP adsorpsiyonu Scatchard grafiği verileri……...48
Tablo 4.6 MIP-S-3, NIP-S-3, MIP-P-1 ve NIP-P-1'in CAP adsorpsiyon miktarına kontak süresinin etkisi……..……..….50
Tablo 4.7 MIP-S-3, NIP-S-3, MIP-P-1 ve NIP-P-1'in Q(mg/g) değerleri.....……51
Tablo 4.8 MIP-P-1 polimeri için Q(mg/g) ve Baskılama faktörü değerleri...……...….52
Tablo 4.9 CAP bileşiğinin MIP-P-1, SupelMIP ve Oasis® HLB sorbentlerinin katı faz ekstraksiyonu ile elde edilen geri kazanım değerleri (%)……..…..52
Tablo 4.10 Farklı yıkama çözeltilerine göre MIP-P-1 ve NIP-P-1 için % geri kazanım değerleri…….……...……53
Tablo 4.11 MIP-P-1 polimerinin SPE ekstraksiyonunda CAP, FF ve TAP için geri kazanım değerleri……52
Tablo 4.12 CAP içermeyen MIP-P-1 FT-IR spektrum pikleri…..……...……...57
Tablo 4.13 CAP içeren MIP-P-1 FT-IR spektrum pikleri…...……..…….57
Tablo 4.14 NIP-P-1 FT-IR spektrumu pikleri……..…...58

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Keşfinden sonra, insanlarda ve hayvanlarda meydana gelen enfeksiyonların tedavisinde bir çığır açan antibiyotikler dünyada en fazla kullanılan ilaçlardandır. Antibiyotikler mikroorganizmaları öldüren ya da mikroorganizmaların çoğalmasını önleyen doğal veya sentetik yollardan elde edilen maddelerdir [1]. Etkiledikleri mikroorganizmalar ve etki mekanizmaları bakımından farklılık gösteren çok sayıda antibiyotik bulunmaktadır. Antibiyotiklerin etki etme şekilleri arasında etkiledikleri mikroorganizmanın hücre duvarını zayıflatmak, protein sentezinin önlemesi veya mikroorganizma için gerekli maddeleri yok etmek yer alır [2].

Dünya nüfusundaki artış ve yükselen yaşam standardı nedeniyle gerekli gıda ihtiyacının karşılanması için hayvan hastalıklarının bir sorun olmaktan çıkartılabilmesi ve hayvan verimliliğinin arttırılabilmesinde antibiyotiklerin kullanımı çok önemli bir konuma gelmiştir. Antibiyotikler, hastalıkların önlenmesi ve kontrol altına alınması amacıyla ilk olarak 1950'li yıllarda yemlere katılarak kullanılmıştır. Ülkemizde ve dünyada hayvansal gıda üretiminin yüksek verimli gerçekleşmesi için en etkili unsurlarından biri olan veteriner ilaçlarının içerisinde ilk sıralarda antibiyotikler gelir. Günümüzde hayvansal gıda üretiminde kullanılan hayvanların % 80'e yakını, yaşamlarında en az bir kez olsa da veteriner ilaçları ile tedavi edilmişlerdir [3].

Kloramfenikol (CAP), tiyamfenikol (TAP) ve florfenikol (FF) çeşitli hayvan hastalıklarının tedavisinde kullanılan geniş spektrumlu antibiyotiklerdir. Geçmişte insanlarda kolera, tifüs gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmış olan bu bileşiklerin günümüzde birçok ülkede insanlar üzerindeki kullanımı yasaklanmıştır. Kolay ulaşılabilir ve ucuz olması sebebiyle geniş çapta kullanımı sonucunda et, süt, yumurta,

bal gibi çeşitli gıdalarda kloramfenikol varlığı tespit edilmiştir. Kloramfenikolün analogları olan florfenikol ve tiyamfenikol CAP'ın önemli yan etkilerinden biri olan aplastik anemi tehlikesine yol açmadıkları için bu bileşiğin olası alternatifleri olarak önerilmektedir. Antibiyotik tedavisinin devam ettiği hayvanlardan elde edilen yumurta ve süt, tedavi sonrası yasal bekleme süresine uyulmadan kesilen hayvanlardan elde edilen et ve süt gibi hayvansal ürünlerde kalıntı bırakarak besin kirlenmesine yol açmaktadır. Besin değeri olan hayvanlara verilen bu bileşikler kolayca et, süt ve yumurta gibi hayvansal ürünlerin kirlenmesine yol açarak başta çocuklar olmak üzere bütün tüketicilerin sağlığını tehdit etmektedir.

Bu nedenle farklı matrikslerden CAP, TAP ve FF'ın seçici tanınmasında hızlı ve yüksek doğrulukta bir numune hazırlama ve tayin metodunun geliştirilmesi önemlidir. Bu doğrultuda moleküler baskılanmış katı faz ekstraksiyonunu, kalıp molekülü seçimli ve yüksek miktarda saflaştırılarak eldesini sağlamaları ve maliyetlerinin düşük olması ile yeni bir yol sağlayabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada, CAP, TAP ve FF'ın süt numunesinden seçici ekstraksiyonu için başarılı bir baskılanmış polimerlerin hazırlanması, hazırlanan polimerlerin katı faz ekstraksiyonu optimizasyonu ve karakterizasyonu amaçlanmıştır.

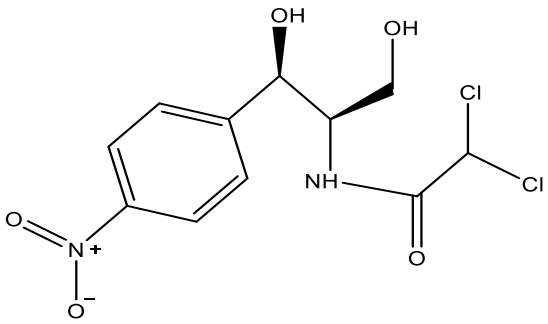
BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. Kloramfenikol ve Analogları

Kloramfenikol geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. 1947 yılında Burkholder tarafından *Striptomyces venezualea* kültüründen elde edilen kloramfenikolün kimyasal yapısı 1949 yılında açıklığa kavuşmuştur. Diğer antibiyotiklere kıyasla daha basit bir kimyasal yapıda olan kloramfenikol kimyasal yapısının açıklandığı tarihten itibaren daha ekonomik olması sebebiyle sentetik olarak hazırlanmaktadır [4]. Menenjit, tifo ve birtakım merkezi sinir sistemi enfeksiyonlarını tedavi etmek amacıyla kullanıldığı olmuştur.

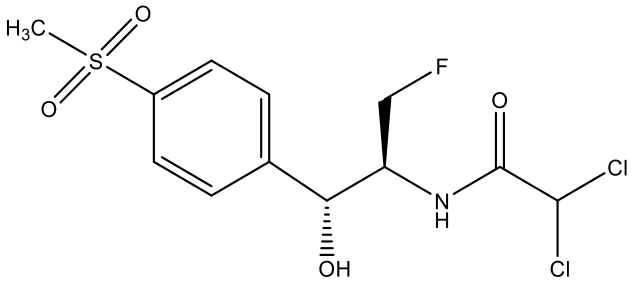
Kolay ulaşılabilir ve ucuz olması sebebiyle 1950'li yıllardan bu yana sağılan ve besin değeri olan hayvanların tedavisinde kullanılmıştır. Kloramfenikol aerobik ve anaerobik mikroorganizmalara karşı aktivite göstermektedir. Oral yollardan verilebildiği gibi kas içi ve damar içi yollardan da verilebilir. Verildikten sonraki ilk saatlerde hızlı bir şekilde kandaki antibiyotik yoğunluğu artar. Kloramfenikolün etki mekanizması bakterilerin kendisi için yaşamsal önem taşıyan proteinlerinin sentezini engellemesi esasına dayanır. Kloramfenikolün yeterli miktarda kan hücresi üretiminde eksiklik oluşması sonucunda gelişen kemik iliği yetmezliğine (aplastik anemi) ve kansere yol açma riskinin bulunduğu bilinmektedir [5]. Ayrıca kloramfenikol yetişkinlere göre özellikle yeni doğan çocuklarda metabolize olma hızı düşüktür. Pediatrik dozun aşıldığı durumlarda serumda biriken aktif kloramfenikol glukuronide çevrilip karaciğerden atılıması yeterli düzeyde olmaması sonucu bebeklerde dolaşım sistemini olumsuz etkileyen gri bebek sendromu ortaya çıkmaktadır.



Şekil 2.1 Kloramfenikol

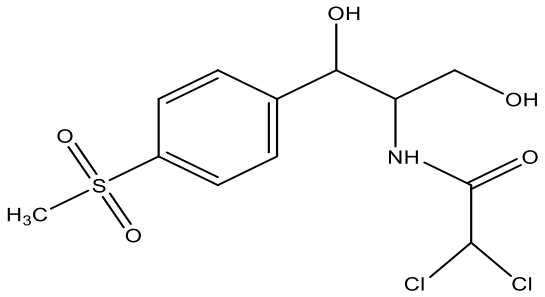
Kimyasal yapısı Şekil 2.1'de gösterilmekte olan kloramfenikol sarı veya beyazımsı açık gri değişen renklerde, keskin acı lezzetli, ince kristal halinde tozdur. Erime noktası 150.5 ile 151.5 °C olan kloramfenikol polar organik çözücülerde orta derecede, alkol ve eterde çok çözünür. Petrol eteri ve bitkisel yağlarda ise hiç çözünmez. Kuru toz halinde olan kloramfenikol oldukça dayanıklıdır. Fakat ışığa karşı hassasiyeti sebebiyle renkli şişelerde saklanması yerinde olur. Gerek toz gerekse çözelti halinde ısıya dayanıklıdır. Kloramfenikol molekülünde aromatik nitelikli bir nitro (NO_2) ve dikloroasetamid ($HN\text{-}COCHCl_2$) gruplarını bulunmaktadır. İkincil hirdoksil grubu kolaylıkla oksitlendiğinden ve nitro grubu da kolaylıkla indirgendiğinden dolayı oksitleyici ve indirgeyici kimyasallarla bir araya getirilmemesi gereklidir [4].

Kloramfenikol ve tiyamfenikolün yapısal analogu olan florfenikol beyaz-saman renkli bir tozdur [6,7]. Kloramfenikolün yapısında nitro ve hidroksil grubu yer alırken florfenikolün yapısında p-metil sülfonil grubu ile flor bulunmaktadır. Kimyasal yapısı Şekil 2.2'de gösterilen florfenikolde p-nitro grubu yer almadığından kloramfenikolün önemli yan etkilerinden biri olan aplastik anemi tehlikesine florfenikol yol açmaz, böylelikle besin değeri olan hayvanlarda kullanımı mümkündür [8, 9]. Aynı zamanda bakterilere karşı daha güçlü etkiye sahiptir. Bu nedenle bakterilere karşı geniş spektrumlu bir antibiyotik olan florfenikol enfeksiyöz hastalıkların tedavisinde güçlü potansiyele sahiptir [9, 10, 11]. Ayrıca yapılan laboratuvar çalışmalarında florfenikol, kloramfenikol ve tiyamfenikole kıyasla patojen mikroorganizmalara karşı daha etkin ve bronşiyal sekresyonlardaki düzeyinin solunum sistemi hastalıklarına sebep olan primer patojenler için gereken en düşük inhibitör konsantrasyonundan fazla olduğu tespit edilmiştir [12, 13].



Şekil 2.2 Florfenikol

Kloramfenikolün yapısında bulunan nitro grubu yerine metilsülfonil ($-CH_3SO_2$) grubunun getirilmesi sonucu elde edilen tiyamfenikol geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Şekil 2.3'te gösterilen tiyamfenikol amfenikol sınıfında yer almaktadır. Florfenikol gibi tiamfenikol'ünde yapısında kloramfenikolde bulunan p-nitro grubu bulunmadığı için aplastik anemiye yol açmaması nedeniyle kloramfenikol'e göre avantajlıdır.



Şekil 2.3 Tiyamfenikol

Birçok antibiyotikte olduğu gibi uzun süreli kullanımı sonucu amfenikollere karşı bakteri hücre duvarının geçirgenliğinin azalması sonucunda bakteriyel direnç gelişebilir. Antibiyotik kullanımı hayvansal kaynaklı gıdalarda kullanılan antibiyotiklerin kalıntılarının bulunmasına sebep olarak bu ürünleri tüketenlerin sağlığını tehdit etmektedir. Besin değeri olan hayvanlarda kloramfenikolün kullanımı Amerika Birleşik Devletleri, Kanada, Avusturalya ve Avrupa Birliği'ne üye ülkeler gibi birçok ülkede yasaklanmıştır [14]. Ülkemizde ise Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı'nın 19 Nisan 1993 tarihli ve 419 sayılı genelgesi ile kullanılması yasaklanmıştır [9]. Her ne kadar yasal olarak engel bulunsa da hayvanlardan elde edilen Asya orijinli gıdalarda (su ürünleri ve bal gibi gıdalar) kloramfenikole rastlanmıştır [15]. Avrupa birliği regülasyonu ile hayvansal kaynaklı gıdalarda kloramfenikol'e ait maksimum kalıntı

limiti (MRL) 0,3 ng g^{-1}, florfenikol için 100 ng g^{-1}, Tiyamfenikol için 50 ng g^{-1} olarak belirlenmiştir [16, 17]. Çin tarafından kloramfenikol'e ait belirlenen maksimum kalıntı miktarı ise 0,5 ng g-1'dir.

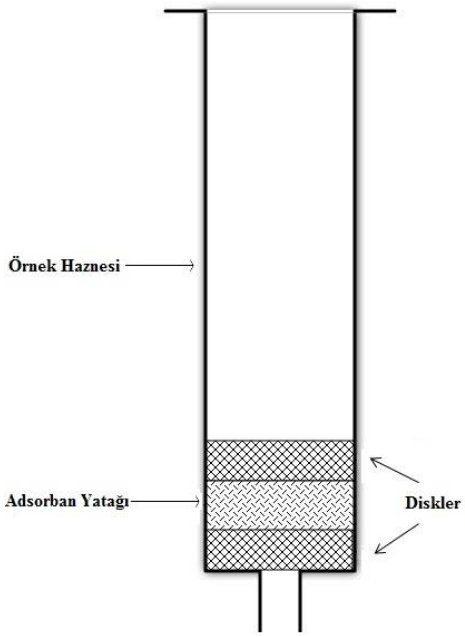
2.2 Katı Faz Ekstraksiyonu

Temelde sıvı-sıvı ekstraksiyonuna benzeyen katı faz ekstraksiyonunda (aynı zamanda sıvı-katı ekstraksiyonu) yer alan fazlardan bir tanesi sıvı iken diğeri katıdır. Katı faz ekstraksiyonu sıvı numunenin örnek molekülleri ile etkileşen bir adsorban içeren bir kolon, kartuş, bir tüp veya disk içinden geçtikten sonra, tutulmuş olan analitin uygun bir çözücü ile elüe edilmesi prensibine dayanır. SPE yöntemi günümüzde biyolojik ve çevresel örneklerin ön zenginleştirilmesi veya izolasyonunda kullanılmaktadır [18].

Örneğin ön zenginleştirmede, analizi yapılacak madde adsorbana bağlanarak katı fazda tutulur. İstenmeyen unsurlar, analizi yapılacak madde ile etkileşmeyen bir yıkama çözeltisi ile ortamdan uzaklaştırılır. Böylelikle analizinin yapılması istenen madde katı fazdan uygun bir elüsyon çözeltisiyle elüe edilir. Örneğin temizliğinde ise, asıl aranan madde katı ile etkileşime girmez. İstenmeyen bileşenlerin katı fazda tutulur. Özellikle örnekten zor ayrılan atık yağlar gibi maddelerin analizi yapılırken tercih edilen yöntemde, örnekteki istenmeyen unsurlar katı faz tarafından sıkı sıkıya tutulurlar. Bu yöntemde katı faz filtre işlevi görmektedir [19, 20, 21, 22]. Katı faz ekstraksiyonunda kullanılan klasik bir kolonunun yapısı, farklı boyutlarda SPE kolonları ve diskleri ve zaman kaybının en alt düzeye indirmek için kullanılan vakum manifoldu sırasıyla Şekil 2.4, Şekil 2.5 ve Şekil 2.6'da gösterilmektedir.



Şekil 2.4 Çeşitli SPE kolonları ve diskleri



Şekil 2.5 SPE kolonu yapısı



Şekil 2.6 Vakum Manifoldu

Katı faz ekstraksiyonunda tutunma işleminin gerçekleşeceği adsorbanlar ve çözücülerin önemi büyüktür. Katı faz ekstraksiyonunda tutunma işleminin gerçekleşeceği katı faz olarak genellikle yüksek adsorplama kapasitesine sahip ticari ve doğal adsorbanlar tercih edilir. Adsorban olarak sıklıkla kullanılan mineraller C_8 veya C_{18} organik gruplarla zincirlenmiş silikalardır. Gözenekli polistiren sıklıkla kullanılan bir organik sorbenttir. Eser miktardaki ağır metal iyonlarının analizinde katı faz olarak amberlit XAD şelatlanmış reçineler, naftalin içeren çeşitli katı faz ekstrantları, aktif karbon, iyon değiştirici reçineler, C60-70 ve silika jel kullanılır [23, 24, 25]. Katı faz ekstraksiyonunda kullanılan tutucu adsorbanlar ve sıklıkla kullanılan çözücüler sırasıyla Tablo 2.1 ve Tablo 2.2'de gösterilmektedir. Son yıllarda yapılan maliyet düşürme çalışmaları sonucunda doğadan elde edilen adsorbanlar (mikroorganizmalar, likenler, yosunlar) ile laboratuvarda basit bir işlem sonucunda üretilmiş adsorbanların kullanımı artmıştır.

Tablo 2.1 Katı faz ekstraksiyonunda kullanılan adsorbanlar [20, 21, 26].

Adsorban	**Kapalı Formulü**
Silika Jel	SiOH
Alumina	Al_2O_3
Florisil	$MgSiO_3$
Oktadesil (C_{18})	$(CH_2)_{17}CH_3$
Oktil (C_8)	$(CH_2)_7CH_3$
Etil (C_2)	CH_2CH_3
Siyano	CN
Fenil	C_6H_5
Siklohekzil	C_6H_{11}
Amino	NH_2
Diol	COHCOH
Kuarterner Amin	NR_4^+
Aromatik Sülfonik asit	C_6HSO_3H

Tablo 2.2 Katı faz ekstraksiyonunda sıklıkla kullanılan çözücüler

Çözücü	Kaynama Noktası (°C)	Dipol Momenti
Izooktan	99	0
Siklohekzan	81	0
Karbon tetraklorür	77	0
Kloroform	61	1,15
Metilen klorür	40	1,60
Tetrahidrofudran	66	1,63
Dietil eter	34	1,15
Etil Asetat	77	1,78
Aseton	56	2,88
Asetonitril	82	3,92
Isopropanol	82	1,66
Metanol	65	1,70
Su	100	1,85
Asetik Asit	118	1,70

2.2.1 Katı Faz Ekstraksiyonu Teknikleri

2.2.2.1 Batch Tekniği

Katı faz ekstraksiyonunda kullanılan adsorban, analiz edilmek istenen analitin bulunduğu çözeltiye ilave edilir. Katı faz ile çözelti birlikte mekanik veya ultrasonik olarak belirli bir sürede çalkalanır. Tutunma dengesi kurulmasının ardından süzme veya dekantasyon ile katı fazla çözelti ayrılır. Katı fazda tutulan analitler uygun çözücü kullanılarak katı fazdan ayrılır.

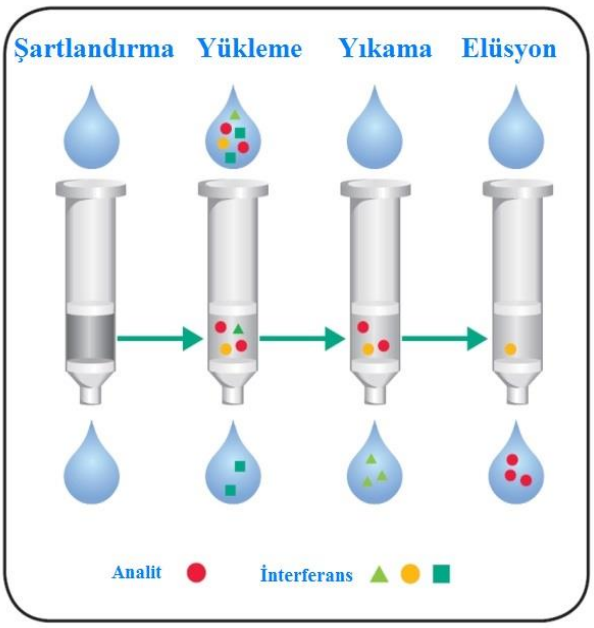
2.2.2.2 Kolon Tekniği

Kolon tekniği, batch tekniğine göre daha fazla kullanım alanı bulan bir tekniktir. Bu teknikte Şekil 2.4'te görülebileceği gibi mini kolonlar kullanılır. İlk olarak adsorban madde bu kolonlara sıkıca doldurulur. Adsorbanı aktif hale getirmek üzere analiti içeren örnek adsorban üzerinden geçirilmeden önce adsorban örnek çözücüsüne benzer bir

çözelti kolondan geçirilerek şartlandırılır. Şartlandırma işlemi ile aktif hale gelmiş olan adsorbandan örnek geçirilerek istenilen analitlerin kolonda tutunması sağlanır. Eğer istenmeyen maddeler adsorban üzerine tutunuyorsa bu türler düşük elüsyon gücü olan bir yıkama çözeltisinin kullanılarak kolondan uzaklaştırılır. Adsorban üzerinde sadece tutunması istenilen analitler izole edilmekte ve bu analitler kolondan uygun biz çözelti geçirilmesi ile daha küçük bir hacime elüe edilerler. Kolon tekniğinde büyük örnek hacimleri ile çalışabilmesinden ve tutulan analitin adsorbandan elüsyonu için küçük hacimlerde çözeltiye ihtiyaç duymasından dolayı büyük zenginleşirme faktörü elde edilebilir.

2.2.2 Katı Faz Ekstraksiyonu Basamakları

Basamakları Şekil 2.7'de gösterilen katı faz ekstraksiyonunda ilk basamağı olarak üzerinden numune geçirilmeden önce tutucu madde şartlandırılmalıdır. Şartlandırma uygun bir çözeltinin kolondan geçirilmesiyle tutucu maddenin aktive edilmesi ve matriksteki maddeler ile etkileşim için gerekli ortamı sağlanması amacıyla yapılır. Uygun şartlandırma çözeltisi olarak polar tutucu maddeler için apolar çözücüler, apolar tutucu maddeler için ise polar çözücüler kullanılmaktadır. Şartlandırma çözeltisinin hacmi yaklaşık olarak kolon hacminin 2-3 katıdır [20, 21].



Şekil 2.7 Katı faz ekstraksiyonu basamakları

İkinci basamakta, numune tutucu madde üzerinden geçirilir. Numune kolondan geçirilmesi yer çekimi ile yapılabildiği gibi vakum manifoldu kullanılarak zamandan kazanç sağlanabilir. Bu basamakta örnek molekülleri tutucu madde üzerinde alıkonur. Yükleme aşamasında, numunenin kolondan geçiriliş hızı örnek moleküllerinin alıkonmasını sağlayacak kadar düşük olmalı fakat fazla zamandan kaçınmak amacıyla optimum düzeyde ayarlanmalıdır.

Üçüncü basamakta, tutucu maddenin düşük elüsyon gücüne sahip bir çözücü kullanarak yıkanmasıdır. Bu işlemde tutucu madde üzerinde tutunmuş olan istenmeyen bileşenleri kolondan ayrılırken örnek molekülleri yer değiştirmeden tutunmuş olarak kalır.

Dördüncü basamakta, istenilen örnek moleküllerinin tutucu madde üzerinden uygun bir çözücü kullanılarak alınır.

2.2.3. Katı Faz Ekstraksiyonunun Avantajları

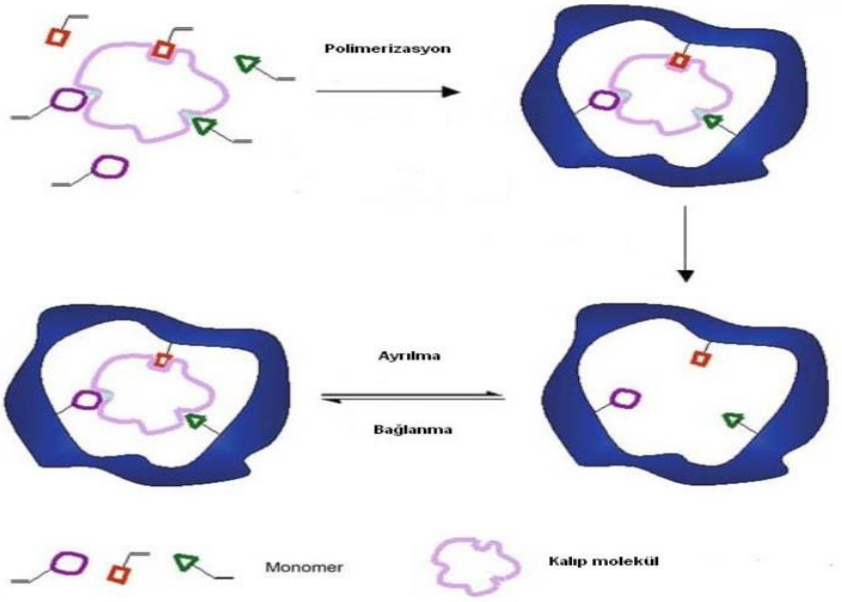
Katı faz ekstraksiyonunun, diğer ayırma ve zenginleştirme teknikleriyle kıyasla daha fazla tercih edilir olmasının sebepleri ve önemli avantajları aşağıdaki gibi sıralanabilir;

a) SPE metodu ile örnek hazırlanırken kullanılan çözücü ve ayıraç madde miktarının önemli ölçüde azalmasından dolayı ekonomiktir [19].
b) Örnek hazırlanırken SPE metodu daha hızlı sonuç verdiği için bu metotla daha az zaman harcanır [20, 21].
c) Örnek transferi minimum düzeyde olduğundan yüksek geri kazanımla çalışılan SPE metodunda elde edilen örnekler yüksek yoğunlukta ve saflıktadır [19, 27, 28].
d) SPE metodu, pratikliği ve kolaylığı dolayısıyla bütün laboratuvarlarda uygulanabilir bir metottur [20, 27, 28].
e) SPE metodunda çalışılan örnek, adsorban ve çözücü arasındaki çapraz bulaşma riski düşük olduğundan alınan sonuçlar yüksek doğruluktadır [20, 27].
f) Evaporasyona duyulan ihtiyaç en az düzeyde olduğundan SPE metodunda kararsız örnek oluşumuyla sık karşılaşılmaz [20, 27].

g) SPE metodunda işlenen örneğin miktarı az olduğundan sıvı-sıvı ekstraksiyonda karşılaşılan emülsiyon oluşması ile karşılaşılmaz [20].
h) SPE metodunda birden fazla örneğin aynı anda ve yüksek tekrarlana bilirlikte işlenebilmesini mümkün kılacak şekilde otomasyon sağlanabilir [20, 21, 29].
i) SPE metodunda az miktarda çözücü ve örnek kullanımındığı için analizi yapan analistlerin zehirli maddelerle teması daha azdır, çevreyi kirletme riski daha düşüktür [27, 29].

2.3 Moleküler Baskılanmış Polimerler

Aslında oldukça eski bir kavram olan moleküler etkileşim hakkında modern fikirlerin ortaya çıkması ilk olarak 1894 yılında Fischer'in enzim ve substrat arasındaki etkileşimi aydınlatan "anahtar-kilit" modelini ortaya atmasıyla başlamıştır. Bu modelde enzim molekülü yüzeyinde substrat molekülünün şekline uygun yapılar içermektedir. Buna göre bir anahtar gibi davranan substrat molekülü, enzimin bir kilit gibi uyumlu olan aktif bölgeleriyle etkileşmektedir. Bu modele dayanarak yapay olarak moleküler tanıma için "Moleküler Baskılama" olarak adlandırılan yeni bir teknoloji ortaya çıkmıştır. Molekül baskılama yöntemi iyonlar, organik moleküller ve biyomoleküllerin farklı matrikslerden yüksek seçicilikte ayrılması için polimer elde edilmesine dayanmaktadır. Elde edilen polimerin yüzeyinde bulunan hedef molekülün yapısına uygun yapılar ile hedef molekülün ya da hedef molekülün analogunun etkileşmesi sonucu etkili ve seçici bir ayrım gerçekleşir. Şekil 2.8'de görüleceği üzere moleküler baskılamada fonksiyonel monomerler ve kalıp molekül düzenlenerek kalıp diyebileceğimiz bir yapı oluşturarak polimerleşir. Polimerizasyon basamağı sonrasında yapıdan kalıp molekülün uzaklaştırılmasıyla hedef moleküle göre spesifik bağlanma bölgeleri oluşmaktadır.



Şekil 2.8 Moleküler baskılama tekniğinin şematik gösterimi

Moleküler baskılama teknolojisi ortaya çıktığı günden bu yana çok geniş uygulama alanı bulmuş ve bu alan halen de gelişmektedir. Günümüzde moleküler baskılanmış polimerin kullanıldığı katı faz ekstraksiyonu biyolojik örneklerde ve gıdalarda bulunan çok düşük miktarlarda bulunan analitler için izolasyon ve ön zenginleştirme amacıyla kullanılmaktadır. Moleküler baskılama yöntemi iyonlara, tıbbi ilaçlara, pestisitlere, aminoasitlere, stereoidlere ve şekerlere uygulanabilmesi yöntemin önemli yanlarında biridir. Hazırlama prosedürü kolay ve maliyeti düşük olan moleküler baskılanmış polimerler yüksek mekanik dayanıklılıkları, ısı ve basınca karşı gösterdikleri direnç, asit ve bazlara karşı gösterdikleri yüksek kararlılıkları sebebiyle oldukça dayanıklı olarak nitelendirilmektedir.

İdeal moleküler baskılanmış polimerlerin taşıması gereken özellikler olarak; sentez işleminin basit olması, polimerizasyon sonunda fonksiyonel polimerler elde edilmesi, kalıp molekülün baskılanmış polimerden kolaylıkla uzaklaştırılabilir olması, yüksek stabilitede homojen bağlanma bölgelerin bulunması, tekrar kullanılabilir olması, hedef molekül için yüksek seçicilikte olması, hızlı bağlanma kinetiğine sahip olması sayılabilir.

Moleküler baskılama üç temel adımdan oluşmaktadır.

Birinci adımda, kalıp molekülle etkileşebilecek fonksiyonel grupları içeren monomerler, kalıp moleküle kovalent veya non-kovalent etkileşimlerle bağlanarak bir ön kompleks oluşturur.

İkinci adımda, oluşan bu ön kompleks uygun bir çapraz bağlayıcı ile fonksiyonel monomer üzerinden polimerleştirilir.

Son adımda ise, polimerdeki kalıp molekülün uzaklaştırılması amacıyla baskılanmış polimer uygun bir çözücü ile yıkanır. Hedef moleküle uygun bir biçimde oluşan bu bölgeler seçici ve etkin olarak hedef molekülün tekrar polimere bağlanmasını sağlar.

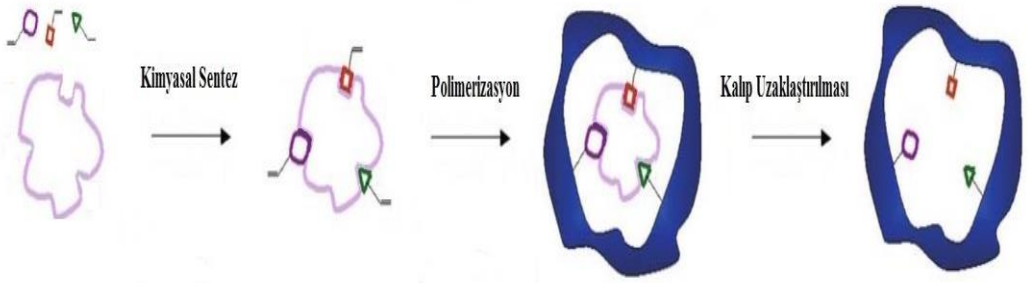
Moleküler baskılanmış polimerleri hazırlamak için kalıp molekül ve fonksiyonel monomerler arasındaki etkileşime göre iki farklı yaklaşım kullanılır. Her iki yaklaşımında avantajlı ve dezavantajlı olduğu yönleri bulunmaktadır. Seçim kalıp molekülün çeşidine, yapısına, seçiciliğin derecesine, zamana ve maliyete göre değişmektedir.

Bu yaklaşımlar:

1. Kovalent Baskılama
2. Non-Kovalent Baskılama

2.3.1 Kovalent Baskılama

Şematik gösterimi Şekil 2.9'da belirtilen ve Wulff vd. (1977) tarafından geliştirilen bu yaklaşımda polimerizasyon öncesinde fonksiyonel monomer kalıp molekülle birbirilerine kovalent bağlarla bağlanır ve polimerizasyon boyunca bu yapı kararlılığını korur. Polimerizasyondan sonra kalıp molekülün polimerden uzaklaştırılması zor bir işlem olan kovalent bağların kırılmasıyla gerçekleşir. Hedef molekül polimer ile etkileştiğinde ise polimer üzerindeki seçici bölgelerle aynı kovalent bağın yeniden oluşması ile bağlanır.



Şekil 2.9 Kovalent baskılama tekniğinin şematik gösterimi

2.3.1.1 Kovalent Baskılamanın Avantajları

Kovalent baskılamada fonksiyonel oluşan monomer-kalıp molekül kompleksi yüksek kararlılıktadır ve stokiyometriktir. Polimerizasyon öncesinde kararlı monomer-kalıp molekül kompleksi oluşturulduğu için bağlanma bölgelerinin homojen dağılımı sağlanır. Kovalent bağlarla oluşmuş kararlı monomer-kalıp molekül kompleksi, yüksek sıcaklık, yüksek veya düşük pH, polar çözücüler gibi farklı polimerizasyon koşullarının istenildiği gibi uygulanabilmesini mümkün kılar [30].

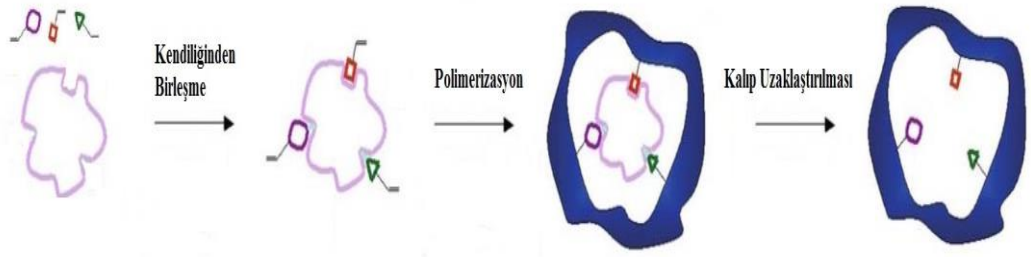
2.3.1.2 Kovalent Baskılamanın Dezavantajları

Kovalent baskılamanın daha az kullanım alanı bulmasının sebebi çok fazla dezavantaja sahip olmasıdır. Kovalent baskılamada monomer-kalıp molekül kompleksinin sentezi sık sık sorunlar çıkarabilir ve sentez işlemi ekonomik değildir. Polimerizasyondan sonra kalıp molekülün polimerden uzaklaştırılması zordur [31]. Hedef molekülün polimere tersinir olarak bağlanma sayısı sınırlıdır. Hedef molekülün moleküler baskılanmış polimer tarafından tanınması basamağında hedef molekül ile polimer arasında kovalent bağ oluşumu nedeniyle bağlanma kinetikleri yavaştır [32, 33].

2.3.2 Non-kovalent Baskılama

Şematik gösterimi Şekil 2.10'da belirtilen ve Mosbach vd. (1981) tarafından geliştirilen bu yaklaşımda polimerizasyon öncesinde monomer ile kalıp molekülün düzenlenmesi kovalent bağlarla değil hidrojen bağı, elektrostatik etkileşimler ve

koordinasyon bağı gibi non-kovalent etkileşimlerle kendiliğinden gerçekleşir. Kalıp molekül polimerizasyondan sonra uyun bir çözücü ile yapıdan ayrılır [34].



Şekil 2.10 Non-kovalent baskılama tekniğinin şematik gösterimi

2.3.2.1 Non-kovalent Baskılamanın Avantajları

Non-kovalent baskılamada kovalent monomer-kalıp kompleksinin sentezine gerek yoktur. Polimerizasyon öncesinde kalıp molekül etrafında fonksiyonel monomerlerin düzenlenmesi non-kovalent etkilesimlerle gerçekleştiği için daha basit ve sorunsuzdur. Polimerizasyon öncesi monomer ile kalıp molekülün düzenlenmesi için farklı bağlanma etkileşimleri kullanılabilir. Fonksiyonel monomer ile kalıp molekül arasındaki etkileşimlerin elde edilmesi için bileşenlerin çözelti içerisinde karıştırılması yeterlidir. Non-kovalent etkileşimler kovalent etkileşimlere göre daha zayıf olduğu için kalıp molekül baskılanmış polimerden bir sürekli-ekstraksiyon ile kolaylıkla uzaklaştırılabilir. Hedef molekülün tekrar bağlanma ve uzaklaştırılma kinetiği hızlıdır. Kovalent baskılama metoduna göre daha kolay olan non-kovalent baskılama metoduyla elde edilen polimerlerde kovalent bağlanmaya göre daha yüksek affiniteye sahip bağlanma bölgeleri oluşmaktadır [34].

2.3.2.2 Non-kovalent Baskılamanın Dezavantajları

Non-kovalent baskılamada kovalent olmayan etkileşimleri artırmak ve dolayısıyla etkin bir baskılama elde etmek amacıyla uygulanabilecek polimerizasyon koşullarının iyi seçilmesi gereklidir. Baskılama işlemi belli bir stokiyometrik oranda gerçekleşmez. Dengenin kompleks oluşum yönüne kayması amacıyla ortama aşırı

miktarda fonksiyonel monomer eklenir, bu da spesifik olmayan bağlanma bölgelerinin oluşumuna neden olur [34]. Non-kovalent polimerlerde bağlanma bölgelerinin dağılımı heterojen olduğundan bu durum spesifik olmayan bağlanmalara ve hedef molekülün zayıf moleküler tanımasına sebep olarak bağlanma seçiciliğini azaltır [35, 36].

2.3.3 Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Sentez Teknikleri

Moleküler baskılanmış polimerler laboratuvar şartlarında genellikle aşağıdaki gibi sentez teknikleriyle elde edilirler.

1. Yığın (Bulk) polimerizasyonu
2. Süspansiyon polimerizasyonu
3. Çöktürme polimerizasyonu
4. Çok Adımlı Şişme Polimerizasyonu
5. Yüzey Polimerizasyonu

2.3.3.1 Yığın (Bulk) Polimerizasyonu

İlk moleküler baskılanmış polimerler bulk polimerizasyonu yöntemi ile sentezlenmiştir. Bu polimerizasyon yönteminin basit ve evrensel olması, özel beceri ve karmaşık cihazlara ihtiyaç duymadan her yerde yapılabilir olması diğer polimerizasyon yöntemlerine göre daha tercih edilebilir olmasını sağlamaktadır. Bulk polimerizasyonunda polimerizasyon bileşenlerini (kalıp molekül, monomer, porojen, çapraz bağlayıcı, başlatıcı) karıştırıldıktan sonra ortamda bulunan serbest oksijen azot veya argon gazı ile uzaklaştırılır. Karışım optimum sıcaktıkta yaklaşık bir gün süreyle polimerleşmeye bırakılır. Sentezlenen polimerler bir yığın halindedir ve istenilen tanecik boyutuna getirilebilmesi için uygun bir yöntemle öğütülür. İstenilen boyuttaki tanecikler farklı boyutlardaki elekler kullanılarak elde edilir. Bulk polimerizasyonu yöntemi yaygın kullanılan bir polimerizasyon yöntemi olsa da sentezlenen polimerin öğütülmesi ve elenmesi bu yöntemin verimini olumsuz yönde etkilemektedir. Öğütme işlemi polimerin baskılanmış etkileşim bölgelerine zarar vererek polimerin performansını olumsuz yönde etkilenmesine sebep olur. Ayrıca öğütme ve eleme basamakları başlangıç polimer etkin bölgelerinde %50-75 kayba sebep olur [37].

2.3.3.2 Süspansiyon Polimerizasyonu

Süspansiyon polimerizasyonunda bulk polimerizasyonundaki gibi mekanik olarak öğütmeye ve elemeye gerek olmadan küresel tanecikler elde edilmektedir. Süspansiyon polimerizasyonu su ve organik faz olmak üzere iki fazlı bir yöntemdir. İstenilen küresel taneciklerin elde edilmesi için yüzey aktif madde veya stabilizatör kullanılır. Stabilizatör olarak sıklıkla polivinilalkol ve polivinilpirolidon çözeltileri kullanılır. Karıştırma hızı gibi fiziksel faktörler, monomer karışımı ve kullanılan kolloidal stabilizatörlerin kimyasal yapısı elde edilen küresel taneciklerin yapısını belirler [38, 39].

2.3.3.3 Çöktürme Polimerizasyonu

Çöktürme polimerizasyonunda süspansiyon polimerizasyonundaki gibi yüzey aktif madde veya stabilizatöre gerek yoktur. Çöktürme polimerizasyonu genel olarak bulk polimerizasyonuna benzemektedir. Çöktürme polimerizasyonunu yığın polimerizasyonundan ayıran fark çöktürme polimerizasyonunda porojenin aşırısının kullanılmasıdır. Çöktürme polimerizasyonunda monomer ve başlatıcının, porojen içerinde birleşmesiyle oluşan oligomerler polimerizasyon başladıktan sonra mikrokürecikleri oluştururlar. Çöktürme polimerizasyonu ile sentezlenen mikroküresel polimerler yüzey aktif madde kullanımına gerek olmaksızın çapraz bağlı yüzeyleri sayesinde birbirilerine yapışmadan sentezlenir [40, 41, 42].

2.3.3.4 Çok Adımlı Şişme Polimerizasyonu

Son yıllarda etkinlik ve kütle transfer özellikleri yönünden üstün nitelikte baskılı durgun fazların hazırlanmasına yönelik alternatif metotlar geliştirilmeye zaman ayrılmaktadır. Çok adımlı şişme polimerizasyonu ile üniform boyutta küresel partiküller elde edilebilir. Kontrol edilebilir çapta küresel formda hazırlanan partiküllere, demir oksit eklenmesiyle manyetik özellikte kazandırılabilir [43]. Her ne kadar çok adımlı şişme polimerizasyonu ile sentezlenen monodispers küresel parçacıklar kromatografik uygulamalar için ideal olsa da komplike sentez prosedür ve reaksiyon koşulları gerektirmesi yöntemin sınırlayıcı yönleridir. Çok adımlı şişme polimerizasyonunda sulu süspansiyonların kullanıması baskılamayı engelleyerek seçiciliği azaltmaktadır. Bunun

önüne geçmek için sulu emülsiyonların kullanımı gerekli olsa da baskılama işleminin verimliliği ve elde edilen parçacıkları seçiciliği için tatmin edici düzeyde değildir.

2.3.3.5 Yüzey Polimerizasyonu

Diğer polimerizasyon yöntemlerinde sınırlı kütle transferi ve sentez sonrası kalıp molekülün polimerden uzaklaştırılması problemini çözmek üzere geliştirilmiş bir yöntemdir. Ancak zaman alan polimerizasyon ve komplike sistemlere ihtiyaç duyması bu yöntemin kısıtlayıcı unsurlarıdır. Yüzey baskılamada altın veya karbon gibi uygun bir substrat üzerine MIP filmi oluşturulmaktadır. Bu yöntemle hazırlanan MIP filmleri kuvarz kristal mikroterazi veya yüzey plazmon rezonans sensör elektrotları olarak kullanılmaktadır [44].Farklı polimerizasyon yöntemlerinin birbirilerine göre çeşitli üstün ve zayıf olduğu noktalar mevcuttur. Bu noktalar Tablo 2.3'te görüldüğü şekilde özetlenebilir.

Tablo 2.3 Molekül Baskılı Polimerlerin Sentez Teknikleri Karşılaştırılması [45].

Teknik	Avantajları	Dezavantajları
Yığın (Bulk) Polimerizasyonu	Basit ve evrensel polimerizasyon Özel beceriye ve karmaşık cihazlara gerek olmaması	Öğütme ve eleme basamağı Düzensiz parçacık boyutu ve şekli Düşük performans
Süspansiyon Polimerizasyonu	Küresel parçacıklar Yüksek tekrarlanabilirlik	Suyun çoğu baskılama prosedürü ile uyumsuz olması Yüzey aktif polimer gerekliliği
Çöktürme Polimerizasyonu	Baskılanmış mikrokürecikler Üniform boyut ve yüksek verim	Fazla kalıp molekül kullanımı Yüksek seyreltme faktörü
Çok Adımlı Şişme Polimerizasyonu	İstenen çapta monodispers küreciklerin eldesi HPLC için ideal parçacıklar	Komplike prosedür ve reaksiyon koşulları Sulu emülsiyon gerekliliği
Yüzey Polimerizasyonu	Monodispers ürün İnce baskılı tabakalar	Komplike sistem Zaman alan polimerizasyon

2.3.4 Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Uygulama Alanları

Molekül baskılama yöntemi ile elde edilen polimerler farmakolojik, analitik ve biyolojik seçici moleküler tanıma alanlarında yoğun bir sekilde kullanım alanı bulmaktadır [46]. Moleküler baskılanmış polimerlerin kullanımına yönelik çalışmalar katı faz ekstraksiyonunda, kromatografik çalışmalarda ve sensör uygulamalarında sürekli artmaktadır [47, 48, 49].

Moleküler baskılanmış polimer katı faz ekstraksiyonu (MISPE) yöntemi örneğin seçimli ayırımını sağlaması, ortamdan istenmeyen diğer bileşiklerin uzaklaştırılması ve ortamdan ayırımı sağlanan molekülün aynı zamanda zenginleştirilmesini açısından son yıllarda MIP'lerin yaygın kullanıldığı alanlardan biri olmuştur. MISPE, ilaç, gıda, biyolojik ve çevre örnekleri ve diğer gerçek örnekler ile yapılan çalışmalarda kullanılmaktadır [37].

Moleküler baskılanmış polimerler yüksek seçicilik gösterdikleri için çeşitli kromatografik çalışmalarda da kullanım alanı bulmaktadır. Moleküler baskılanmış polimerlerlerin kromatografide ilk kullanım alanlarından biri sıvı kromatografisinde sabit faz olarak kullanılmalarıdır. İlk uygulamalarda genellikle yığın polimerizasyonu yöntemi ile sentezlenmiş polimerler kullanılmış olsa da bu teknikte sentezlenen polimerlerin kırılması, öğütülmesi ve elenmesi gerekliliği yüzünden bu yöntemde elde edilen polimerlerin homojen bağlanma bölgelerine sahip olmasını olumsuz yönde etkilemektedir. Bu durum karşısında düşen verimi yükseltmek için diğer polimerizasyon teknikleriyle sentezlenen polimerlerin kullanımını için yapılan çalışmalar arttmıştır. Moleküler baskılanmış polimerlerler sıvı kromatografisinde özellikle rasemik karışımdaki birçok bileşiğin ayrılmasında kullanılmaktadır. Bu yöntemle yapılan ilk çalışma Mosbach vd. tarafından gerçekleştirilmiş olup bu çalışmada moleküler baskılanmış polimerler kullanılarak amino asit türevlerini birbirinden ayırmışlardır [50]. Molekül baskılanmış polimerler kromatografik çalışmalarda sıvı kromatografisinde kullanıldığı gibi ince tabaka kromatografisinde(TLC) de kullanılmaktadır. Moleküler baskılanmış polimerler $CaSO_4$, etanol-su ile karıştırılarak macun haline getirilir ve cam plakaların yüzeyine kalınlığı ~0,2 nm olacak şekilde kaplanır. Gece boyu kurutulan sistemlere metanolde çözünen örnekler uygulanır.

Moleküler baskılanmış polimerler son yıllarda kimyasal sensörlerde molekül tanıma membranı veya tabakası olarak kullanılmaktadırlar [51]. Sensörler, bir örnek matriksinde analitin doğrudan/dolaylı yoldan ölçümü için kullanılırlar. Kalıp molekülün tanınması amacıyla birçok biyomolekülün (enzim, antikor, mikrop) kullanımı teorikte mümkün olsa da kullanılan bu biyomoleküllerin asit ve bazlara, ısıya ve organik çözücülere karşı yüksek kararlılık göstermemeleri sistemlerin pratikte kullanımını olumsuz yönde etkiler. Bu koşullara karşı gösterdikleri yüksek kararlılıkla ile dayanıklı olarak nitelenen moleküler baskılanmış polimerler son yıllarda, sensörlerin geliştirilmesi üzerine uğraşan bilim insanlarının ilgisini çekmektedir.

2.3.5 Moleküler Baskılanmış Polimer Sentezinde Kullanılan Temel Bileşenler

Moleküler baskılama işleminde; kalıp molekül, fonksiyonel monomerler, çapraz bağlayıcı, porojen(çözücü) ve başlatıcı kullanılmaktadır.

2.3.5.1 Kalıp Molekül

Moleküler baskılanmış polimerlerin sentezinde kalıp moleküller, fonksiyonel monomerler ile kovalent veya non-kovalent etkilerle düzenlenebilmesi baskılamanın başarısı açısından çok önemlidir. Ancak tüm moleküller, molekül baskılı polimer sentezinde kalıp molekül olarak kullanılmaya uygun değildirler. Bir molekülün kalıp molekül olarak kullanılabilmesi için monomerle kompleks yapacak fonksiyonel grupları içermesi, organik çözücülerde çözünebilmesi, polimerizasyon reaksiyonunu engelleyecek veya yavaşlatacak gruplar içermemesi ve polimerizasyon şartlarında kararlı kalabilmesi gibi özelliklere sahip olması gereklidir. İlaçlar, aminoasitler, karbonhidratlar, proteinler, nükleotid bazlar, hormonlar, pestisitler, koenzimler ve iyonlar kalıp molekül olarak kullanılabilir [52].

Baskılama sonrasında kalıp molekülün uzaklaştırılması ile polimer üzerinde oluşan bu oyuklar hedef molekülün fiziksel ve kimyasal karakteristikleriyle eşleştiği için hedef molekülün seçici ve etkin olarak tekrar polimere bağlanmasını sağlar.

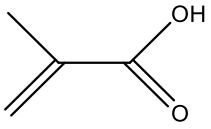
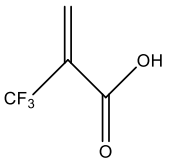
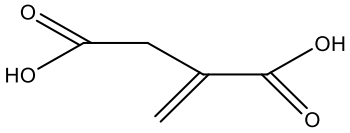
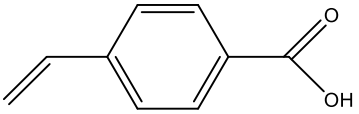
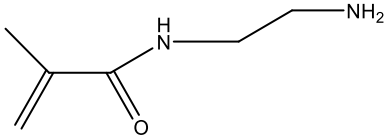
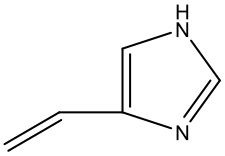
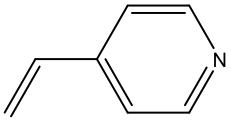
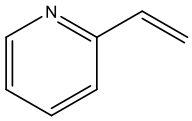
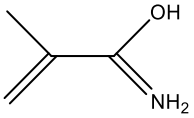
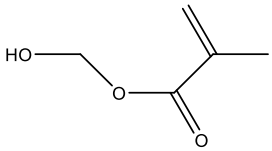
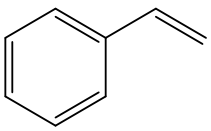
Kalıp molekül olarak kullanılması düşünülen molekülün zor elde edilmesi veya yüksek maliyeti söz konusu olduğunda kalıp molekül yerine kalıp molekülün fiziksel ve

kimyasal özelliklerini sağlayan vekil moleküller kalıp molekül yerine kullanılabilir [53]. Ayrıca kalıp molekül ile fonksiyonel monomerin düzenlenmesi non-kovalent etkileşimlerle gerçekleştiyse kalıp molekülün tamamının polimerden uzaklaştırılamaması sonucunda polimerde kanama oluşabilir. Bu da girişime sebebiyet verir. Kalıp molekülün polimerden kolaylıkla uzaklaştırılamaması durumda da kalıp molekülün fiziksel ve kimyasal özelliklerini sağlayan vekil molekül kullanımı girişimi engellemek üzere tercih edilebilir [54].

2.3.5.2 Fonksiyonel Monomer

Moleküler baskılanmış polimerlerin sentezinde kullanılan kimyasallardan biri olan fonksiyonel monomerin kalıp molekül ile kararlı bir kompleks oluşturabilmesi ve kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki geri-bağlanma kinetiği üzerindeki etkisi göz önüne alındığında etkin bir baskılama açısından kritik öneme sahip olduğu görülmektedir. Uygun fonksiyonel monomerin seçimi fonksiyonel monomer-kalıp molekül kompleksinin baskılama sürecinde kararlı kalması açısından çok önemlidir [55]. Seçilen fonksiyonel monomer ile kalıp molekülün fonksiyonel grupları arasındaki uyuşma baskılamanın kalitesini arttırmaktadır. Uygun fonksiyonel monomerin seçiminin yanı sıra ideal fonksiyonel monomer/kalıp molekül oranı non-kovalent etkileşimlerin kullanıldığı molekül baskılamada baskılamanın başarısını ayrıca etkilemektedir. İdeal fonksiyonel monomer/kalıp molekül oranı ise yapılacak çalışmalarla bulunabileceği gibi bilgisayarda modelleme yöntemiyle de bulunabilir. Moleküler baskılamada en çok kullanılan fonksiyonel monomer metakrilik asit(MAA)'tir. Metakrilik asit amfoterik doğasından dolayı iyon-iyon, iyon-dipol, dipol-dipol gibi moleküller arası etkileşimlere girmeye uygundur.

Tablo 2.4 Moleküler baskılamada kullanılan başlıca fonksiyonel monomerler

Adı	Monomerin Açık Formülü	Karakteri
Metakrilik Asit		Asidik
Triflorometil akrilik asit		Asidik
İkatonik Asit		Asidik
p-vinilbenzoik asit		Asidik
N-(2-aminetil)-metakrilamid		Bazik
4-(5)-vinilimidazol		Bazik
4-vinilpiridin		Bazik
2-vinilpiridin		Bazik
Metakrilamid		Nötral
2-Hidroksimetil metakrilat (HEMA)		Nötral
Stiren		Nötral

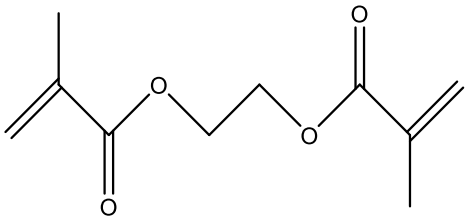
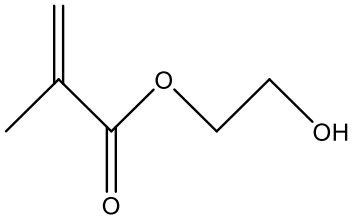
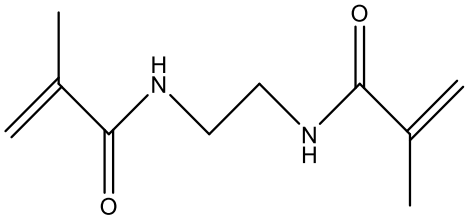
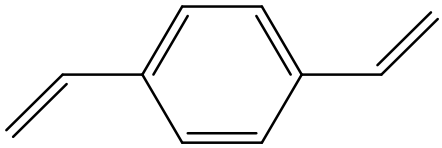
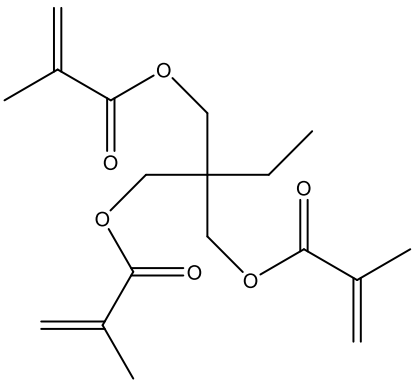
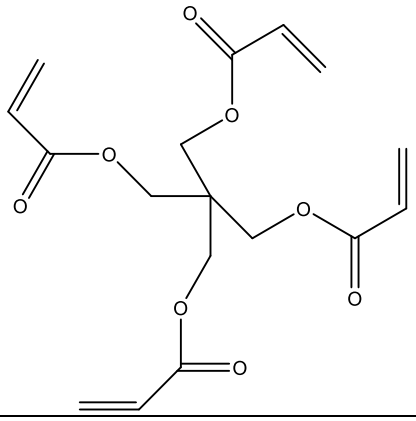
2.3.5.3 Çapraz Bağlayıcılar

Uygun baskılama stratejisine karar verilmesi ve bağlanma bölgelerinin oluşturulması baskılamanın ilk basamağıdır. Sonraki adım polimerin hazırlanmasıdır. Moleküler baskılanmış polimerlerin sentezinde diğer bir unsur olan çapraz bağlayıcılar baskılanmış molekülün bağlanma bölgelerinin kararlılığı ve kalıp molekülün polimerden uzaklaştırılması sonrası kararlı polimer ağ örgüsü oluşması açısından kritik öneme sahiptir. Çapraz bağlayıcılar ile monomerlerin birbirileriyle uyum içinde olmaları baskılamanın kalitesi açısından önemlidir. Ayrıca polimerizasyonda kulanılan çapraz bağlayıcının fonksiyonel monomerlere olan mol oranı da çok önemlidir. Bu mol oranı çok küçük olduğunda kalıp molekülün bağlanma bölgeleri birbirilerine aşırı yaklaşır ve birbirilerinden bağımsız olarak bir fonksiyon göstermezler. Eğer mol oranı çok büyük tutulursa çapraz bağlayıcının fonksiyonel monomerlerle veya kalıp molekülle gösterebileceği non kovalent etkileşimler moleküler baskılamanın etkisini azaltabilir [34].

En başarılı non kovalent baskılama sistemleri fonksiyonel monomer olarak metakrilik asit ve çapraz bağlayıcı olarak etilen glikol dimetakrilat (EGDMA)'ın kullanıldığı sistemlerdir [56].

Moleküler baskılanmış polimerlerin hazırlanmasında kullanılan başlıca çapraz bağlayıcılar aşağıda listelenmiştir.

Tablo 2.5 Moleküler baskılamada kullanılan başlıca çapraz bağlayıcılar ve açık yapıları

Adı	Çapraz Bağlayıcının Açık Formülü
Etilen glikol dimetakrilat (EGDMA)	
2-hidroksi-etil-metakrilat	
N,N' Etilen bis metakrilamid	
p-divinil benzen (DVB)	
Trimetilpropan trimetkrilat	
Penta eriotritol tetraakrilat	

2.3.5.4 Porojen(Çözücü)

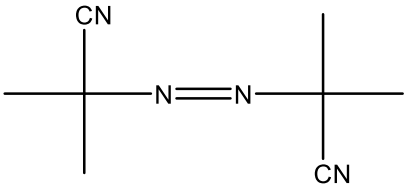
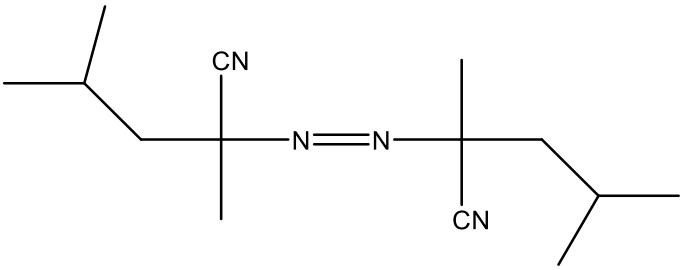
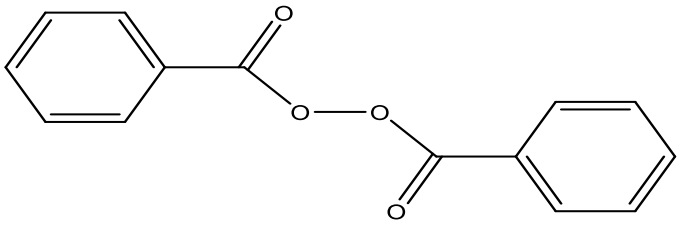
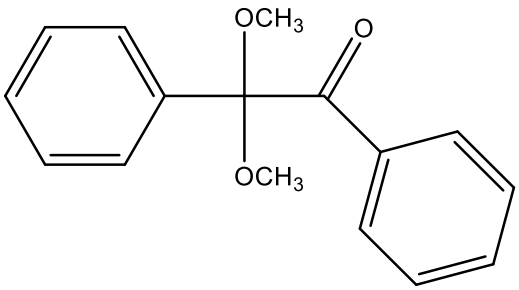
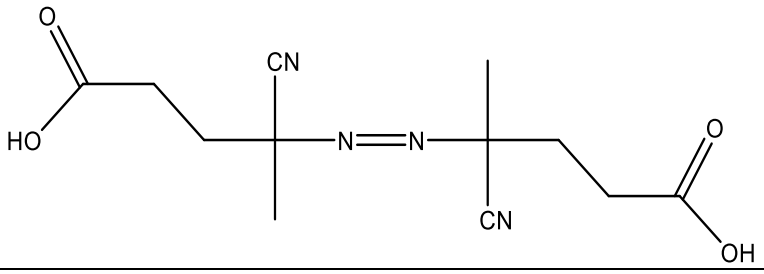
Hem baskılama işlemi ve hem de elde edilen polimerin morfolojisi ve sertliği, polimer üzerinde oluşan hedef moleküle özgü oyukların yapısı ve dağılımı açısından polimerizasyon için seçilen çözücünün seçimi ve miktarı çok önemlidir [57]. Polimer sentezinde kullanılacak çözücü tüm bileşenlerin aynı fazda bir araya gelmesini sağlamasından dolayı da ayrıca önem taşır. Porojen olarak isimlendirilmesinin sebebi ise tüm bileşenleri tek fazda tutma görevinin yanı sıra polimerdeki boşlukların oluşmasını gerçekleştirerek gözenekli yapılar elde edilmesinde önemli rol oynamasıdır. Kovalent baskılama polimerizasyonunda porojenin sadece polimerizasyonda kullanılacak bileşenleri çözmesi yeterli görülmektedir. Non-kovalent baskılama polimerizasyonunda ise porojenin bileşenleri çözmesinin yanı sıra kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki kompleksin oluşumunu ve stabil kalmasını destekleyerek baskılamanın başarısını arttırma gibi kritik bir görevi de mevcuttur. Ayrıca polimerizasyon işleminde uygulanan ısının eşit yayılmasını sağlayarak ısı artışı olan bölgelerde istenmeyen yan ürünlerin oluşmasını engellemektir.

2.3.5.5 Başlatıcılar

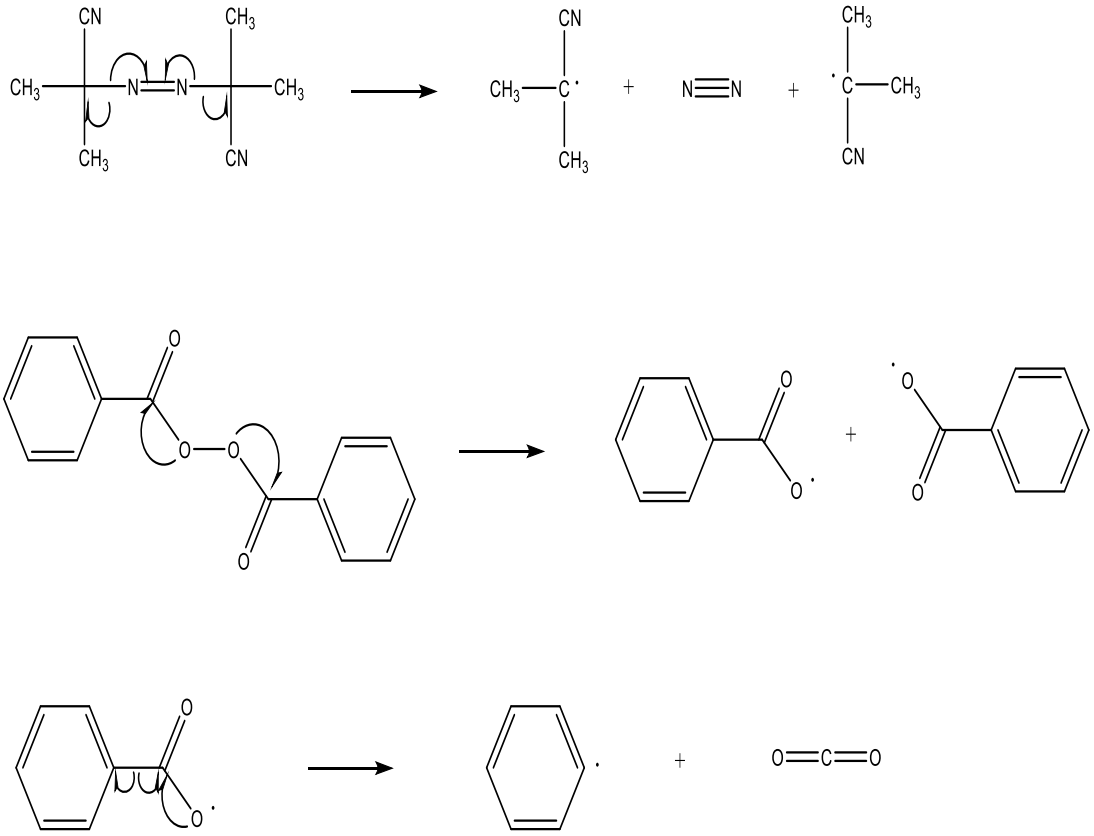
Moleküler baskılanmış polimerlerin sentezinin diğer unsurları ile kıyaslandığında başlatıcılar genellikle en az miktarlarda kullanılanlarıdır. Başlatıcılar, serbest radikal polimerizasyonun başlaması için kullanılan radikal kaynaklardır.

Polimerizasyonun başlaması için başlatıcıların radikal haline dönüşümü gerekmektedir. Bu dönüşüm başlatıcının kimyasal yapısına bağlı olarak ısı, ışık, kimyasal ve elektrokimyasal yollarla gerçekleşir. Serbest radikal polimerizasyonu genellikle radikal başlatıcının ısı etkisiyle bozunmasıyla başlar. Ancak monomer ile kalıp molekül arasında non-kovalent etkileşimler yeterince güçlü olmadığı durumlarda ısıl bozunma tercih edilmez. Böyle durumlarda ısıl bozunma yerine UV bozunma tercih edilir ve daha düşük sıcaklıklarda kullanılan fotokimyasal başlatıcılar tercih edilir. Kullanılan kalıp molekülün termal ve UV stabilitesi başlatıcı seçilirken gözetilen önemli faktörlerden biridir. [58]

Tablo 2.6 Moleküler baskılamada kullanılan başlıca başlatıcılar

Adı	Başlatıcının Açık Formülü
Azobisizobutironitril (AIBN)	
Azobisdimetilvaleronitril (ABDV)	
Benzoil peroksit (BPO)	
Dimetilasetal benzil	
4,4'-azo(4-siyanovalerik asit)	

Azobisnitrillerin bozunması da termal (ABDV 40°C; AIBN 60°C) veya ultraviyole ışınları ile gerçekleşir. Azobisizobutironitril (AIBN) ve Benzoil peroksit (BPO)'in termal uyarılarak C-Merkezli radikal oluşturma reaksiyonları Şekil 2.11'de gösterilmektedir



Şekil 2.11 Azobisizobutironitril (AIBN) ve Benzoil peroksit (BPO)'in serbest radikal oluşum reaksiyonları

Serbest radikal polimerizasyonu mutlaka inert ortamda gerçekleşmelidir. Eğer serbest radikal polimerizasyonunun gerçekleştiği ortamda oksijen bulunrsa, oksijen serbest radikale peroksi radikal formunda bağlanması sonucu ortamda bulunan polimer, monomerle ve diğer bileşenlerle reaksiyona girer. Bunu engellemek üzere oksijenin ortamdan uzaklaştırılması amacıyla ortamdan inert bir gaz ile purge edilir.

2.3.6 Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Karakterizasyonu

Moleküler baskılanmış polimerlerin çeşitli çözücülerde çözünürlükleri düşük olduğu için spektroskopik yöntemlerle karakterizasyonları zordur, ancak aşağıda belirtilen yöntem ve cihazlar kullanılarak kimyasal ve morfolojik karakterizasyonları temel olarak 2 başlık altında mümkündür.

2.3.6.1 Kimyasal Karakterizasyon

2.3.6.1.1 Fourier-Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR)

Infrared spektroskopisi (IR) moleküldeki bağların titreşim frekanslarını ölçerek fonksiyonel grupların aydınlatılması için bilgi veren bir tür titreşim spektroskopisidir. IR ışınlarının enerjisi moleküldeki bağları bozmaya veya elektronik uyarımına yetmez. IR ışınları soğurulduğu molekülün titreşim ve dönme düzeylerini uyarır. Baskılanmış polimerlerin FTIR spektrumları kolayca alınabilir ve daha sonra fonksiyonel grupların gözlenebileceği dalga boyu aralıklarını gösteren kataloglar incelenerek polimer bileşiminin hakkında bilgiler elde etmek kullanılabilir [59]. Aynı zamanda polimerizasyon öncesi düzenlenen fonksiyonel monomer ve hedef molekül arasındaki etkileşimler ve hedef molekülün polimere yeniden bağlanması FTIR spektroskopisi kullanılarak karakterize edilebilir [60].

2.3.6.1.2 UV Spektroskopisi

UV spektroskopisi moleküler baskılı polimerlerin sentezinde hedef molekülün fonksiyonel monomerler ile etkileşime girmesi sırasında hedef molekülün absorbans değişikliklerini ölçerek hedef-molekül-fonksiyonel monomer etkileşiminin etkinliği hakkında bilgi verir. Polimerizasyon öncesi ürünler için IR spektroskopisi de molekülün ve kompleks yapının titreşim sinyalleri ölçülerek UV spektroskopisine tamamlayıcı olan bilgiler verir [60].

2.3.6.1.3 Katı Hal NMR'ı

NMR teknikleri çözelti içinde çalışma ihtiyacını karşıladığı için bu nedenle çözünür olmayan türlerin NMR spektrumlarının alınması için katı hal NMR'ı gereklidir. Süspanse hal NMR'ıyla kıyaslandığında MIP çalışmalarında katı hal NMR'ı daha yararlıdır. H-NMR titrasyon deneyleri ise bazlar ve karboksilik asitler arasında hidrojen bağı oluşumunun gözlemlenmesine olanak sağlamaktadır. Bu teknikler moleküler baskılama için uyarlandığında, polimerizasyon öncesi çözeltide kompleks oluşumunun aydınlatılması ve etkileşimin olduğu spesifik bölgelerin tanımlanması için gerekli bilgiler elde edilir [61].

2.3.6.2 Morfolojik Karakterizasyon

2.3.6.2.1 Civa Yüzey Porozimetresi

Civa yüzey porozimetrisi sabit bir kütledeki kuru polimerden basınç altında civanın geçirilmesine dayanmaktadır. Her ne kadar civa yüzey porozimetrisi genellikle daha büyük (makro) gözeneklerin taranmasında daha hassas olsa da civa yüzey porozimetrisi kullanılarak elde edilebilecek bilgiler, azot soğurma porozimetresi kullanılarak elde edilebilecek bilgiler ile benzerdir [59].

2.3.6.2.2 Azot Soğurma Porozimetresi

Azot soğurma porozimetrisi sabit bir kütledeki kuru polimerin sabit birkaç farklı basınçtaki gaza (genelde azot) maruz bırakılmasına dayanmaktadır. Basıncının bir fonksiyonu olarak emilen gaz miktarının hesaplanması ile spesifik yüzey alanından ($m^2\ g^{-1}$), spesifik gözenek hacminden (ml g^{-1}), ortalama gözenek çapından ve gözenek boyutu dağılımından sorpsiyon izotermleri elde edilir. Bu metod orta (meso-) ve küçük (mikro-) çaplı gözeneklerin detaylı analizi için büyük avantajlar içermektedir. (IUPAC boyutu < 2 nm olan gözenekleri mikrogözenek olarak, boyutu 2 nm ile 50 nm arasında olanları mezogözenek olarak; boyutu 50 nm'den büyük olanları makrogözenek olarak tanımlamaktadır) [59].

2.3.6.2.3 Solvent Tutulum Denemeleri

Moleküler baskılı polimerler kuru ve solvent fazında da değişmez halde gözenekler içerirler. Solventler bu gözeneklere ulaşmak için kullanılabilirler. Polimer tarafından bu gözeneklere nüfus ederek tutulan solvent miktarı ölçülerek polimerin gözenek hacmi ml g^{-1} cinsinden hesaplanır [62].

2.3.6.2.4 Mikroskopik Yöntemler (SEM)

Mikroskopik yöntemler baskılanmış polimerleri derinlemesine incelemek üzere farklı çeşitlerde uygulanabilir. Işık mikroskobu polimer küreciklerinin yapısal bütünlüğününün doğrulanması için kullanılırken taramalı elektron mikroskobu (SEM) ise makro gözenekleri görüntülemek için kullanılır [59].

BÖLÜM 3

MATERYAL ve METODLAR

3.1 Materyal

3.1.1 Süt Örneği

Bu çalışma kapsamında yapılan deneylerde süt örnekleri olarak ulusal bir firmanın ürünleri kullanılmıştır.

3.1.2 Kullanılan Kimyasallar

Bu çalışma kapsamında yapılan deneylerde kullanılan kloramfenikol (CAP), tiyamfenikol (TAP), florfenikol (FF), MSTFA (N-metil-N-(trimetilsilil)trifloroasetamid) Fluka A.G.'den, Polivinil alkol (PVA), 2,2'-azobis(izobütironitril) (AIBN) Sigma'dan, Etilen glikol dimetakrilat (EGDMA), metakrilik asit (MAA) piridin ve kullanılan çözücüler Merck A.G.'den firmalarından sağlanmıştır.

Deneylerde Elga Accessories– Reservoir'dan elde edilen su kullanılmıştır.

3.1.3 Kullanılan Cihazlar

Bu çalışma kapsamında yapılan deneylerde LC-MS/MS (Agilent 6460 Jet Stream Triple Quad, CA, USA), Trace GC-DSQII MS (Thermo Scientific, USA), FAR-FT-IR (Perkin Elmer, USA), Tek Işın Spektrofotometresi (OPTIZEN POP UV / Vis, China), TGA Cihazı (Seico SII TG/DTA 6300, Japan), SEM (Zeiss Gemini Ultra Plus, Germany), ultrasonik banyo (Bandelin Sonorex-RK106, Germany), çalkalayıcı (Wiseshake® SHR-2D,DAIHAN SCI, Korea), blok ısıtıcı(Stuart SBH.130D, UK),

rotary evaporatör(IKA® RV 10, Germany),manyetik ısıtıcı –karıştırıcı(IKA® C-MAG HS10, Germany), filtre kağıdı (Macherey-Nagel, Germany), vakum pompası (Rocker 300, UK) kullanılmıştır.

3.2 Metodlar

3.2.1 Kloramfenikol Baskılanmış Polimerlerin Sentezi

3.2.1.1 Süspansiyon Polimerizasyonu ile Sentezlenen Polimerler

3.2.1.1.1 MIP-1-S Sentezi

0,0824 g CAP 15 ml metanol : toluen (1:1) karışımında çözüldü. 0,1 ml MAA eklendikten sonra ön kompleks oluşturmak amacıyla oda sıcaklığında 30 dakika manyetik karıştırıcı da karıştırıldı. Üzerine 5 ml EGDMA ve 0,0287g AIBN ilave edildikten sonra oda sıcaklığında 10 dakika daha manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Ayrı bir beherde daha önceden hazırlanmış olan %0,4'lük PVA çözeltisi polimerizasyonun gerçekleşeceği balona ilave edildi. Polimerizasyon öncesinde argon gazı ile 10 dakika purge edildikten sonra balon hava girişini engelleyecek şekilde kapatıldı. Balon 150 rpm'de karıştırılarak 55°C'de 24 saat bekletildi.

Elde edilen baskılı polimerden CAP'ın uzaklaştırılması için MIP 50 ml metanol :asetik asit (9:1) karışımıyla ultrasonik banyoda 15 dakika sonike edildi. MIP beyaz bant süzgeç kağıdı kulanılarak süzüldü. Bu işlem iki defa tekrarlandıktan sonra süzgeç kağıdında kalan MIP soxhlet ekstraksiyonu kullanılarak 200 ml metanol:asetik asit (9:1) karışımıyla 72 saat süreyle reflux edildi.

Reflux sonrasında asetik asitin polimerden uzaklaştırılması amacıyla polimer 50 ml metanol ile ultrasonik banyoda 15 dakika sonike edildi. Polimer beyaz bant süzgeç kağıdı kullanılarak süzüldü. Bu işlem üç defa tekrar edildi. Baskılanmış polimer 50 ml metanol ile ultrasonik banyoda 15 dakika sonike edilip beyaz bant süzgeç kağıdı kullanılarak süzüldükten sonra süzüntü de CAP varlığına bakıldı. Süzgeç kağıdındaki MIP 75°C etüvde 24 saat ve sonrasında evaporatörde 80°C'de 100 rpm'de 1 saat tutularak kurutuldu.

3.2.1.1.2 MIP-2-S Sentezi

0,0819 g CAP 15 ml asetonitril'de çözüldü. 0,1 ml MAA eklendikten sonra ön kompleks oluşturmak amacıyla oda sıcaklığında 30 dakika manyetik karıştırıcı da karıştırıldı. Üzerine 5 ml EGDMA ve 0,0204 g AIBN ilave edildikten sonra oda sıcaklığında 10 dakika daha manyetik karıştırıcı da karıştırıldı. Ayrı bir beherde daha önceden hazırlanmış olan %0,4'lük PVA çözeltisi polimerizasyonun gerçekleşeceği balona ilave edildi. Polimerizasyon öncesinde argon gazı ile 10 dakika purge edildikten sonra balon hava girişini engelleyecek şekilde kapatıldı. Balon 150 rpm'de karıştırılarak 55°C'de 24 saat bekletildi.

Elde edilen baskılı polimerden CAP'ın uzaklaştırılması için MIP 50 ml metanol :asetik asit (9:1) karışımıyla ultrasonik banyoda 15 dakika sonike edildi. MIP beyaz bant süzgeç kağıdı kulanılarak süzüldü. Bu işlem iki defa tekrarlandıktan sonra süzgeç kağıdında kalan MIP soxhlet ekstraksiyonu kullanılarak 200 ml metanol:asetik asit (9:1) karışımıyla 72 saat süreyle reflux edildi.

Reflux sonrasında asetik asitin polimerden uzaklaştırılması amacıyla polimer 50 ml metanol ile ultrasonik banyoda 15 dakika sonike edildi. Polimer beyaz bant süzgeç kağıdı kullanılarak süzüldü. Bu işlem üç defa tekrar edildi. Baskılanmış polimer 50 ml metanol ile ultrasonik banyoda 15 dakika sonike edilip beyaz bant süzgeç kağıdı kullanılarak süzüldükten sonra süzüntü de CAP varlığına bakıldı. Süzgeç kağıdındaki MIP 75°C etüvde 24 saat ve sonrasında evaporatörde 80°C'de 100 rpm'de 1 saat tutularak kurutuldu.

3.2.1.1.3 MIP-3-S Sentezi

0,0883 g CAP 15 ml metanol : diklorometan (1:1) karışımında çözüldü. 0,1 ml MAA eklendikten sonra ön kompleks oluşturmak amacıyla oda sıcaklığında 30 dakika manyetik karıştırıcı da karıştırıldı. Üzerine 2,5 ml EGDMA ve 0,0238g AIBN ilave edildikten sonra oda sıcaklığında 10 dakika daha manyetik karıştırıcı da karıştırıldı. Ayrı bir beherde daha önceden hazırlanmış olan %0,4'lük PVA çözeltisi polimerizasyonun gerçekleşeceği balona ilave edildi. Polimerizasyon öncesinde argon

gazı ile 10 dakika purge edildikten sonra balon hava girişini engelleyecek şekilde kapatıldı. Balon 150 rpm'de karıştırılarak 55°C'de 24 saat bekletildi.

Elde edilen baskılı polimerden CAP'ın uzaklaştırılması için MIP 50 ml metanol:asetik asit (9:1) karışımıyla ultrasonik banyoda 15 dakika sonike edildi. MIP beyaz bant süzgeç kağıdı kulanılarak süzüldü. Bu işlem iki defa tekrarlandıktan sonra süzgeç kağıdında kalan MIP soxhlet ekstraksiyonu kullanılarak 200 ml metanol:asetik asit (9:1) karışımıyla 72 saat süreyle reflux edildi.

Reflux sonrasında asetik asitin polimerden uzaklaştırılması amacıyla polimer 50 ml metanol ile ultrasonik banyoda 15 dakika sonike edildi. Polimer beyaz bant süzgeç kağıdı kullanılarak süzüldü. Bu işlem üç defa tekrar edildi. Baskılanmış polimer 50 ml metanol ile ultrasonik banyoda 15 dakika sonike edilip beyaz bant süzgeç kağıdı kullanılarak süzüldükten sonra süzüntü de CAP varlığına bakıldı. Süzgeç kağıdındaki MIP 75°C etüvde 24 saat ve sonrasında evaporatörde 80°C'de 100 rpm'de 1 saat tutularak kurutuldu.

3.2.1.1.4 NIP-3-S Sentezi

15 ml metanol : diklorometan (1:1) karışımına, 0,1 ml MAA eklendi. Oda sıcaklığında 30 dakika manyetik karıştırıcı da karıştırıldı. Üzerine 2,5 ml EGDMA ve 0,0224g AIBN ilave edildikten sonra oda sıcaklığında 10 dakika daha manyetik karıştırıcı da karıştırıldı. Ayrı bir beherde daha önceden hazırlanmış olan %0,4'lük PVA çözeltisi polimerizasyonun gerçekleşeceği balona ilave edildi. Polimerizasyon öncesinde argon gazı ile 10 dakika purge edildikten sonra balon hava girişini engelleyecek şekilde kapatıldı. Balon 150 rpm'de karıştırılarak 55°C'de 24 saat bekletildi.

NIP-3-S 50 ml metanol ile ultrasonik banyoda 15 dakika sonike edildi. Polimer beyaz bant süzgeç kağıdı kullanılarak süzüldü. Bu işlem iki defa tekrar edildi. Baskılanmamış polimer 50 ml metanol ile ultrasonik banyoda 15 dakika sonike edildikten sonra beyaz bant süzgeç kağıdı kullanılarak süzüldü. Beyaz bant süzgeç kağıdı kullanılarak süzülen kontrol polimeri 75°C etüvde 24 saat ve sonrasında evaporatörde 80°C'de 100 rpm'de 1 saat tutularak kurutuldu.

3.2.1.2 Çöktürme Polimerizasyonu ile Sentezlenen Polimerler

3.2.1.2.1 MIP-P-1 Sentezi

0,1617 g CAP 30 ml asetonitril'de çözüldü. Üzerine 0,2 ml MAA eklendi. Ön kompleks oluşturmak amacıyla buz banyosunda 30 dakika manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Üzerine 2,5 ml EGDMA ve 0,0238g AIBN ilave edildikten sonra oda sıcaklığında 10 dakika daha manyetik karıştırıcı da karıştırıldı. Polimerizasyon öncesinde argon gazı ile 10 dakika purge edildikten sonra balon hava girişini engelleyecek şekilde kapatıldı. Balon 150 rpm'de karıştırılarak 60°C'de 24 saat bekletildi.

Elde edilen baskılı polimerden CAP'ın uzaklaştırılması için MIP blok ısıtıcıda kapaklı vial ile 50°C'de kurutuldu. MIP, 9 ml metanol:asetik asit (9:1) karışımıyla ultrasonik banyoda 15 dakika sonike edililip, santrifüjlendi. Bu işlem dört defa tekrar edildi.

Polimerde bulunan asetik asitin uzaklaştırılması için polimer 9 ml metanol ile 15 dakika ultrasonik banyoda sonike edilip, santrifüjlendi. Bu işlem üç defa tekrarlandı. Bu işlem sonunda süzüntü de CAP varlığına bakıldı. MIP ısı vermeden vakum altında etüvde 24 saat tutularak kurutuldu.

3.2.1.2.2 MIP-P-2 Sentezi

0,1672 g CAP 30 ml metanol : asetonitril (1:1) karışımında çözüldü. Üzerine 0,2 ml MAA eklendi. Ön kompleks oluşturmak amacıyla buz banyosunda 30 dakika manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Üzerine 2,5 ml EGDMA ve 0,0238g AIBN ilave edildikten sonra oda sıcaklığında 10 dakika daha manyetik karıştırıcı da karıştırıldı. Polimerizasyon öncesinde argon gazı ile 10 dakika purge edildikten sonra balon hava girişini engelleyecek şekilde kapatıldı. Balon 150 rpm'de karıştırılarak 60°C'de 24 saat bekletildi.

Elde edilen baskılı polimerden CAP'ın uzaklaştırılması için MIP blok ısıtıcıda kapaklı vial ile 50°C'de kurutuldu. MIP, 9 ml metanol:asetik asit (9:1) karışımıyla

ultrasonik banyoda 15 dakika sonike edililip, santrifüjlendi. Bu işlem dört defa tekrar edildi.

Polimerde bulunan asetik asitin uzaklaştırılması için polimer 9 ml metanol ile 15 dakika ultrasonik banyoda sonike edilip, santrifüjlendi. Bu işlem üç defa tekrarlandı. Bu işlem sonunda süzüntü de CAP varlığına bakıldı. MIP ısı vermeden vakum altında etüvde 24 saat tutularak kurutuldu.

3.2.1.2.3 NIP-P-1 Sentezi

30 ml asetonitril'e 0,2 ml MAA eklendi. Buz banyosunda 30 dakika manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Üzerine 0,0238g AIBN ve 2,5 ml EGDMA ilave edildikten sonra oda sıcaklığında 10 dakika daha manyetik karıştırıcı da karıştırıldı. Polimerizasyon öncesinde argon gazı ile 10 dakika purge edildikten sonra balon hava girişini engelleyecek şekilde kapatıldı. Balon 150 rpm'de karıştırılarak 60°C'de 24 saat bekletildi.

Elde edilen baskılanmamış polimer, 9 ml metanol ile 15 dakika ultrasonik banyoda sonike edilip, santrifüjlendi. Bu işlem üç defa tekrarlandı. Kontrol polimeri ısı vermeden vakum altında etüvde 24 saat tutularak kurutuldu.

3.2.2 Süt Örneklerinden Fenikollerin Ekstraksiyonu

Süt örneklerinin deprotenizasyonu için farklı konsantrasyonlarda spike edilmiş 10 ml süt örneği 2 dakika vortekslendi. Süt örneğine 0,1 ml asetik asit eklenip 1 dakika daha vortekslendikten sonra 4000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatant kısım alındıktan sonra 0,2µm'lik disk filtreden geçirildi. Son hacim 10 ml'ye tamamlanarak kullanıma kadar buzdolabında 4°C'de bekletildi.

3.2.3 GC-MS Sistemi Çalışma Koşulları

Fenikollerin GC-MS ile analizinde kullanılan çalışma şartları şu şekildedir: Çalışmada, THERMO TR-5MS kapiler kolon (60 m * 0,25 mm, 0,25 µm) tercih edilmiştir. Fırın ısısı 100 ºC başlangıç sıcaklığında 1 dakika bekletildikten sonra 2 dakikada 160ºC'ye çıkıp 160 ºC'de 1 dakida bekledikten sonra 30 ˚C artarak 4

dakikada 280 ˚C'ye ulaştırıldı. Taşıyıcı gaz olarak helyum (1,2 mL dk^{-1}, sabit akış hızında) kullanıldı. Enjeksiyon hacmi splitless modda 1 µl olarak kullanıldı. İyon kaynağı ve transferline sıcaklığı sırasıyla 200 ˚C ve 270 ˚C olarak tutuldu.

3.2.4 LC-MS/MS Sistemi Çalışma Koşulları

LC-MS/MS koşulları Fedeniuk vd. (2015) tarafından bildirilen yönteme göre uyarlandı [63]. LC-MS/MS kullanılarak yapılan analizde iyon kaynağı olarak elektrosprey iyonlaştırma, negatif iyon modunda, iyon kaynağı sıcaklığı 120 °C, Desolvation gaz sıcaklığı 450°C, Çarpışma hücresi basıncı $2,5x10^{-3}$ bar kolon fırını sıcaklığı 40°C ve kolon olarak 50 mm x 2.1 mm C18 kolon ile 0,3 mL dk^{-1} akış hızında 10 µL'lik enjeksiyon hacmi ile çalışıldı. Mobil faz olarak sırasıyla % 0.1 Asetik Asit içeren su, isopropanol : metanol (10:90, v/v) karısımı ve asetonitril kullanılmıştır. Tablo 3.1'de LC üzerinde uygulanan akış diyagramı gösterilmiştir.

Tablo 3.1 LC-MS/MS sıvı sistemi akış özellikleri

Zaman (dakika)	Mobil Faz A (%)	Mobil Faz B (%)	Mobil Faz C (%)
0.00	100	0	0
2.00	70	30	0
6.50	50	50	0
10.00	10	45	45
15.00	100	0	0

3.2.5 Fenikol Bileşiklerinin GC-MS Analizlerinin Optimizasyonu

0.0054 g kloramfenikol, 0.0048 g florfenikol, 0.0043 g tiyamfenikol 50 mL metanolde çözülerek sırasıyla 108 mg L^{-1} kloramfenikol, 96 mg L^{-1} florfenikol ve 86 mg L^{-1} tiyamfenikol içeren çözeltiler hazırlandı. Sililleme işlemi bu çözeltilerin 1'er ml'lik kısmına uygulandı. Çözeltilerin 1 ml'lik kısmı viale alınarak block heater'da 45°C'de tamamen uçuruldu. Viallere 50 µL N-metil-N-(trimetilsilil) trifloroasetamid (MSTFA) ve 300 µL piridin eklendi. Vialler reaksiyonun gerçekleşmesi için 60°C'deki blok ısıtıcıda 30 dakika bekletildi. GC-MS kullanılarak TIC modunda 100-480 kütle aralığında kromatogramları alındı. Alınan kromatogramlardan hareketle kloramfenikol, florfenikol ve tiyamfenikol için GC-MS'te SIM metodu oluşturuldu.

3.2.6 Çöktürme Polimerizasyonu ve Süspansiyon Polimerizasyonu ile Sentezlenen MIP'lerin Adsorpsiyon Kinetiğinin Karakterizasyonu

Çöktürme ve süspansiyon polimerizasyonu yöntemleriyle sentezlenen MIP'lerin her birinden 20 mg'lık kısımlar tartıldı. Tartılan polimer kütlesi üzerine 4 ml, 100 ppm'lik sulu CAP çözeltisi ilave edilerek karıştırıldı. Karışımlar batch metodu kullanılarak çalkalayıcıda 50 rpm'de 12 saat süreyle adsorpsiyon dengelerine ulaştırıldı. Daha sonra her bir vial 4000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendikten sonra üst fazdan 0,2 ml enjeksiyon vasıtasıyla başka bir viale alındı. Saf su ile hacimler 3 ml'ye tamamlandı. Polimerlere bağlanmadan kalan CAP konsantrasyonu spektrofotometre ile 275 nm dalgaboyu absorbansı kullanılarak kontrol edildi.

3.2.7 MIP-3-S, NIP-3-S, MIP-P-1 ve NIP-P-1'in Adsorpsiyon Kinetiğinin Karakterizasyonu

Çöktürme ve süspansiyon polimerizasyonu yöntemiyle sentezlenen MIP ve NIP'lerin her birinden 20 mg'lık kısımlar tartıldı. Tartılan polimer kütlesi üzerine 4 ml, 100 ppm'lik sulu CAP çözeltisi ilave edilerek karıştırıldı. Karışımlar batch metodu kullanılarak çalkalayıcıda 50 rpm'de 12 saat süreyle adsorpsiyon dengelerine ulaştırıldı. Daha sonra her bir vial 4000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendikten sonra üst fazdan 0,2 ml enjeksiyon vasıtasıyla başka bir viale alındı. Saf su ile hacimler 3 ml'ye tamamlandı. Polimerlere bağlanmadan kalan CAP konsantrasyonu spektrofotometre ile 275 nm dalgaboyu absorbansı kullanılarak kontrol edildi.

3.2.8 MIP-3-S, NIP-3-S, MIP-P-1 ve NIP-P-1'in Adsorpsiyon Kinetiğinde Konsantrasyonun Etkisinin Karakterizasyonu

Çöktürme ve Süspansiyon polimerizasyonu yöntemiyle sentezlenen MIP ve NIP'lerin her birinden 20 mg'lık kısımlar tartıldı. Tartılan polimer kütlesi üzerine 4 ml hacimde sırasıyla 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200 ve 250 ppm'lik CAP çözeltisi ilave edilerek karıştırıldı. Karışımlar batch metodu kullanılarak çalkalayıcıda 50 rpm'de 12 saat süreyle adsorpsiyon dengelerine ulaştırıldı. Daha sonra her bir vial 4000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendikten sonra üst fazdan 0,2 ml enjeksiyon vasıtasıyla başka bir viale alındı. Saf su ile hacimler 3 ml'ye tamamlandı. Polimerlere bağlanmadan kalan CAP

konsantrasyonu spektrofotometre ile 275 nm dalgaboyu absorbansı kullanılarak kontrol edildi. Birim polimer kütlesi tarafından adsorplanan CAP miktarı aşağıdaki eşitlikle hesaplandı.

$$Q = \frac{(Co - C)xV}{M}$$

Bu eşitlikte Q, birim polimer kütlesi başına adsorplanan kloramfenikol miktarını (mg g^{-1}), C_0 ve C sırasıyla çözeltideki kloramfenikolün başlangıç ve son derişimini (mg L^{-1}), V çözelti hacmini(L) ve M ise polimerin kütlesini (g) ifade etmektedir.

Moleküler baskılanmış polimer ve CAP arasındaki bağlanma etkileşimleri Scatchard analizi yöntemi ile aşağıdaki eşitlik kullanılarak elde edildi.

$$\frac{Q}{C_s} = \frac{Q_{max} - Q}{K_d}$$

Bu eşitlikte Q, birim polimer kütlesi başına adsorplanan kloramfenikol miktarını (mg g^{-1}), C_s çözeltide tutunmadan kalan kloramfenikolün son derişim değerini (mg L^{-1}), Q_{max} bağlanma bölgelerinin maksimum sayısını ve K_d ise dağılı sabitini ifade etmektedir.

3.2.9 MIP-3-S, NIP-3-S, MIP-P-1 ve NIP-P-1'in Adsorpsiyon Kinetiğinde Sürenin Etkisinin Karakterizasyonu

Çöktürme ve Süspansiyon polimerizasyonu yöntemiyle sentezlenen MIP ve NIP'in her birinden 20 mg'lık kısımlar tartıldı. Tartılan polimer kütlesi üzerine 4 ml, 100 ppm'lik sulu CAP çözeltisi ilave edilerek karıştırıldı. Karışımlar batch metodu kullanılarak çalkalayıcıda 50 rpm'de 30, 60, 90, 120 ve 180 dakika süreyle adsorpsiyon dengelerine ulaştırıldı. Daha sonra her bir vial 4000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendikten sonra üst fazdan 0,2 ml enjeksiyon vasıtasıyla başka bir viale alındı. Saf su ile hacimler 3 ml'ye tamamlandı. Polimerlere bağlanmadan kalan CAP konsantrasyonu spektrofotometre ile 275 nm dalgaboyu absorbansı kullanılarak kontrol edildi.

3.2.10 MIP-3-S, NIP-3-S, MIP-P-1 ve NIP-P-1'in Adsorpsiyon Kinetiğinde pH Etkisinin Karakterizasyonu

Çöktürme ve Süspansiyon polimerizasyonu yöntemiyle sentezlenen MIP ve NIP'lerin her birinden 20 mg'lık kısımlar tartıldı. Birinci vialdeki polimer kütlesi üzerine %1'lik asetik asit çözeltisi kullanarak pH'ı 5'e ayarlanmış olan 4 ml, 100 ppm'lik sulu CAP çözeltisi ilave edilerek karıştırıldı. İkinci vialdeki polimer kütlesi üzerine pH'ı 7 olan 4 ml, 100 ppm'lik sulu CAP çözeltisi ilave edilerek karıştırıldı. Üçüncü vialdeki polimer kütlesi üzerine %1'lik amonyak çözeltisi kullanarak pH'ı 10'a ayarlanmış olan 4 ml, 100 ppm'lik sulu CAP çözeltisi ilave edilerek karıştırıldı. Karışımlar batch metodu kullanılarak çalkalayıcıda 50 rpm'de 120 dakika süreyle adsorpsiyon dengelerine ulaştırıldı. Daha sonra her bir vial 4000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendikten sonra üst fazdan 0,2 ml enjeksiyon vasıtasıyla başka bir viale alındı. Saf su ile hacimler 3 ml'ye tamamlandı. Polimerlere bağlanmadan kalan CAP konsantrasyonu spektrofotometre ile 275 nm dalgaboyu absorbansı kullanılarak kontrol edildi.

3.2.11 CAP Baskılı Polimerin Analog Bileşikler İçin Adsorpsiyon Kinetiğini ve Baskılama Faktörünün Tayini

Çöktürme polimerizasyonu yöntemiyle sentezlenen moleküler baskılanmış polimerden hazırlanan 20 mg sorbent içeren kartuşlar 4 ml metanol ve 4 ml saf su ile şartlandırıldıktan sonra pH=5 ayarlı 1 ml, 100 ppm'lik CAP, FF, TAP sulu çözeltileri akış hızı ~0,5ml dk^{-1} olacak şekilde kartuştan geçirildi. Kartuşlar vakum pompasında 10 dk hava akımı geçirilerek kurutuldu. Kurutulan kartuşlarda tutulan CAP 4 ml MeOH ile ~0,2ml dk^{-1} akış hızıyla elüe edildi. Çözücüler azot atmosferi altında kuruluğa kadar uçurulduktan sonra CAP, FF ve TAP bileşikleri sililleme işlemi ile trimetil silil türevlerine dönüştürüldü, SIM modunda gerçekleştirilen GC-MS analizlerinden elde edilen kromatogramlarındaki pik alanlarının entegrasyonu ile hesaplandı.

3.2.12. MIP-P-1 Baskılanmış Polimerin ve Geleneksel Sorbentlerin SPE Çalışmalarıyla Karşılaştırılması

MIP-P-1, MIP yapılı SupelMIP (Supelco MIP) ve klasik Oasis® HLB sorbentlerinden hazırlanan 20 mg sorbent içeren kartuşlar 4 ml metanol ve 4 ml saf su ile şartlandırıldıktan sonra 1 ml 50 ppm CAP (pH=5) çözeltisi akış hızı ~0,5ml dk^{-1} olacak şekilde kartuştan geçirildi. Kartuşlar vakum pompasında 10 dk hava akımı geçirilerek kurutuldu. Kurutulan kartuşlarda tutulan CAP 4 ml MeOH ile ~0,2ml dk^{-1} akış hızıyla elüe edildi. Elüatlardaki CAP varlığı, çözücülerin azot ortamında uçurulması ve sililleme işlemi sonrasında SIM modunda elde edilen GC-MS kromatogramlarındaki pik alanlarının entegrasyonu ile hesaplandı. Geri kazanım değerleri aşağıdaki eşitlikle hesaplandı.

$$\%\ \text{Geri Kazanım} = \left(\frac{\text{Kartuş tan elüe edilen CAP'ın miktarı}}{\text{Stok Çözeltideki CAP'ın miktarı}}\right) \text{x}100$$

3.2.13 MIP-P-1 İçin Geri Kazanım Çalışmalarında Seçici Olmayan Adsorpsiyonun Azaltılması

20 mg polimer içeren kartuşlar 4 ml metanol ve 4 ml saf su ile şartlandırıldıktan sonra 1 ml 50 ppm CAP içeren süt akış hızı ~0,5ml dk^{-1} olacak şekilde kartuştan geçirildi. Spesifik olmayan adsorpsiyonların azaltılması ve seçici tutunmanın geliştirilmesi için MIP-P-1 ~1ml dk^{-1} akış hızıyla Etil asetat, su:metanol (70:30) karışımı, su:metanol (60:40) karışımı, su:metanol (40:60) karışımı ve asetonitril ile yıkandı. Kartuşlar vakum pompasında 10 dk hava akımı geçirilerek kurutuldu. Kurutulan kartuşlarda bulunan CAP 4 ml MeOH ile ~0,2ml dk^{-1} akış hızıyla elüe edildi. Elüatlardaki CAP varlığı, çözücülerin azot ortamında uçurulması ve sililleme işlemi sonrasında SIM modunda elde edilen GC-MS kromatogramlarındaki pik alanlarının entegrasyonu ile hesaplandı.

3.2.14 MIP-P-1'in geri kazanım çalışmaları

20 mg polimer içeren kartuşlar 4 ml metanol ve 4 ml saf su ile şartlandırıldıktan sonra 1 ml farklı konsantrasyonlardaki CAP, FF, TAP içeren süt çözeltileri ~0,5ml dk^{-1} akış hızıyla kartuştan geçirildi. Yükleme yapılan kartuş 2 ml su:metanol (60:40) karışımı ile ~1ml dk^{-1} akış hızıyla yıkandı. Yıkama işleminin ardından polimerler vakum pompasında 10 dakika kurutuldu. Kurutulan kartuşlarda bulunan CAP 4 ml MeOH ile akış hızı ~0,2ml dk^{-1} olacak şekilde elüe edildi. LC-MS/MS'de alınan kromatogramlardan alanların entergrasyonu ile % geri kazanım hesaplandı.

3.2.15 Kloramfenikol Baskılanmış Polimerlerin Karakterizasyonu

3.2.15.1 FTIR analizleri

Sentezlenen polimerlerin FTIR spektrumları, FAR-FT-IR kullanılarak alındı.

3.2.15.2 SEM analizleri

Sentezlenen polimerlerin yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskobu kullanılarak görüntülendi.

3.2.15.3 Termo-gravimetrik analizler (TGA)

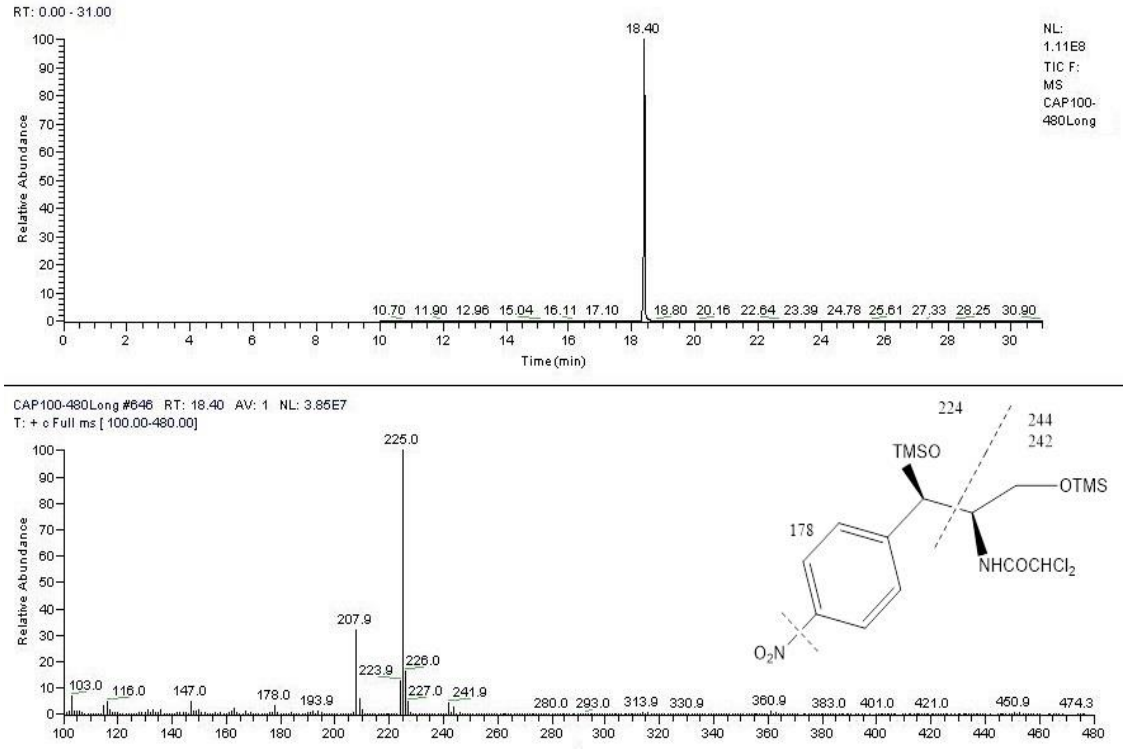
Termogravimetrik analiz cihazı kullanılarak sentezlenen polimerlerin termo-gravimetrik analizleri elde edildi.

BÖLÜM 4

DENEYSEL SONUÇLAR

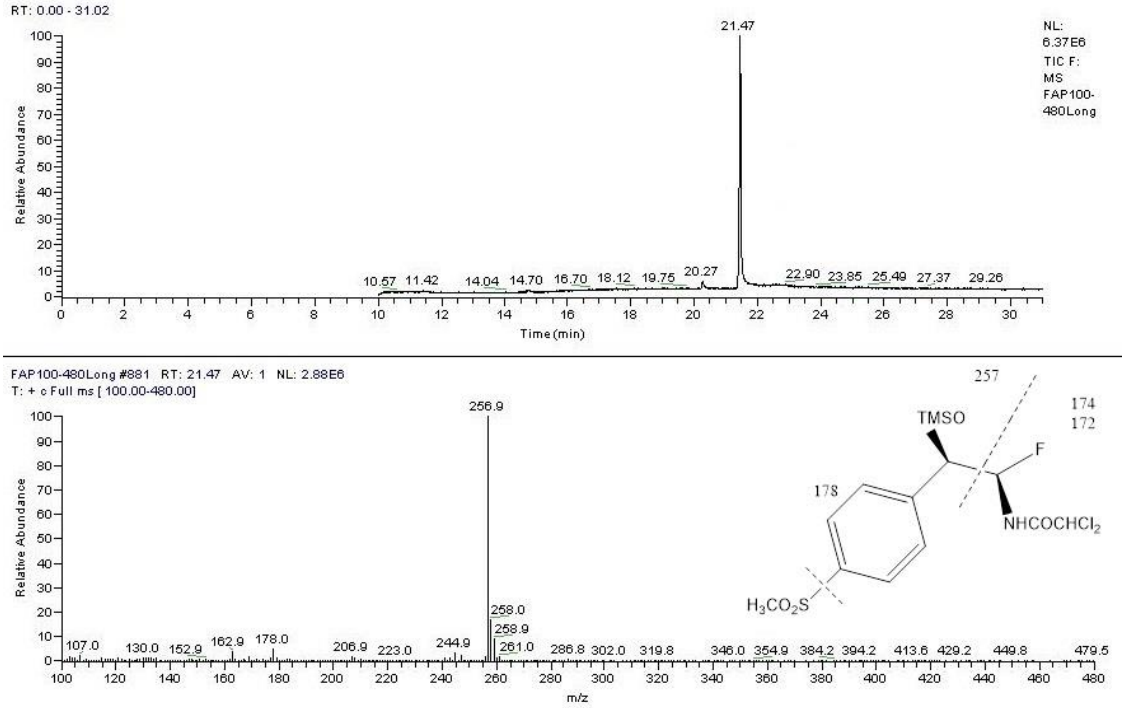
4.1. Fenikol Bileşiklerinin GC-MS Analizlerinin Optimizasyonu

Kloramfenikolün sililleme işlemi sonrasında GC-MS'te çıkış zamanını ve parçalanma ürünlerini gösteren kütle spektrumu Şekil 4.1'de gösterildi.



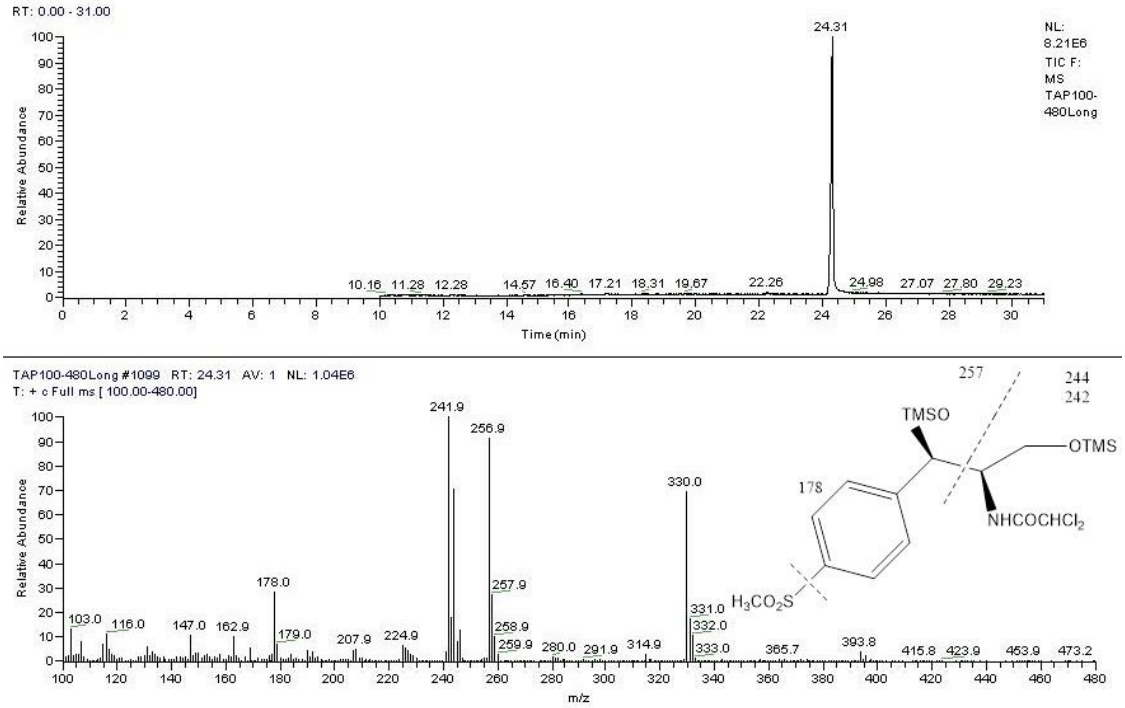
Şekil 4.1 Kloramfenikolün kütle spektrumu ve parçalanma ürünleri

Florfenikolün sililleme işlemi sonrasında GC-MS'te çıkış zamanını ve parçalanma ürünlerini gösteren kütle spektrumu Şekil 4.2'de gösterildi.



Şekil 4.2 Florfenikolün kütle spektrumu ve parçalanma ürünleri

Tiyamfenikolün sililleme işlemi sonrasında GC-MS'te çıkış zamanını ve parçalanma ürünlerini gösteren kütle spektrumu Şekil 4.3'de gösterildi.



Şekil 4.3 Tiyamfenikolün kütle spektrumu ve parçalanma ürünleri

4.2 Çöktürme Polimerizasyonu ve Süspansiyon Polimerizasyonu ile Sentezlenen MIP'lerin Adsorpsiyon Kinetiğinin Karakterizasyonu

Ölçülen absorbanslardan hesaplanan polimerde tutulan CAP konsantrasyonu Tablo 4.1'de gösterildi.

Tablo 4.1 Kloramfenikol bileşiğinin batch metodu ile adsorpsiyon kinetiği

(Sorbent: 20 mg; 4 ml 100 mg L^{-1} $CAP_{(aq)}$; Hız: 50 rpm; Süre: 12 saat; batch metodu)

	MIP-S-1	MIP-S-2	MIP-S-3	MIP-P-1	MIP-P-2
Polimer tarafından tutulan CAP konsantrasyonu (mg L^{-1})	1,8	1,6	3,4	14,1	5,5

4.3 MIP-3-S, NIP-3-S, MIP-P-1 ve NIP-P-1'in Adsorpsiyon Kinetiğinin Karakterizasyonu

Ölçülen absorbanslardan hesaplanan polimerde tutulan CAP konsantrasyonu Tablo 4.2'de gösterildi.

Tablo 4.2 Polimer kütlesi tarafından tutulan CAP konsantrasyonu

(Sorbent: 20 mg; 4 ml 100 mg L^{-1} $CAP_{(aq)}$; Hız: 50 rpm; Süre: 12 saat; batch metodu)

	MIP-S-3	NIP-S-3	MIP-P-1	NIP-P-1
Polimer tarafından tutulan CAP konsantrasyonu (mg L^{-1})	3,4	3,1	14,1	4,5

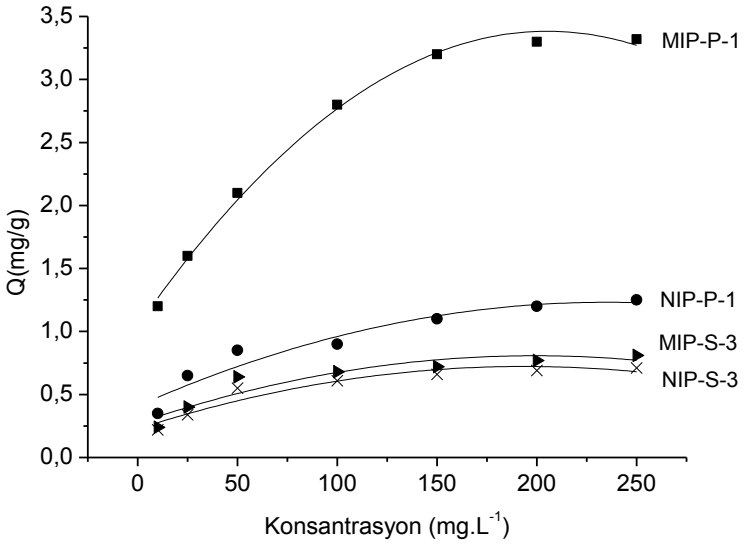
4.4 MIP-3-S, NIP-3-S, MIP-P-1 ve NIP-P-1'in Adsorpsiyon Kinetiğinde Konsantrasyonun Etkisinin Karakterizasyonu

Ölçülen absorbanslardan hesaplanan birim kütle başına adsorplanan CAP miktarları Tablo 4.3'te gösterildi.

Tablo 4.3 MIP-S-3, NIP-S-3, MIP-P-1 ve NIP-P-1'in Q(mg g^{-1}) değerleri

Kons.(mg L^{-1})	MIP-S-3	NIP-S-3	MIP-P-1	NIP-P-1
5	0,18	0,16	0,65	0,21
10	0,24	0,22	1,20	0,35
25	0,40	0,34	1,60	0,65
50	0,64	0,55	2,10	0,85
100	0,68	0,61	2,80	0,90
150	0,72	0,66	3,20	1,10
200	0,77	0,69	3,30	1,20
250	0,81	0,71	3,32	1,25

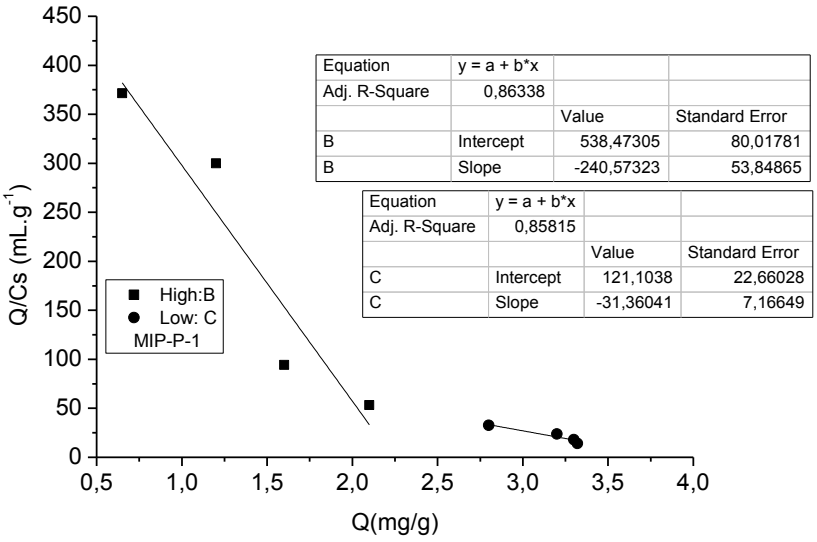
MIP-S-3, NIP-S-3, MIP-P-1 ve NIP-P-1'in Q(mg g^{-1}) değerlerinin konsantrasyona göre değişimi Şekil 4.4'te gösterildi.



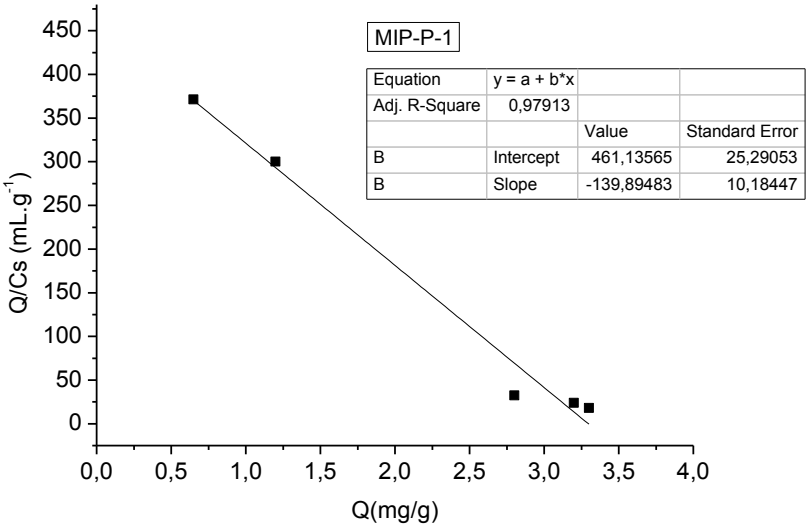
Şekil 4.4 MIP-S-3, NIP-S-3, MIP-P-1 ve NIP-P-1'in konsantrasyona bağlı adsorpsiyon izotermi

Tablo 4.4 MIP-P-1 polimerinin CAP adsorpsiyonu Scatchard grafiği verileri

Q ($mg\ g^{-1}$)	Co ($mg\ L^{-1}$)	Cs ($mg\ L^{-1}$)	Co-Cs ($mg\ L^{-1}$)	M (g)	V (L)	Q/Cs ($mL\ g^{-1}$)
0,65	5	1,75	3,25	0,02	0,004	371,4
1,20	10	4	6	0,02	0,004	300
1,60	25	17	8	0,02	0,004	94
2,10	50	39,5	10,5	0,02	0,004	53
2,8	100	86	14	0,02	0,004	32,6
3,20	150	134	16	0,02	0,004	23,9
3,30	200	183,5	16,5	0,02	0,004	18



(-a-)

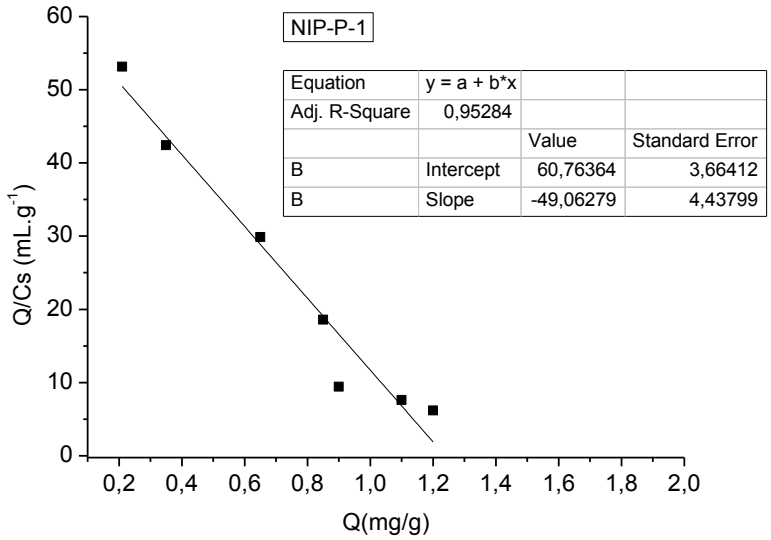


(-b-)

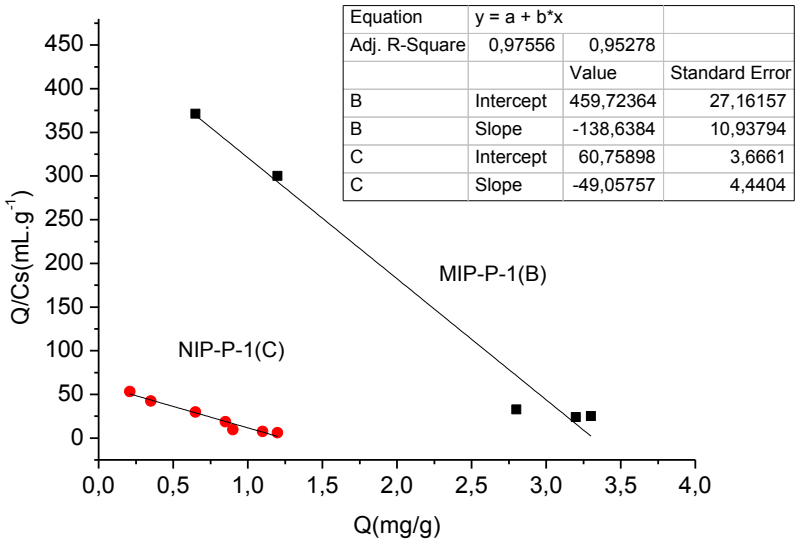
Şekil 4.5 MIP-P-1 polimerinin CAP adsorpsiyonu için Scatchard grafiği,(-a-): yüksek affinite ve düşük affinite bölgeleri adsorpsiyonu, (-b-): Toplam adsorpsiyon.

Tablo 4.5 NIP-P-1 polimerinin CAP adsorpsiyonu Scatchard grafiği verileri

Q ($mg\ g^{-1}$)	Co ($mg\ L^{-1}$)	Cs ($mg\ L^{-1}$)	Co-Cs ($mg\ L^{-1}$)	M (g)	V (L)	Q/Cs ($mL\ g^{-1}$)
0,21	5	3,95	1,05	0,02	0,004	53,16
0,35	10	8,25	1,75	0,02	0,004	42,42
0,65	25	21,75	3,25	0,02	0,004	29,89
0,85	50	45,75	4,25	0,02	0,004	18,58
0,90	100	95,50	4,5	0,02	0,004	9,42
1,10	150	144,50	5,5	0,02	0,004	7,61
1,20	200	194	6	0,02	0,004	6,19



Şekil 4.6 NIP-P-1 polimerinin CAP adsorpsiyonu için Scatchard grafiği



Şekil 4.7 MIP-P-1 ve NIP-P-1 polimerinin CAP adsorpsiyonu için Scatchard grafiği

(Sorbent: 20 mg; 4 ml CAP(aq); Hız: 50 rpm; Süre: 12 saat; batch metodu)

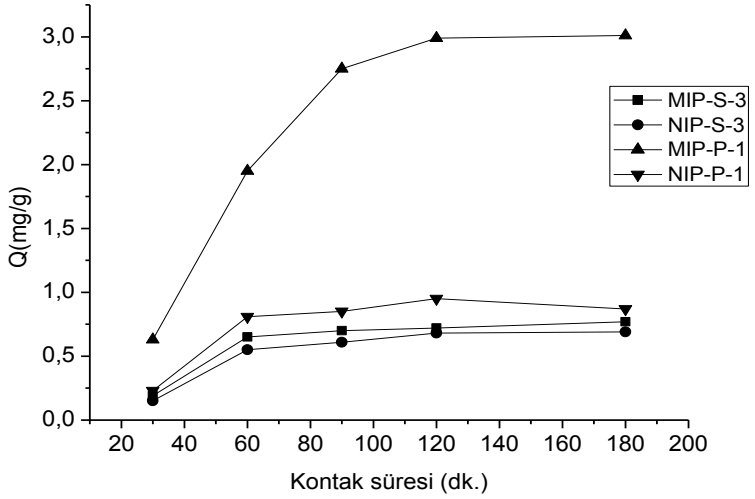
4.5. MIP-3-S, NIP-3-S, MIP-P-1 ve NIP-P-1'in Adsorpsiyon Kinetiğinde Sürenin Etkisinin Karakterizasyonu

Ölçülen absorbanslardan hesaplanan birim kütle başına adsorplanan CAP miktarları Tablo 4.6'da gösterildi.

Tablo 4.6 MIP-S-3, NIP-S-3, MIP-P-1 ve NIP-P-1'in CAP adsorpsiyon miktarına kontak süresinin etkisi

Süre (dk)	MIP-S-3	NIP-S-3	MIP-P-1	NIP-P-1
30	0,19	0,15	0,63	0,23
60	0,65	0,55	1,95	0,81
90	0,7	0,61	2,73	0,85
120	0,72	0,68	2,99	0,95
180	0,77	0,69	3,01	0,87

MIP-S-3, NIP-S-3, MIP-P-1 ve NIP-P-1'in Q(mg g^{-1}) değerlerinin kontak süresine göre değişimi Şekil 4.9'da gösterildi.



Şekil 4.8 MIP-S-3, NIP-S-3, MIP-P-1 ve NIP-P-1'in CAP adsorpsiyon miktarına kontak süresinin etkisi

(Sorbent: 20 mg; 4 ml 100 mg L^{-1} $CAP_{(aq)}$; Hız: 50 rpm; batch metodu)

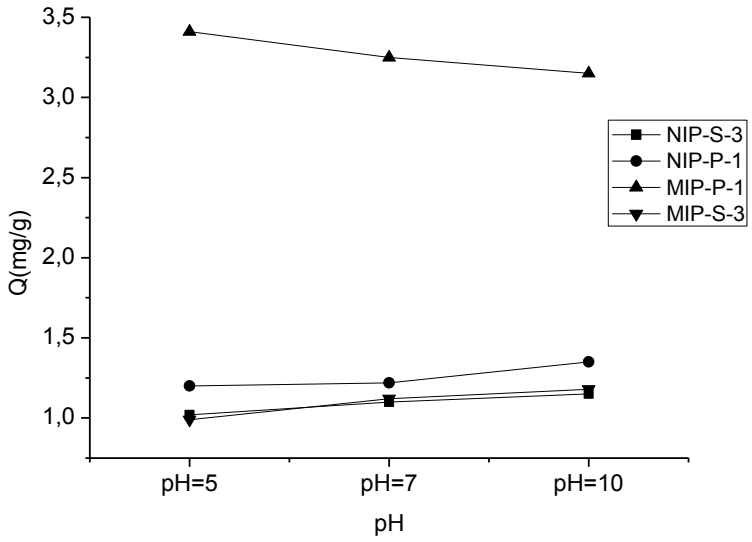
4.6 MIP-3-S, NIP-3-S, MIP-P-1 ve NIP-P-1'in Adsorpsiyon Kinetiğinde pH Etkisinin Karakterizasyonu

Ölçülen absorbanslardan hesaplanan birim kütle başına adsorplanan CAP miktarları Tablo 4.7'de gösterildi.

Tablo 4.7 MIP-S-3, NIP-S-3, MIP-P-1 ve NIP-P-1'in Q(mg g^{-1}) değerleri

pH	MIP-S-3	NIP-S-3	MIP-P-1	NIP-P-1
5	1,02	1,2	3,41	0,99
7	1,1	1,22	3,25	1,12
10	1,15	1,35	3,15	1,18

MIP-S-3, NIP-S-3, MIP-P-1 ve NIP-P-1'in Q(mg g^{-1}) değerlerinin pH'a göre değişimi Şekil 4.10'da gösterildi.



Şekil 4.9 CAP adsorpsiyon miktarında pH'ın etkisi

(Sorbent: 20 mg; 4 ml 100 mg L^{-1} $CAP_{(aq)}$; Hız: 50 rpm; Süre: 2 saat; batch metodu)

4.7 CAP Baskılı Polimerin Analog Bileşikler İçin Adsorpsiyon Kinetiği ve Baskılama Faktörünün Tayini

Kromatogramlardan hesaplanan birim kütle başına adsorplanan CAP, FF, TAP miktarları ve Baskılama faktörleri-SF (Imprinting Factor), Q_{CAP}/Q_{FF} ve Q_{CAP}/Q_{TAP} değerleri Tablo 4.8'de gösterildi.

Tablo 4.8 MIP-P-1 polimeri için Q (mg g^{-1}) ve Baskılama faktörü değerleri

(Sorbent: 20 mg; 1 ml 100 mg L^{-1} $CAP_{(aq)}$, $FF_{(aq)}$, $TAP_{(aq)}$; pH: 5; Numune Akış Hızı: ~0,5 mL dk^{-1}; Elüent: Metanol 4 mL)

	$Q_{CAP\text{-}MIP\text{-}P\text{-}1}$	$Q_{CAP\text{-}NIP\text{-}P\text{-}1}$	$Q_{FF\text{-}MIP\text{-}P\text{-}1}$	$Q_{TAP\text{-}MIP\text{-}P\text{-}1}$
MIP-P-1 için Q değeri	3,41	0,99	2,79	2,07
Baskılama Faktörü	($Q_{CAP\text{-}MIP\text{-}P\text{-}1}/Q_{CAP\text{-}NIP\text{-}P\text{-}1}$)		(Q_{CAP}/Q_{FF})	(Q_{CAP}/Q_{TAP})
(IF)	3,44		1,22	1,64

4.8. MIP-P-1 Baskılanmış Polimerin ve Geleneksel Sorbentlerin SPE Çalışmalarıyla Karşılaştırılması

MIP-P-1, SupelMIP ve Oasis® HLB sorbentlerinin kromatogramlardan hesaplanan geri kazanım değerleri Tablo 4,9'da gösterildi.

Tablo 4.9 CAP bileşiğinin MIP-P-1, SupelMIP ve Oasis® HLB sorbentlerinin katı faz ekstraksiyonu ile elde edilen geri kazanım değerleri (%)

(Sorbent: 20 mg; 1 ml 50 mg L^{-1} $CAP_{(aq)}$; pH: 5; Numune Akış Hızı: ~0,5 mL dk^{-1}; Elüent: Metanol 4 mL)

Sorbent Türü	% Geri Kazanım (n=3)	%RSD
SupelMIP	91,9	3,4
MIP-P-1	90,8	5,6
Oasis® HLB	76,1	5,3

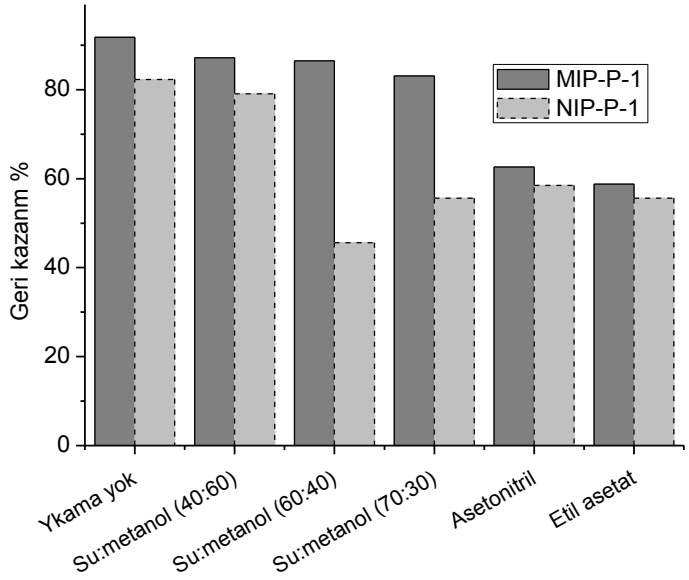
4.9 MIP-P-1 İçin Geri Kazanım Çalışmalarında Seçici Olmayan Adsorpsiyonun Azaltılması

Farklı yıkama çözeltilerine göre kromatogramlarda hesaplanan geri kazanım değerleri Tablo 4.10'da gösterildi.

Tablo 4.10 Farklı yıkama çözeltilerine göre MIP-P-1 ve NIP-P-1 için % geri kazanım değerleri

(Sorbent: 20 mg; 1 ml 50 mg L^{-1} $CAP_{(süt)}$; pH: 5; Numune Akış Hızı: ~0,5 mL dk^{-1}; Elüent: Metanol 4 mL)

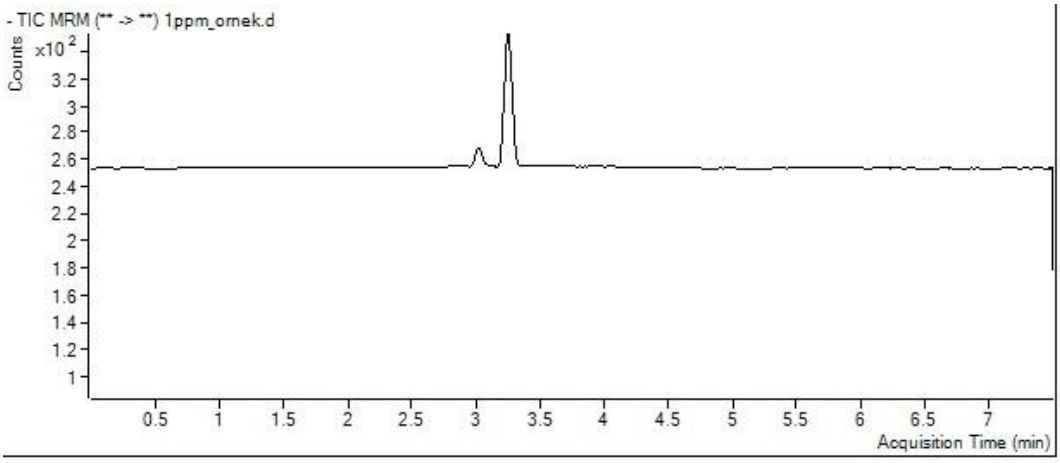
Yıkama Çöz	% Geri Kazanım (n=3)	
	MIP-P-1	NIP-P-1
Yıkama yok	91,8±2,1	82,3±12
Su:metanol (40:60)	87,2±3,5	79,1±9,8
Su:metanol (60:40)	86,5±3,2	45,6±8,6
Su:metanol (70:30)	83,1±4,1	55,6±8,1
Asetonitril	62,6±7,8	58,5±8,8
Etil asetat	58,8±8,1	55,6±9,2



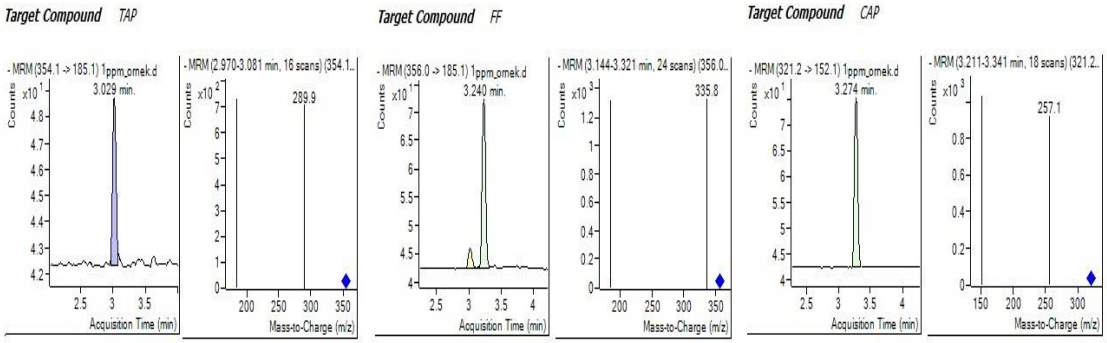
Şekil 4.10 Yıkama çözeltilerinin geri kazanım verimleri üzerine etkisi

4.10 MIP-P-1'in geri kazanım çalışmaları

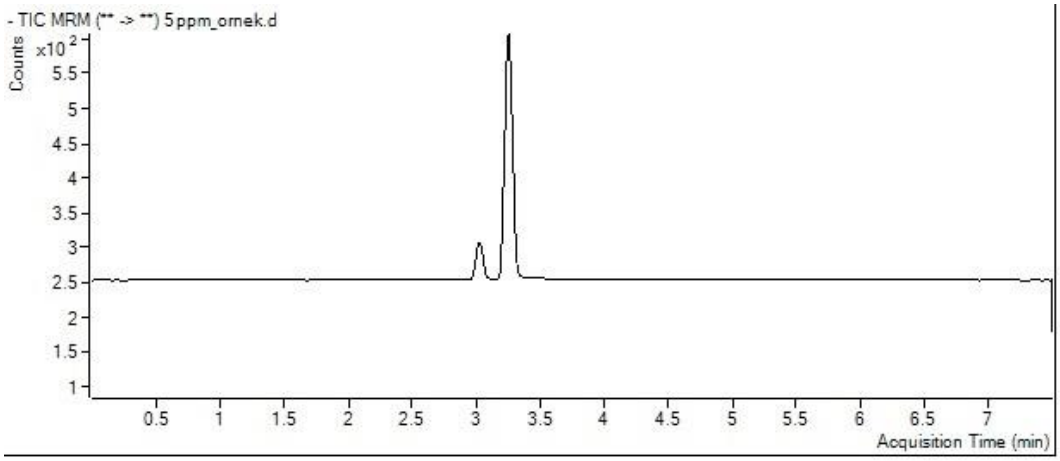
LC-MS/MS ile alınan kromatogramlardan hesaplanan geri kazanım değerleri Tablo 4.11'de gösterildi.



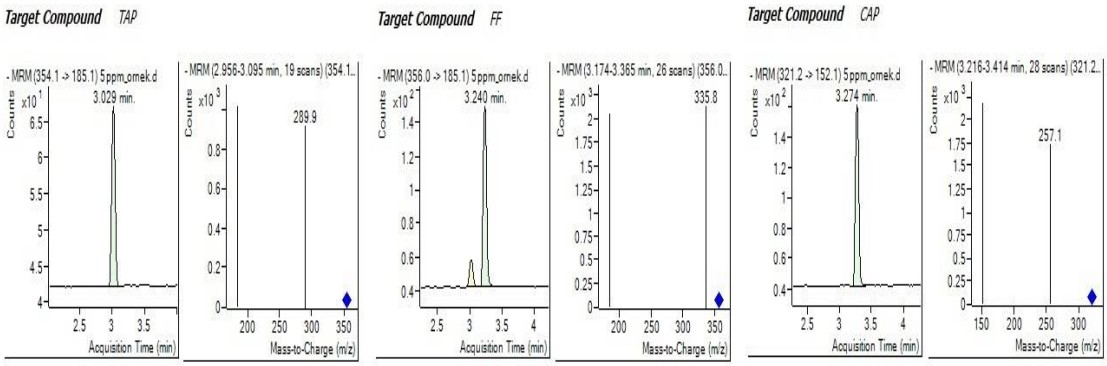
Şekil 4.11 1 ppm süt örneğinin LC-MS/MS ile alınan kromatogramı



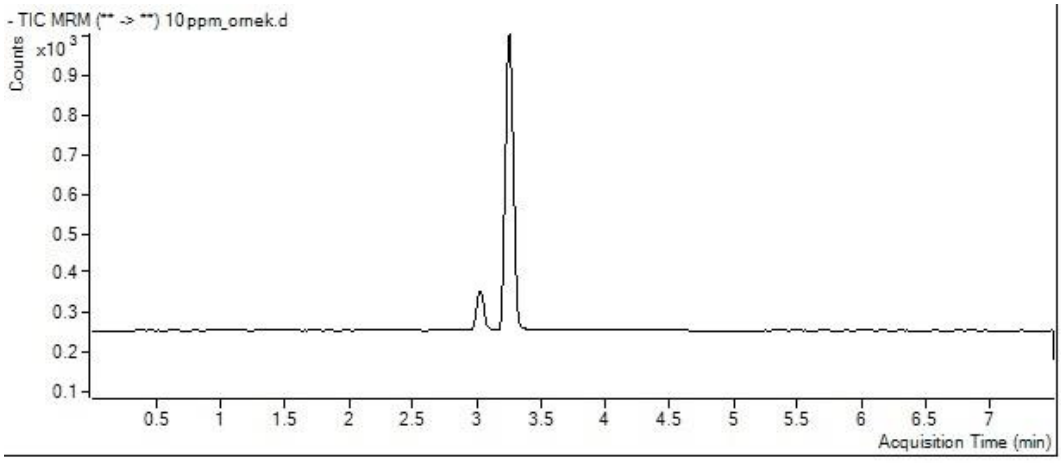
Şekil 4.12 1 ppm süt örneğinin LC-MS/MS ile alınan kromatogramı için m/z değerleri



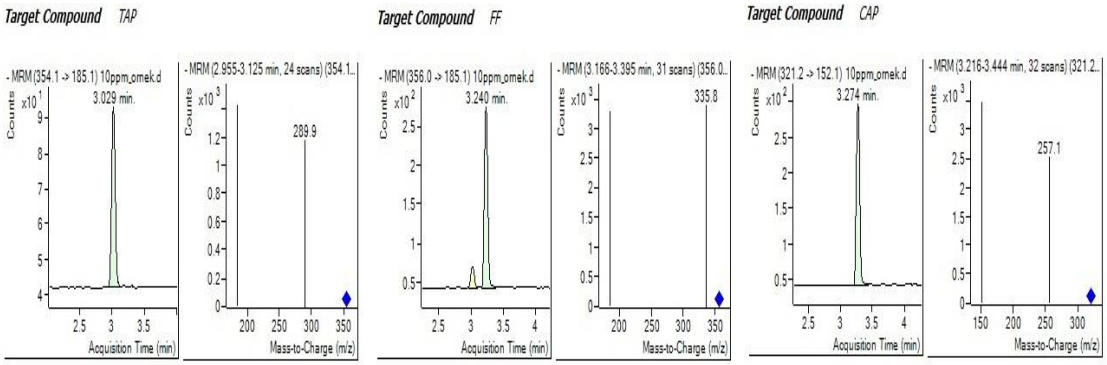
Şekil 4.13 5 ppm süt örneğinin LC-MS/MS ile alınan kromatogramı



Şekil 4.14 5 ppm süt örneğinin LC-MS/MS ile alınan kromatogramı için m/z değerleri



Şekil 4.15 10 ppm süt örneğinin LC-MS/MS ile alınan kromatogramı

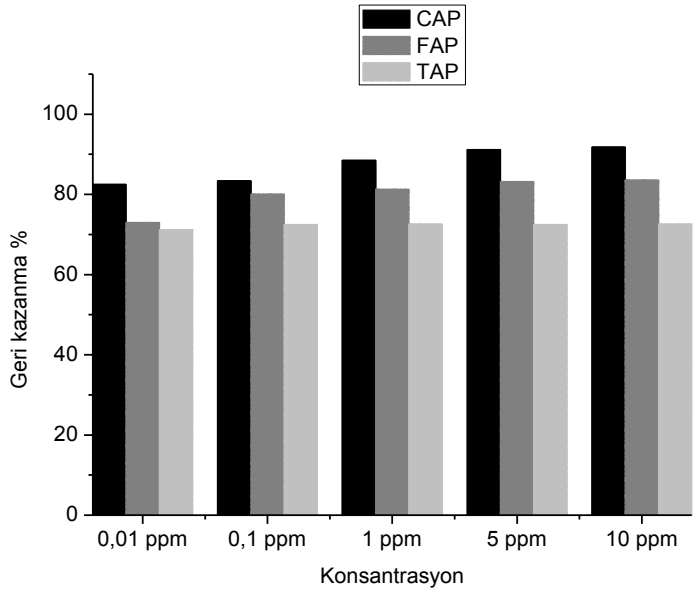


Şekil 4.16 10 ppm süt örneğinin LC-MS/MS ile alınan kromatogramı için m/z değerleri

Tablo 4.11 MIP-P-1 polimerinin SPE ekstraksiyonunda CAP, FF ve TAP için geri kazanım değerleri

(Sorbent: 20 mg; 1 ml 50 mg L^{-1} $CAP_{(süt)}$, $FF_{(süt)}$, $TAP_{(süt)}$; pH: 5; Numune Akış Hızı: ~0,5 mL dk^{-1}; Elüent: Metanol 4 mL)

Süt çözeltisine spike edilen konsantrasyon (ppm)	% Geri kazanım ve %RSD (n=3)		
	CAP	FAP	TAP
0,01	82,5±5,6	73±5,3	71,2±4,1
0,1	83,4±4,1	80,1±5,2	72,5±3,8
1	88,5±3,9	81,3±5,2	72,6±3,6
5	91,2±3,8	83,2±4,9	72,5±3,5
10	91,8±3,7	83,6±4,8	72,6±3,6



Şekil 4.17 MIP-P-1 polimeri için süt numunelerinden SPE ekstraksiyon ve LC-MS/MS analizinde % Geri Kazanım değerleri.

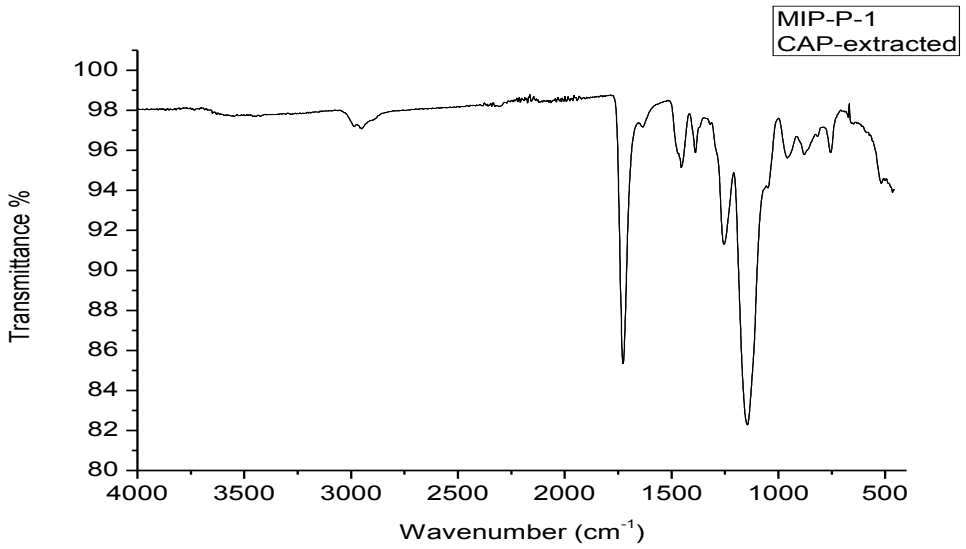
4.11 Kloramfenikol Baskılanmış Polimerlerin Karakterizasyonu

4.11.1 FT-IR Analizleri

MIP-P-1 için FT-IR cihazı ile elde edilen spektruma ait veriler Tablo 4.12 ve Şekil 4.19'de gösterildi.

Tablo 4.12 CAP içermeyen MIP-P-1 FT-IR spektrum pikleri

Temel pikler	Dalga sayısı (cm^{-1})	% Geçirgenlik
1	1727,18	85,34
2	1520,81	98,5
3	1454,85	95,14
4	1417,17	97,83
5	1254,67	91,31
6	1208,92	94,89
7	1144,51	82,27
8	668,1	98,33

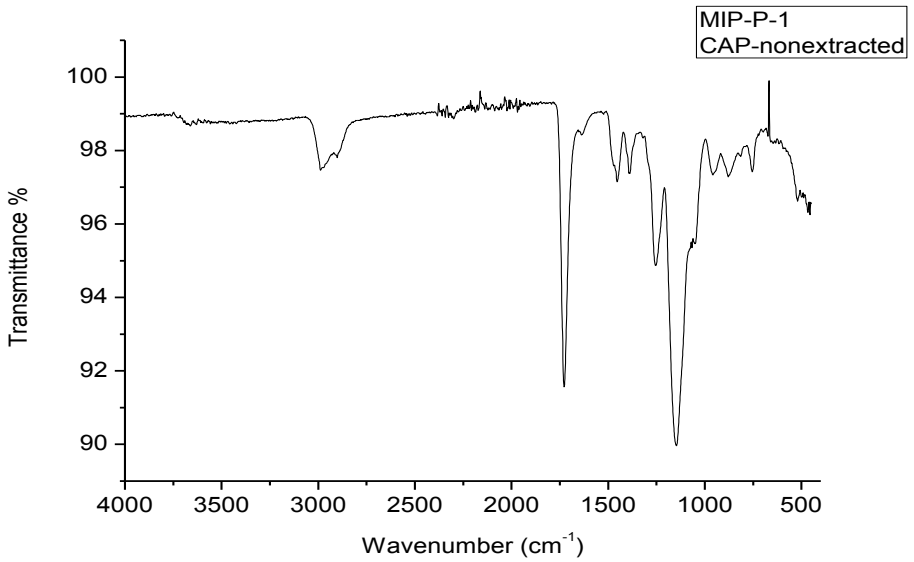


Şekil 4.18 CAP içermeyen MIP-P-1 FT-IR spektrumu

Kalıp molekül polimer ağından çıkartılmamış MIP-P-1 için FT-IR cihazı ile elde edilen spektruma ait veriler Tablo 4.13 ve Şekil 4.20'de gösterildi.

Tablo 4.13 CAP içeren MIP-P-1 FT-IR spektrum pikleri

Temel pikler	Dalga sayısı (cm^{-1})	% Geçirgenlik
1	1727,9	91,56
2	1509,48	99,07
3	1147,17	89,96
4	668,01	99,9

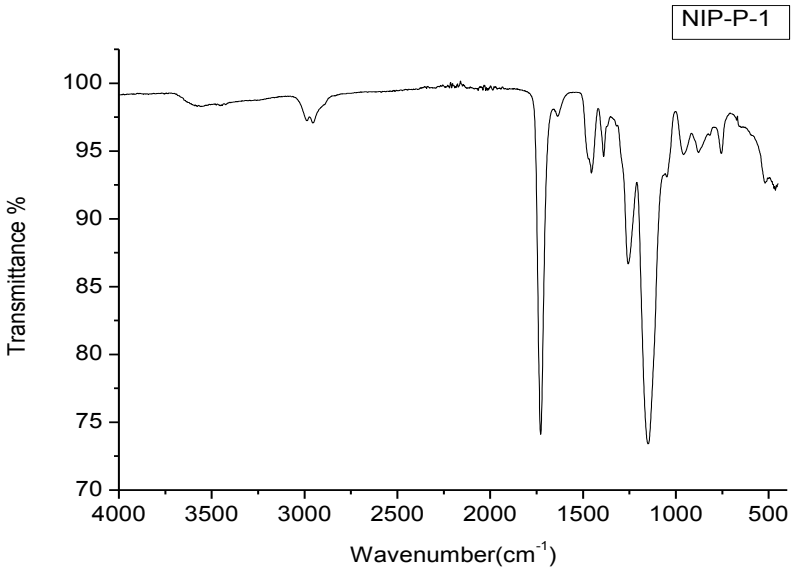


Şekil 4.19 CAP içeren içeren MIP'e ait FTIR spektrumu

NIP-P-1 için FT-IR cihazı ile elde edilen edilen spektruma ait veriler Tablo 4.14 ve Şekil 4.21'de gösterildi.

Tablo 4.14 NIP-P-1 FT-IR spektrumu pikleri

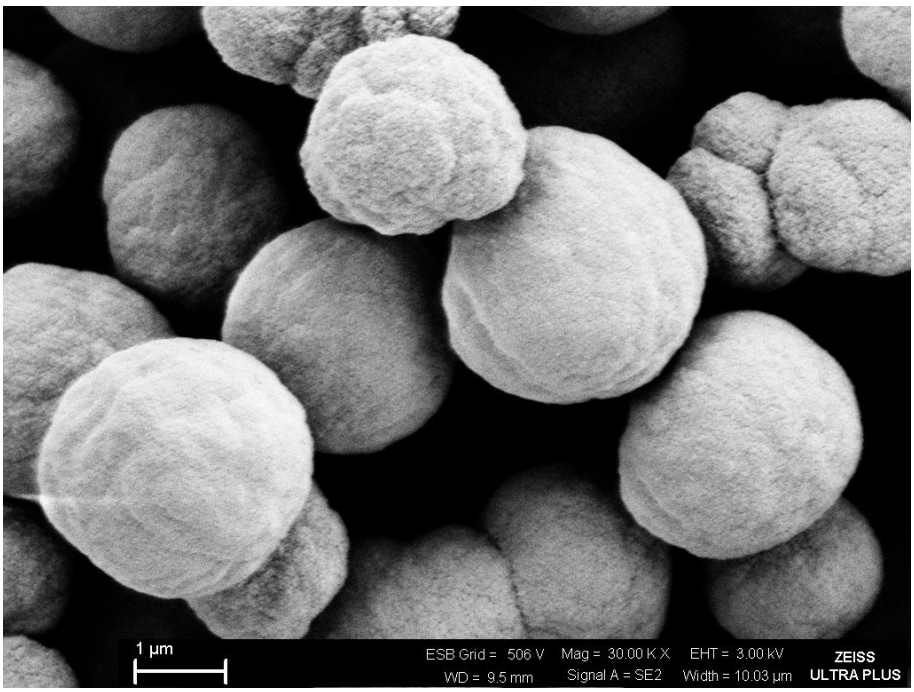
Temel pikler	Dalga sayısı (cm^{-1})	% Geçirgenlik
1	2955,03	97,06
2	2160,33	100,16
3	1728,35	74,12
4	1541,74	99,35
5	1455,26	93,38
6	1418,65	98,14
7	1388,84	94,6
8	1351,1	97,53
9	1256,69	86,68
10	1210,17	92,7
11	1148,73	73,41
12	1000,91	97,91
13	958,63	94,72
14	707,91	97,81



Şekil 4.20 NIP-P-1'e ait FTIR spektrumu

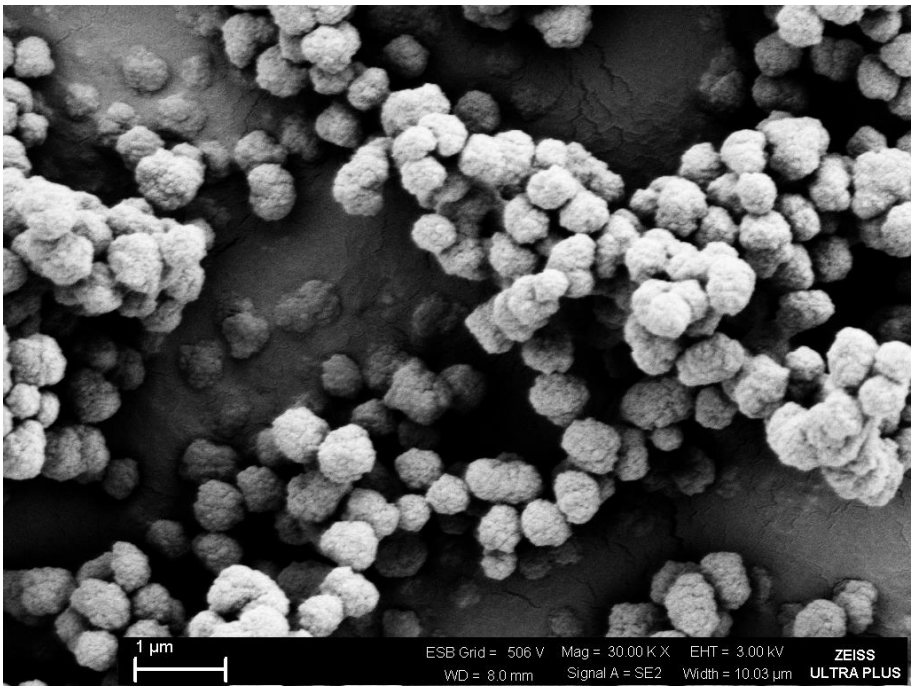
4.11.2 SEM Analizleri

MIP-P-1 için SEM cihazı kullanılarak elde edilen görüntü Şekil 4.22'de gösterildi.



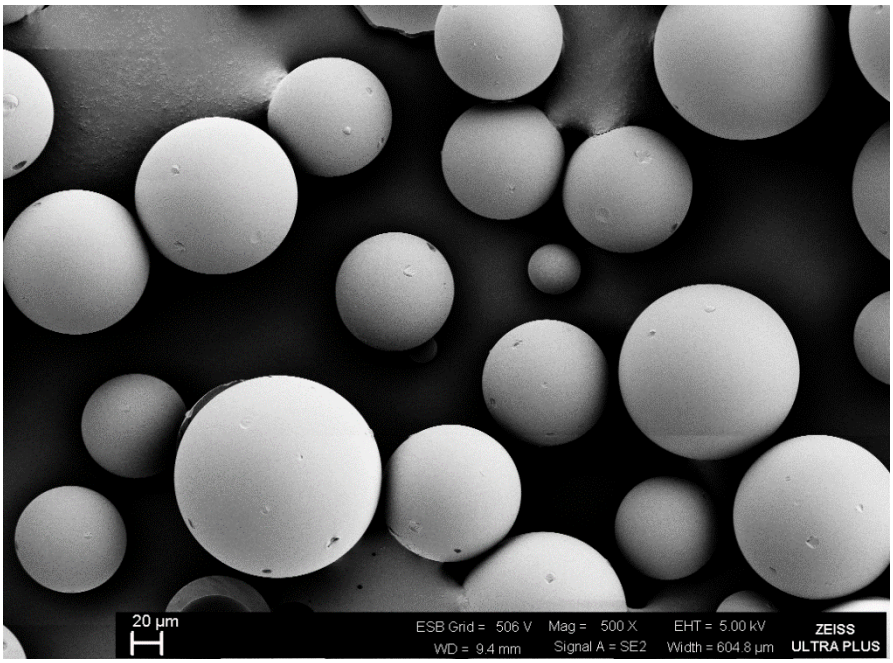
Şekil 4.21 MIP-P-1'e ait SEM görüntüsü

NIP-P-1 için SEM cihazı kullanılarak elde edilen görüntü Şekil 4.23'de gösterildi.



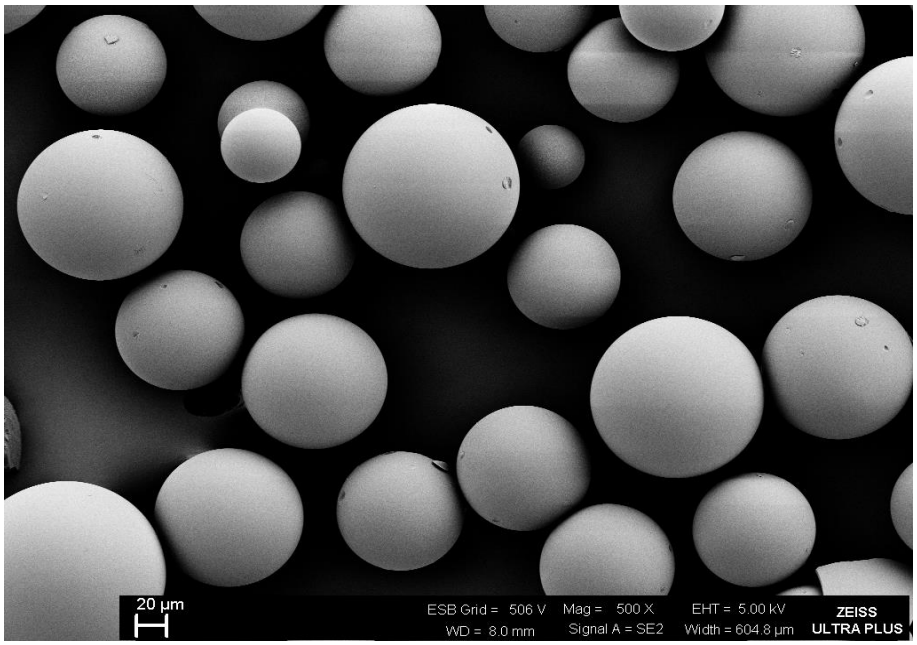
Şekil 4.22 NIP-P-1'e ait SEM görüntüsü

MIP-3-S için SEM cihazı kullanılarak elde edilen görüntü Şekil 4.24'de gösterildi.



Şekil 4.23 MIP-3-S'e ait SEM görüntüsü

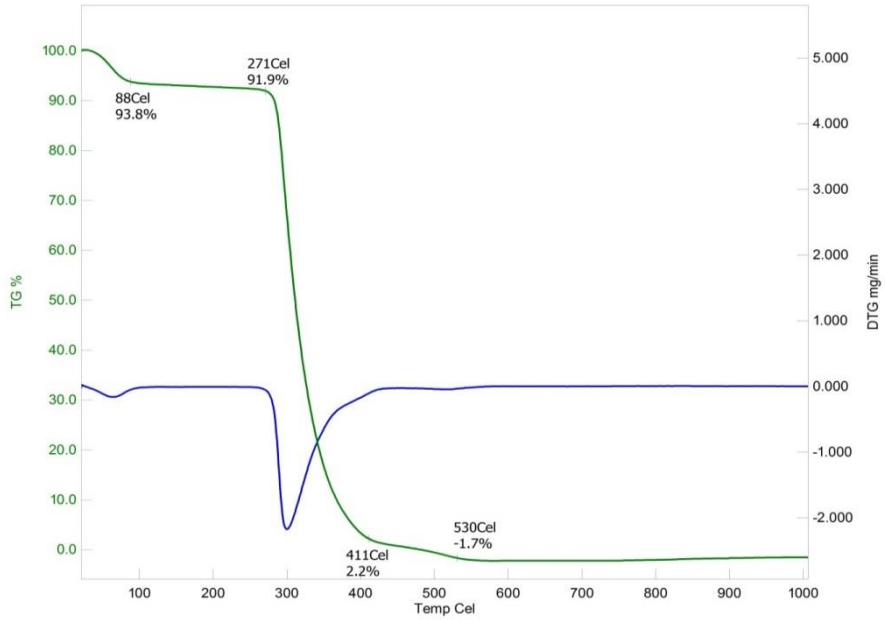
NIP-3-S için SEM cihazı kullanılarak elde edilen görüntü Şekil 4.25'de gösterildi.



Şekil 4.24 NIP-3-S'e ait SEM görüntüsü

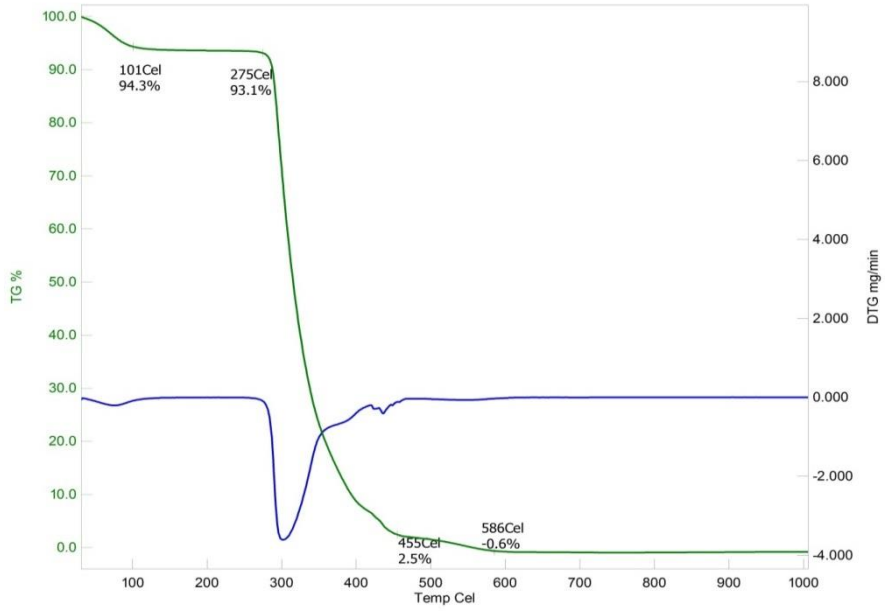
4.11.3 Termogravimetrik Analizler

MIP-P-1 için termogravimetrik analiz cihazı kullanılarak elde edilen termo gravimetrik analiz grafiği Şekil 4.26'da gösterildi.



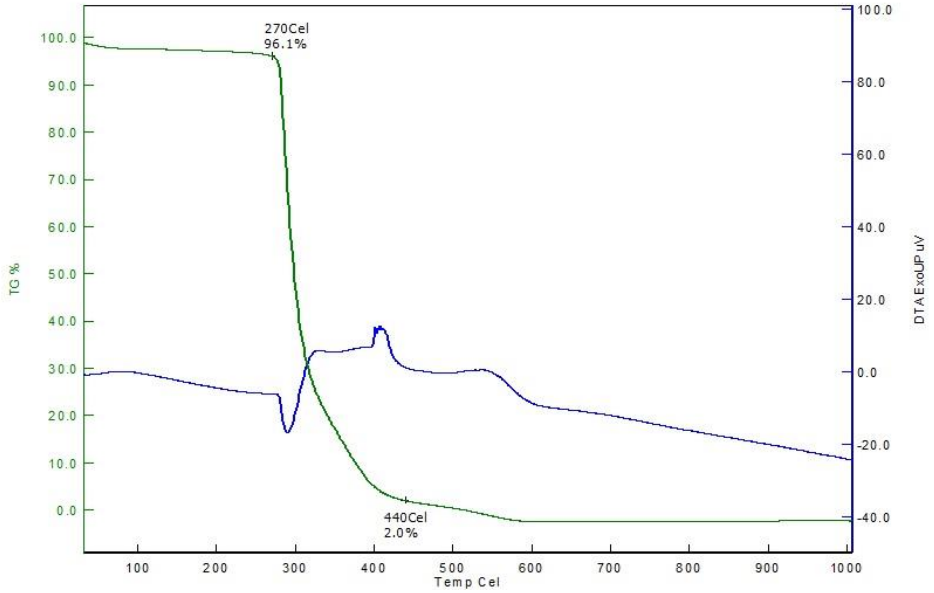
Şekil 4.25 MIP-P-1'e ait TGA Grafiği

NIP-P-1 için termogravimetrik analiz cihazı kullanılarak elde edilen termo gravimetrik analiz grafiği Şekil 4.27'de gösterildi.



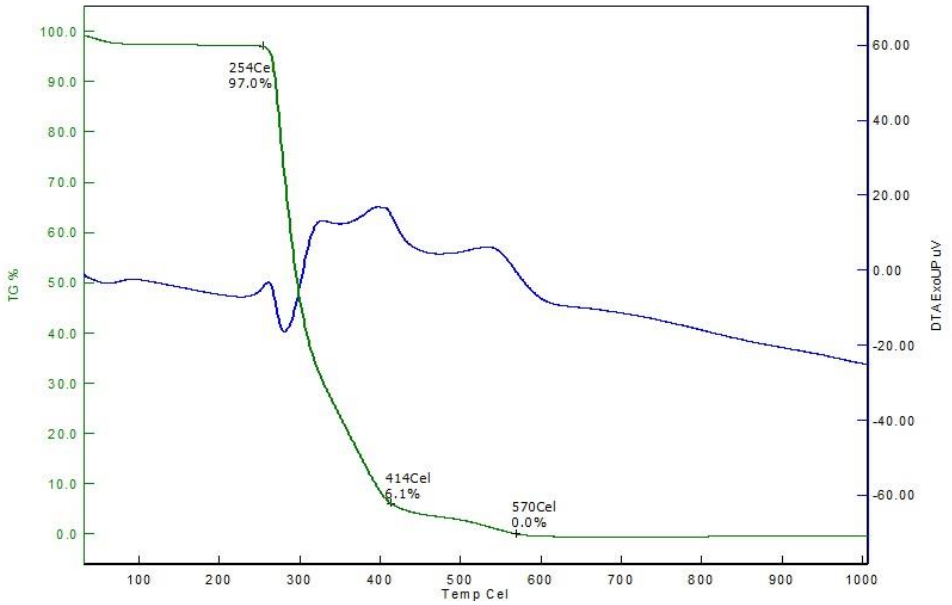
Şekil 4.26 NIP-P-1'e ait TGA Grafiği

MIP-3-S için termogravimetrik analiz cihazı kullanılarak elde edilen termo gravimetrik analiz grafiği Şekil 4.28'de gösterildi.



Şekil 4.27 MIP-3-S'e ait TGA Grafiği

NIP-3-S için termogravimetrik analiz cihazı kullanılarak elde edilen termo gravimetrik analiz grafiği Şekil 4.29'da gösterildi.



Şekil 4.28 NIP-3-S'e ait TGA Grafiği

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

CAP baskılı MIP ve kalıp molekül içermeyen NIP sentezini içeren benzer çalışmada sentezlenen MIP için NIP'e oranla en yüksek geri kazanımın fonksiyonel monomer:kalıp molekül oranı 4:1 olan MIP'te olduğu belirtilmiştir [18]. Çalışmamızda monomer:kalıp molekül oranı bu çalışmalarla benzer olarak 4:1 olarak belirlendi ve MIP sentezi bu oran üzerinden gerçekleştirildi. MIP sentezinde monomer olarak metil metakrilat ve metakrilik asit denendi, templat (kalıp) molekül olarak kloramfeinkol kullanıldı. Metil metakrilat monomeri varlığında süspansiyon polmerizasyonu ve çöktürme polimerizasyonu teknikleri kullanılarak elde edilen polimerlerin adsorpsiyon denemelerinde metakrilik asit monomerine göre CAP molekülü için çok daha düşük adsorpsiyon değerleri elde edildi.

Moleküler baskılamada oluşturulan seçici bölgeler önemli derecede monomer-kalıp molekül ön kompleksine bağlıdır. Metakrilik asidin kalıp molekül ile temelde hidrojen bağları, elektrostatik etkileşimler ve Wan der Waals etkileşimleri üzerinden yürüyen polimerizasyon ön kompleksi oluşturma kapasitesi hidrojen bağları nedeniyle metil metakrilata göre daha yüksek olduğunu göstermektedir. Her iki polimerizasyon tekniği ile sentezlenen polimerlerin SEM görüntüleri incelendiğinde MIP'lerin tanecik yapılarının NIP'lere göre daha hacimli olduğu görülmektedir. Bu durum MIP'lerin sentezinde kalıp molekülün polimer ağı içinde yer aldığını göstergesidir [64].

Çöktürme polimerizasyonu ile elde edilen MIP kalıp molekül varlığında gerçekleştirildiğinde kalıp molekül polimerizasyon oranının düşürebilir, oluşan polimer partiküllerinin hacmini artırabilir veya herhangi bir etki göstermeyebilir [65]. Bizim çalışmamızda elde edilen MIP ve NIP yapıları karşılaştırıldığında MIP partiküllerinin

NIP partiküllerine oranla önemli derecede daha hacimli oldukları görülmektedir (Şekil 4.21, 4.22).

Farklı iki yöntem kullanılarak elde edilen moleküler baskılanmış polimerlerin adsorpsiyon kinetikleri incelendi. Çöktürme polimerizasyonu ile elde edilen MIP-P-1 ve süspansiyon polimerizasyon yöntemiyle sentezlenen polimerler arasından MIP-3-S diğer polimerlerden çok daha yüksek analit tutma kapasitesi gösterdiği belirlenmiştir. Bu sebeple denemelere MIP-3-S ve MIP-P-1 ile devam edilmiştir. Buna karşılık MIP-P-1, eşlenik kontrol polimeri NIP-P-1'den önemli derecede daha yüksek tutma kapasitesi gösterirken aynı durum süspansiyon polimerizasyonu ile sentezlenen MIP-S-3 ve eşlenik kontrol polimeri NIP-S-3 için geçerli değildir (Tablo 4.2).

Claudio Baggiani vd. yaptıkları çalışmada sentezlenen MIP ve kontrol polimeri NIP'lerin tutma kapasitesi arasındaki farkları alternatif bakış açısıyla değerlendirmektedir. Buna göre kontrol polimeri NIP zayıf tutma kapasitesine sahipse MIP de sınırlı tutma kapasitesine sahip olacaktır, eğer MIP yüksek tutma kapasitesi gösteriyorsa kontrol polimeri de göreceli yüksek tutma kapasitesi gösterecektir [66]. Bizim çalışmamızda bu alternatif bakış açısı MIP-S-3 ve kontrol polimeri için geçerli değildir, batch metodu ile yapılan adsorpsiyon denemelerinde artan analit (CAP) konsantrasyonlarında söz konusu iki polimer arasında tutma kapasitelerinde bir fark gözlenmemektedir (Tablo 4.3). Buna neden süspansiyon polimerizasyonunda dispersant olarak kullanılan su çözücüsünün monomer-kalıp molekül etkileşimlerini bozması ve uygun bağlanma bölgelerinin oluşumunu azaltması olarak gösterilebilir [67]. Sentez, karakterizasyon ve katıfaz ekstraksiyon çalışmalarına MIP-P-1 üzerinden devam edildi.

MIP-P-1 ve kontrol polimeri NIP-P-1 sentezinde çözücü olarak; monomer, templat, çapraz bağlayıcı ve reaksiyon başlatıcı bileşenlerini iyi çözen ve aynı zamanda monomer-templat kompleks oluşumunu taşıdığı aprotik solvent özelliği nedeniyle azaltmayan asetonitril kullanıldı. Reaksiyonlarda çapraz bağlayıcı EGDMA, reaksiyon başlatıcı AIBN, ve monomer olarak MAA kullanımı optimize edildi.

Elde edilen MIP-P-1 ve NIP-P-1 polimerlerinin sabit CAP konsantrasyonu ve artan CAP konsantrasyonu kullanılarak gerçekleştirilen batch metodu adsorpsiyon denemelerinde polimerlerin adsorpsiyon kapasiteleri tayin edildi. Sabit konsantrasyonda

ve artan konsantrasyonda adsorpsiyon izotermleri, ve Scatchard grafikleri çizildi. Scatchard eşitliğine göre:

$Q/C_s = (Q_{maks} - Q)/K_d$ yaklaşımı geçerlidir.

Burada C_s çözeltide tutulmadan kalan CAP konsantrasyou, Q_{maks}, Q ve K_d sırasıyla polimere maksimum bağlanma sayısı, doygunluğa ulaşan polimerde bağlanma sayısı ve dağılım sabiti ifade edilmektedir. Çizilen Scatchard grafiklerinde regrasyon sabiti (R^2) hesaplanan doğruların eğimleri denge sabiti ifadesini verirken yatay ekseni kestikleri noktalar Q_{maks} değerlerini vermektedir.

MIP-P-1 için çizilen Scatchard grafiğinde farklı eğimde oluşan iki doğru polimerin seçici olan yüksek affiniteye sahip adsorpsiyon bölgesi ve seçici olmayan düşük affiniteye sahip adsorpsiyon bölgesi olmak üzere iki farklı yapı içerdiğini göstermektedir (Şekil 4.5). Bu iki doğruya ait eğim ve yatay eksen kesişim noktalarından:

MIP-P-1 Yüksek affinite bölgesi için: $Q/C_s = -240{,}57Q + 538{,}47$ eşitliği ile $Q_{maks2} = 2{,}238\ mg\ g^{-1}$ ve $K_d = 4{,}156\ mg\ mL^{-1}$ değerleri hesaplandı.

MIP-P-1 Düşük affinite bölgesi için: $Q/C_s = -31{,}36Q + 121{,}10$ eşitliği ile $Q_{maks1} = 3{,}86\ mg\ g^{-1}$ ve $K_d = 31{,}88\ mg\ mL^{-1}$ değerleri hesaplandı.

NIP-P-1 için çizilen Scatchard grafiğinde spesifik olmayan bağlanmanın meydana geldiği görülmektedir ve Scatchard için: $Q/C_s = -49{,}06Q + 60{,}76$ eşitliği ile $Q_{maks1NIP} = 1{,}238\ mg\ g^{-1}$ ve $K_d = 20{,}38\ mg\ mL^{-1}$ değerleri hesaplandı.

MIP-P-1 için yüksek affinite bölgesinde elde edilen dağılım sabiti değeri (K_d) düşük affinite bölgesinde elde edilenden daha küçüktür. Bu durum polimerin hedef molekül CAP'a olan affinitenin yüksek olduğunu göstermektedir [68]. Scatchard grafiklerinin sonuçları, sentezlenen MIP-P-1'in kontrol polimeri NIP-P-1'den CAP molekülü için daha iyi tutma özellikleri taşıdığı görülmektedir ve baskılanmış polimerin başarı ile sentezlendiğini doğrulamaktadır.

	Düşük affinite bölgesi		Yüksek affinite bölgesi	
	K_d (mg mL^{-1})	Q_{maks1} (mg g^{-1})	K_d (mg mL^{-1})	Q_{maks2} (mg g^{-1})
MIP-P-1	31,88	3,86	4,156	2,238
NIP-P-1	20,38	1,238	-	-

Batch metodu ile gerçekleştirilen adsorpsiyon miktarının zamana bağlı karakterizasyonunda MIP-P-1 için 120 dk. kontak süresinde adsorpsiyon bölgelerinin doygunluğa ulaştığı ve daha uzun süreler için bu değerin değişmediği görülmektedir (Şekil 4.8).

Adsorpsiyon kinetiğine pH etkisi incelendiğinde MIP-P-1 polimerinin CAP için optimum tutma kapasitesinin pH=5 civarında olduğu görülmektedir (Şekil 4.9). Daha yüksek pH değerlerinde (pH=7 ve pH=10) tutma kapasitesinde bir miktar düşüş meydana gelmekte. Bu durum CAP bileşiği için pKa=5,5 ve polimer yapısına dahil olan monomer bileşiği MAA için pKa=4,66 değerlerine sahip olmaları ile açıklanabilir. pH=5 değerinde tutulan çözeltide her iki bileşik hidrojen bağı yapan protonlara sahiptir. Artan pH değerlerinde her iki bileşik için proton kaybı beklenebilir ve bunun sonucunda oluşan negatif yüklü anyon yapıları birbirini iterek adsorpsiyonun önemli derecede düşmesi beklenirken bu durum gözlenmemiştir. Sentezlenen polimer ile analit bileşik arasındaki bağlanma karakteristiğinin hidrojen bağları yanında önemli derecede Van Der Waals etkileşimleri üzerinden meydana geldiğini göstermektedir. Bu olgu polimer için elde ettiğimiz göreceli düşük Q değerlerini açıklamaktadır.

Baskılanmış polimerlerin seçicilik özelliklerini ifade eden baskılama faktörleri ele alındığında sentezlediğimiz MIP-P-1 polimerinin optimize edilen pH ve kontak süresi uygulandığında: $Q_{CAP\text{-}MIP\text{-}P\text{-}1/}\ Q_{CAP\text{-}NIP\text{-}P\text{-}1}$ = 3,44 Q_{CAP}/Q_{FAP} = 1,22 ve Q_{CAP}/Q_{TAP} = 1,64 değerleri elde edildi (Tablo 4.8). Bu sonuçlar benzer çalışmalarda elde edilen değerlerden düşüktür fakat göreceli farklanma, sentezlenen polimerin katı faz ekstraksiyon uygulamasında seçicilik özelliği taşıması ile teyit edilmektedir.

Kimyasal ve morfolojik yapısı açıklanan ve adsorpsiyon karakteristikleri optimize edilen MIP-P-1 polimerinin katı faz ekstarksiyon uygulamasında seçici olmayan adsorpsiyonu azaltmak ve matriks etkisini gidermek için elüsyon işleminden

önce yıkama çözücüsü olarak Su : metanol (60:40) karışımı kullanımının en uygun sonuç verdiği belirlendi, düşük polariteye sahip asetonitril ve etilasetat çözücülerinin kullanılması durumunda MIP ve kontrol polimeri NIP arasında CAP bileşiğini geri kazanım farkının azaldığı görüldü (Şekil 4.10). Xizhi Shi vd. yaptıkları benzer çalışmada MIP ve NIP'in tutma kapasitelerinde en büyük farklanmanın yıkama çözeltisi olarak su:metanol (60:40) kullanıldığında gerçekleştiğini bulmuşlardır [18].

Optimize edilen katı faz ekstraksiyonunun süt çözeltilerine uygulanması ile 0,01-10 ppm konsantrasyon aralığında: CAP bileşiği için 82,5±5,6 - 91,8±3,7 geri kazanım değeri elde edilirken, FAP için 73±5,3 - 83,6±4,8 ve TAP için 71,2±4,1 - 72,6±3,6 geri kazanım değerleri elde edildi (Tablo 4.11). Süspansiyon polimerizasyonu kullanılarak elde edilen MIP'lerin kullanıldığı benzer çalışmalarda süt örneklerine spike edilen 0,005-0,1 ppm aralığındaki CAP konsantrasyonlarında %92,7 ile %90,2 aralığında geri kazanımlar elde edilmiştir [18].

Sentezlenen MIP-P-1 ve kontrol polimerinin yapı aydınlatılması için katı fazda alınan FT-IR spektrumları MIP-P-1 CAP çıkarılmış (extracted), MIP-P-1 CAP çıkarılmadan (non-extracted) ve NIP-P-1 olarak üç kısımdan oluşmaktadır. Spektrumlarda yer alan ortak piklerden 1455 cm^{-1}'de ve 1388 cm^{-1}'de görülen pikler sırasıyla EGDMA çapraz bağlayıcıda bulunan $–CH_2$ ve $–CH_3$ gurubuna ait C-H gerilmesinden kaynaklanmaktadır. 2949 cm^{-1}'deki ikili pikler polimer ağında yer alan metil ve metilen gruplarındaki C-H bağlarının simetrik ve asimetrik gerilmelerinden kaynaklanmaktadır, 1730 cm^{-1}'deki adsorpsiyon pikleri çapraz bağlayıcı olarak kullanılan EGDMA'nın yapısında bulunan karbonil grubu pikleridir. 1158 cm^{-1}'deki adsorpsiyon pikleri C-O ve C-C bağlarının gerilme titreşiminden kaynaklanmaktadır [69]. CAP içeren ve CAP içermeyen MIP-P-1'e ait spektrumlar benzerdir, aralarındaki fark ~3000 cm^{-1} de kloramfenikol aromatik halkasına ait C-H gerilmesinden meydana gelen pik CAP içeren polimerde şiddetli olarak gözlenmektedir. Ayrıca CAP içeren MIP-P-1 polimerine ait 1509 cm^{-1}'deki pik CAP yapısında bulunan –NH gurubundaki N-H gerilmesinden kaynaklanmaktadır bu da bize CAP molekülünün polimer ağında bulunduğunu göstermektedir.

MIP-P-1 için elde edilen termogravimetrik analiz grafiği incelendiğinde 88 °C'de polimer yapısında kalan porojen (asetonitril) uzaklaşmıştır. MIP-P-1 271 °C'ye

kadar stabilitesini korumuş, daha yüksek sıcaklıklara çıkıldığında polimer bozunmaya başlamıştır. NIP-P-1 için elde edilen termo-gravimetrik analiz grafiği incelendiğinde 101 °C'de polimer yapısında kalan porojen (asetonitril) veya bir miktar nem uzaklaşmıştır. NIP-P-1 275 °C'ye kadar stabilitesini korumuş, daha yüksek sıcaklıklara çıkıldığında polimer bozunmaya başlamıştır. Termogravimetrik sonuçlar sentezlenen polimerin termal kararlılığını yaklaşık 270 °C'ye kadar devam ettirdiğini göstermektedir [70].

Sonuç olarak çalışmamızda çöktürme polimerizasyonu ile sentezlemiş olduğumuz moleküler baskılı polimer, yaptığımız karakterizasyon ve SPE optimizasyonları doğrultusunda fenikoller gurubunda yer alan antibiyotikler CAP, analogları FF ve TAP bileşiklerinin süt numunelerinden izolasyonu için etkin katı faz ekstraksiyon adsorbanı olarak kullanılabilir ve bu bileşikler LC-MS/MS ile düşük konsantrasyon aralıklarında tayin edilebilir.

KAYNAKLAR

[1] Ş. Saygı, D. Battal, N. Özlen Şahin, ***Çevre ve İnsan Sağlığı Yönünden İlaç Atıklarının Önemi***, Marmara Pharmaceutical Journal, 16, 82-90, (2012).

[2] M. Topal, G. Uslu Şenel, I. Arslan Topal, E. Öbek, ***Antibiyotikler ve Kullanım Alanları***, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 31, 3, 121-127, (2015).

[3] A. Pavlov, L. Lashev, I. Vachin, V. Rusev, ***Residues of Antimicrobial Drugs in Chicken Meat and Offals***, Trakia Journal of Science, 6, 23-25, (2008).

[4] Y. Şanlı, ***Veteriner Klinik Farmakoloji ve İlaçla Sağaltım İlkeleri***, (Özkan Matbaacılık, Ankara, 1999).

[5] L. Santos, J. Barbosa, M.C. Castilho, F. Ramos, C.A. Fontes Riberio, M.I. Noronha Da Silveira, ***Determination of chloramphenicol in rainbow trouts by gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry***, Analytica Chimica Acta, 529, 1, 249-256, (2005).

[6] M.A. Arcangioli, S. Leroy-Setrin, J.L. Martel, E. Chaslus-Dancla, ***A new chloramphenicol and florfenicol resistance gene flanked by two integron structures in Salmonella typhimurium DT104***, Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters, 174, 327-332, (1999).

[7] M. Braibant, J. Chevalier, E. Chaslus-Dancla, J.M. Pages, A. Cloeckaert, ***Structural and Functional Study of the Phenicol-Specific Efflux Pump Flor Belonging to the Major Facilitator Superfamily***, Antimicrobial Agents and Chemotherapy 49, 7, 2965-2971, (2005).

[8] S. Kaya, ***Veteriner Uygulamalı Farmakoloji,*** (Medisan, Ankara, 2000).

[9] J. Alcorn, P. Dowling, M. Woodbury, R. Killeen, ***Pharmacokinetics of Florfenicol in North American elk (Cervus elaphus)***, Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 27, 289-292, (2004).

[10] B.K. Park, J.H. Lim, M.S. Kim, Y.H. Hwang, H.I. Yun, ***Pharmacokinetics of florfenicol and its metabolite, florfenicol amine, in dogs***, Research in Veterinary Science, 84, 85-9, (2008).

[11] A.L. Cook, M. St Claire, R. Sams, ***Use of Flofenicol in Non-human Primates***, Journal of Medical Primatology 33, 127-133, (2004).

[12] B.A. Craene, P. Deprez, E. D'haese, H.J. Nelis, A.P. Leenheer, ***Pharmacokinetics of Florfenicol in Cerebrospinal Fluid and Plasma of Calves***, Antimicrobial Agents and Chemotherapy 41, 9, 1991-1995, (1997).

[13] G.J. Vogel, J.C. Parrott, ***Mortality survey in feedyards: The incidence of death from digestive, respiratory and other causes in feedyards on the great plains***, Compendium on Continuing Education fort the Practising Veterinarian 16, 2, 227-234, (1994).

[14] P. Mottier, V. Parisod, E. Gremaud, P.A. Guy, R. H. Stadler, ***Determination of antibiotic chloramphenicol in meat and seafood by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry***, Journal of Chromatography A, 994, 1-2, 75-84, (2003).

[15] A. Gantverg, I. Shishani, M. Hoffman, ***Determination of chloramphenicol in animal tissues and urine Liquid chromatography-tandem mass spectrometry versus gas chromatography-mass spectrometry***, Analytica Chimica Acta, 483, 125-135, (2003).

[16] Commission Decision, 2003/181/ED of 13 March 2003, Official Journal of European Commission, L71/17, (2003).

[17] L.M.L. Nollet, ***Handbook of Food Analysis: Residue and Other Food Component Analysis***, (CRC Press, New York, 2004).

[18] X. Shi, A. Wu, S. Zheng, R. Li, D. Zhang, ***Molecularly imprinted polymer microspheres for solid-phase extraction of chloramphenicol residues in food***, Journal of Chromatography B, 850, 24-30, (2007).

[19] L. Shulamit, ***Solid phase extraction (SPE)***, http://www.forumsci.co.il/HPLC/spe_abic.pdf (2005).

[20] M. Zief, R. Kiser, ***Solid Phase Extraction for Sample Preparation***, (JT Baker, Phillipsburg, 2005).

[21] Macherey-Nagel, ***Sample Preparation Solid Phase Extraction***, (Macherey-Nagel Catalogue, 2004).

[22] J. Haginaka, ***Selectivity of Affinity Media in Solid Phase Extraction of Analytes***, Trends in Analytical Chemistry, 24, 5, 407-415, (2005).

[23] İ. Narin, M. Soylak, L. Elçi, M. Doğan, ***Determination of Trace Metal Ions by AAS in Natural Water Samples After Preconcentration of Pyrocatechol Violet Complexes on an Activated Carbon Column***, Talanta 52, 6, 1041-1046, (2000).

[24] S. Saraçoglu, L. Elçi, ***Column Solid-Phase Extraction with Chromosorb-102 Resin and Determination of Trace Elements in Water and Sediment Samples by Flame Atomic Absorption Spectrometry***, Analytica Chimica Acta, 452, 1, 77-83, (2002).

[25] M. Tuzen, M. Soylak, L. Elçi, ***Multi-Element Pre-concentration of Heavy Metals Ions by Solid Phase Extraction on Chromosorb 108***, Analytica ChimicaActa, 548, 1-2, 101-108, (2005).

[26] M. C. Hennion, ***Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography***, Journal of Chromatography A, 856, 1-2, 3-54, (1999).

[27] P. J. Beney, G. M. Breuer, G.H. Jacobs, ***Review, Evaluation, and Application of Solid Phase Extraction Methods***, Hotlines, 35, 1-5, (1996).

[28] R.E. Majors, ***New designs and formats in solid-phase extraction sample preparation***, LCGC North America, 19, 678-687, (2001).

[29] G. Le Blanc, ***A review of EPA sample preparation techniques for organic compound analysis of liquid and solid samples***, LCGC North America, 19, 1120-1130, (2001).

[30] T. Ikegami, T. Mukawama, H. Nariai, T. Takeuchi, ***Bisphenol Arecognition polymers prepared by covalent molecular imprinting***, Analytica Chimica Acta, 504, 131-135, (2004).

[31] A. Molinelli, ***Molecular imprinted polymers: Towards a rational understanding of biomimetic materials***, Georgia Institute of Technology, In partial fulfillment of the requirement for the degree doctor of philosophy in chemistry, (2004).

[32] E. Caro, N. Masqué, R.M. Marcé, F. Borrull, P.A.G. Cormack, D.C. Sherrington, ***Noncovalent and semi-covalent molecularly imprinted polymers for selective on-line solid-phase extraction of 4-nitrophenol from water samples***, Journal of Chromatography A, 963, 169-178, (2002).

[33] J. Steinke, D. Sherrington, I. Dunkin, ***Imprinting of synthetic polymers using molecular templates***, Advances in Polymer Science, 123, 80-125, (1995).

[34] M. Komiyama, T. Takeuchi, T. Mukawa, H. Asanuma, ***Molecular Imprinting: From Fundamentals to Applications***, (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2003).

[35] A. Katz, M.E. Davis, ***Investigations into the Mechanisms of Molecular Recognition with Imprinted Polymers***, Macromolecules, 32, 4113-4121, (1999).

[36] X.C. Dong, H. Sun, X.Y. Lu, H.B. Wang, S.X. Lui, N. Wang, ***Separation of ephedrine stereoisomers by molecular imprinted polymers influence of synhetic condition and mobile phase compositions on the chromatographic performance***, Analist, 127, 1427-1432, (2002).

[37] C. He, Y. Long, J. Pan, K. Li, ***Application of molecularly imprinted polymersd to solid phase extraction of analytes from real samples***, Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 70, 133-150, (2007).

[38] K. Mosbach, O. Ramson, ***The Emerging Technique of Molecular Imprinting and Its Future Impact on biotechnology***, Biotechnology, 14, 163-170, (1996).

[39] M.J. Whitcombe, M.E. Rodriguez, P. Villar, E.N. Vulfson, ***A new method for the introduction of recognition site functionally into polymers prepared by molecular imprinting synthesis and characterization of polymeric receptors for cholestreol***, Journal of American Chemical Society, 117, 7105-7111, (1995).

[40] C. Cacho, E. Turiel, A.M. Esteban, C.P. Conde, C. Camara, ***Characterisation and quality assesment of binding sites on a propazine imprinted polymer prepared by precipitation polymerisation***, Journal of Chromatography B, 802, 347-353, (2004).

[41] L. Ye, K. Mosbach, ***The technique of molecular imprinting principle state of the art and future aspect***, Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 41, 107-113, (2001).

[42] O. Brüggemann, K. Haupt, L. Ye, E. Yılmaz, K. Mosbach, ***New configuration and applications of molecularly imprinted polymers,*** Journal of Chromatography A, 889, 15-24, (2000).

[43] J. Haginaka, ***Monodispersed molecularly imprinted polymers as affinity based chromatography media***, Journal of Chromatography B, 866, 3-13, (2007).

[44] F. Liu, X. Liu, S.C. Ng, H.S.O. Chan, ***Enantioselective molecular imprinting polymer coated QCM for the recognition of 1-tryptophan***, Sensors and Actuators B, 113, 234-240, (2006).

[45] H. Yan, K.H. Row, ***Characteristic and Synthetic Approach of Molecularly Imprinted Polymer***, International Journal of Molecular Sciences, 7, 155-178, (2006).

[46] N. Zhong, H.S. Byun, R. Bittman, ***Hydrophilic cholesterol-binding molecular imprinted polymers***, Tetrahedron Letters, 42, 1839-1841, (2001).

[47] L.I. Andersson, ***Molecular imprinting for drug bioanalysis a review on the application of imprinted polymers to solid phase extraction and binding assay***, Journal of Chromatography B, 739, 163-173, (2000).

[48] K. Haupt, ***Molecularly Imprinted Polymers in Analytical Chemistry***, Analyst, 126, 747-756, (2001).

[49] P. Spegel, L. Schweitz, S. Nilsson, ***Molecularly Imprinted Polymers***, Analytical Bioanalytical Chemistry, 107, 372-378, (2002).

[50] B. Sellergren, B. Ekberg, K. Mosbach, ***Molecular Imprinting of Amino Acid Derivates in Macroporous Polymers***, Journal of chromatography A, 347, 1-10, (1985).

[51] J. Haginaka, C. Kagawa, ***Chiral Resolution of Derivatized Amino Acids Using Uniformly Sized Molecularly imprinted Polymers in Hydro-Organic Mobile Phases***, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 378, 1907‑1912, (2004).

[52] P.A.G. Cormack, K. Mosbach, ***Molecular Imprinting: Recent Developments and The Road Ahead***, Reactive and Functional Polymers, 41, 115-124, (1999).

[53] W.M. Mullett, M.F. Dirie, E.P.C. Lai, H. Guo, X. He, ***2-aminopyridine molecularly imprinted polymer surrogate micro-column for selective solid phase extraction and determination of 4-aminopyridine,*** Analytica Chimica Acta, 414, 123-131, (2000).

[54] J. Matsui, K. Fujiwara, T. Takeuchi, ***Atrazine-Selective Polymers Prepared by Molecular Imprinting of Trialkylmelamines as Dummy Template Species of Atrazine,*** Analytical Chemistry, 72, 8, 1810-1813, (2000).

[55] R.Walsh, ***Development and characterisation of molecularly imprinted suspension polymers,*** Waterford Institute of Technology, A thesis for the degree of doctor of philosophy, (2010).

[56] B. Sellergren, ***Imprinted chiral stationary phases in high-performance liquid chromatography***, Journal of Chromatography A, 906, 227-252, (2001).

[57] B. Sellergren, K.J. Shea, ***Influence of polymer morphology on the ability of imprinted network polymers to resolve enantiomers***, Journal of Chromatography A, 635, 31-49, (1993).

[58] B. Okutucu, ***Seratonin'e Spesifik Moleküler Damgalı Polimerlerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu***, Ege Üniversitesi, Fen Bilimler Enstitüsü Doktora Tezi, 200, (2007).

[59] P.A.G. Cormack, A.Z. Elorza, ***Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation***, Journal of Chromatography B, 804, 173-182, (2004).

[60] A. Molinelli, J. O'Mahony, K. Nolan, M.R. Smyth, M. Jakusch, B. Mizaikoff, ***Analyzing the Mechanisms of Selectivity in Biomimetic Self-Assemblies via IR and NMR Spectroscopy of Prepolymerization Solutions and Molecular Dynamics Simulations***, Analytical Chemistry, 77, 16, 5196-5204, (2005).

[61] B. Sellergren, M. Lepistoe, K. Mosbach, ***Highly enantioselective and substrate-selective polymers obtained by molecular imprinting utilizing noncovalent interactions. NMR and chromatographic studies on the nature of recognition***, Journal of American Chemical Society, 110, 17, 5853-5860, (1988).

[62] R. Kumar, Y.K. Agrawal, ***Analytical Strategies for Characterization of Molecular Imprinted Polymers: A current Review***, International Journal of ChemTech Research, 6, 2, 1162-1167, (2014).

[63] R.W. Fedeniuk, M. Mizuno, C. Neiser, C. O'Bryne, ***Development of LC-MS/MS methodology for detection and confirmation of chloramphenicol, chloramphenicol 3-O-ß-D-glucoronide, florfenicol, florfenicol amine and thiamphenicol residues in bovine, equine and porcine liver***, Journal of Chromatography B, 991, 68-78, (2015).

[64] O. Brüggemann, ***Catalytically active polymers obtained by molecular imprinting and their application in chemical reaction engineering***, Biomoleculer Engineering, 18, 1-7, (2001).

[65] A. Beltran, R.M. Marce, P.A.G. Cormack, F. Borrull, ***Synthesis by precipitation polymerisation of molecularly imprinted polymer microspheres for the selective extraction of carbamazepine and oxcarbazepine from human urine***, Journal of Chromatography A, 1216, 12, 2248-2253, (2009).

[66] C. Baggiani, C. Giovannoli, L. Anfossi, C. Passini, P. Baravelle, G.Giraudi, ***A Connection between the Binding Properties of Imprinted and Nonimprinted Polymers: A Change of Perspective in Molecular Imprinting***, Journal of American Chemical Society, 134, 3, 1513-1518, (2012).

[67] A. Beltran, F. Borrull, P.A.G. Cormack, R.M. Marce, ***Molecularly-imprinted polymers: useful sorbents for selective extractions***, Trends in Analytical Chemistry, 29, 11, 1363-1375, (2010).

[68] L. Ziru, L. Zhenlin, W. Jiangtao, ***Selective extraction and concentration of mebendazole in seawater samples using molecularly imprinted polymer as sorbent***, Marine Pollution Bulletin, 91, 96-101, (2015).

[69] Y.F. Jin, Y.J. Zhang, Y.P. Zhang, J. Chen, X.M. Zhou, L.Y. Bai, ***Synthesis and Evalutaion of Molecularly Imprinted Polymer for the Determination of the Phthalate Esters in the Bottled Beverages by HPLC***, Journal of Chemistry, 903210, (2013).

[70] S. Sadeghi, M. Jahani, ***Selective solid-phase extraction using molecular imprinted polymer sorbent for the analysis of Florfenicol in food samples***, Food Chemistry, 141, 1242-1251, (2013).

ÖZGEÇMİŞ

Tayfun CEYHAN

01.09.1981 tarihinde Balıkesir'de doğdu. 1998 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünde başladığı lisans öğrenimini 2004 yılında tamamladı. 2013 yılında Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans yapmaya hak kazandı.

2011-2015 yılları arasında Edirne Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğünde çalışmış olup 2015 yılından bu yana Tekirdağ Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğünde çalışmaktadır.