



Kapari Bitkisinden Moleküler Baskılama Yöntemi ile Yüksek Safılıkta Kuersetin Eldesi

Program Kodu: 3001

Proje No: 116Z775

Proje Yürütücüsü:
Dr. Öğr. Üyesi Pınar ÇAKIR HATIR

Araştırmacı(lar):

Dr. Fatma Elif Çepni Yüzbaşıoğlu

Bursiyer(ler):

Nur Muhammed Mustafaoğlu

Batuhan Balta

Şeyma Türker

NİSAN 2019
İSTANBUL



ÖNSÖZ

Biyoaktif bitki özlerinden biri olan ve yurt dışından ithal edilen kuersetin, elma, çilek, çay, fındık, kapari gibi bitkilerde bulunan flavonoidlerden olup önemli gıda maddelerinden biridir. Kuersetin molekülünün antioksidan, antiinflamatuvar ve antikanser gibi farmakolojik aktiviteler gösterdiği bilinmektedir. Antik zamanlardan bu yana kullanılmakta olan kapari bitkisi (*Capparis spinosa*) ılıman Akdeniz ikliminde yetişir ve ülkemizde geniş bir yayılış gösterir. Kapaninin kuersetin ve türevleri bakımından zengin olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur. Dolayısıyla, kapari bitkisi yüksek saflıkta kuersetin eldesine imkân tanımakta ve Türkiye'deki kapari üretimi göz önüne alındığında bu potansiyelin değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu projenin amacı ilk kez moleküler baskılanmış katı faz ekstraksiyonu (MISPE) ile kapari bitkisinden yüksek saflıkta kuersetin molekülü üretilmesi ve elde edilen hammaddenin ülke içinde kullanılmasını sağlamak, bu şekilde ülkemizin dışa bağımlılığını azaltmaktır. Çalışma sonucunda kuersetini tanıyan moleküler baskılanmış polimerler üretilmiş ve bu polimerlerin kapari ekstresindeki kuersetini diğer analoglarına oranla daha fazla tuttuğu sonucuna varılmıştır. Elde edilen bu polimerler kapariden kuersetin eldesinde kullanılmıştır.

Projede gerçekleştirilen çalışmalar, İstanbul Arel Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Dr. Öğr. Üyesi Pınar Çakır Hatır yürütücülüğünde ve projede araştırmacı olarak görev alan Ebittek Biyoteknoloji Ar-Ge Tic. Ltd. Şti. firmasının (İstanbul Üniversitesi Teknokenti) kurucusu Dr. Fatma Elif Çepni Yüzbaşıoğlu eşliğinde İstanbul Arel Üniversitesi ve İstanbul Üniversitesi laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Proje çalışmaları üç lisans bursiyerinin katkılarıyla yapılmıştır. Çalışmanın sonuçları 14-17 Ekim 2018 tarihlerinde Nice'te düzenlenen uluslararası "The 4th International Conference On Bioinspired And Biobased Chemistry & Materials" Kongresi'nde "Synthesis And Characterization Of Molecularly Imprinted Polymers For Solid Phase Extraction Of Quercetin" başlıklı poster bildirisi olarak sunulmuştur. Yürütücü Pınar Çakır Hatır, bu proje ile CA16215 (PortASAP) cost aksiyonuna Türkiye MC üyesi olarak dâhil olmuş, aksiyonun toplantılarına katılmış ve yeni iş birlikleri kurmuştur. 116Z775 no'lu projemizi destekleyerek sunduğu maddi olanaklardan dolayı TÜBİTAK'a ve çalışmalarımızı gerçekleştirmemiz için sunduğu fiziki imkânlardan dolayı İstanbul AREL Üniversitesi'ne sonsuz teşekkürlerimizi sunarız.



İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
TABLolar DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	2
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	7
3.1 Gereçler.....	7
3.1.1 Cihazlar.....	7
3.1.2 Malzemeler	8
3.2 Yöntemler	9
3.2.1 Kuersetin ile monomer etkileşiminin UV/Vis spektroskopisi ile araştırılması	9
3.2.2 Kuersetin ile monomer etkileşiminin FTIR spektroskopisi ile araştırılması	9
3.2.3 Deney tasarımı ile polimerizasyon koşullarının belirlenmesi.....	9
3.2.4 Baskılanmış polimerlerin sentezi ve karakterizasyonu.....	10
3.2.5 Bağlanma testlerinin yapılması ve bağlanma faktörlerinin belirlenmesi	11
3.2.6 Kapari bitkisi özütündeki moleküllerin belirlenmesi.....	12
3.2.7 İnce Tabaka Kromatografisi (İTK).....	12
3.2.7 Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) analizi	13
3.2.8 Kuersetin molekülünün kolon kromatografisi ile saflaştırılması	13
3.2.9 MISPE ile kapariden kuersetin eldesi	13
4. BULGULAR.....	14
4.1 Kuersetin ile monomerlerin farklı çözücülerdeki etkileşimlerinin UV/Vis spektroskopisi ile araştırılması.....	14
4.2 Kuersetin ile monomer etkileşiminin FTIR spektroskopisi ile araştırılması	16
4.3 Baskılanmış polimerlerin sentezi ve karakterizasyonu	17
4.4 Deney tasarımı analizi için bağlanma testlerinin yapılması ve bağlanma faktörlerinin belirlenmesi	19
4.5 Bağlanma kinetiklerinin belirlenmesi	20
4.6 Farklı çözücülerde bağlanma çalışmalarının yapılması	21
4.7 Seçicilik çalışması.....	22



4.8 Kapari bitkisi özütündeki moleküllerin belirlenmesi.....	23
4.9 HPLC Metot Geliştirme	24
4.10 Bitki özütünün HPLC ile analizi	25
4.11 Kuersetin molekülünün kolon kromatografisi ile saflaştırılması.....	26
4.12 MISPE ile kapariden kuersetin eldesi	27
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	28
6. KAYNAKLAR.....	29



TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Kullanılan cihazlar	7
Tablo 2. Kullanılan kimyasallar	8
Tablo 3. Deney tasarımı polimerizasyon koşulları	10

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Keparide bulunan kuersetin, kaempferol molekülleri ve türevleri	3
Şekil 2. Moleküler baskılama tekniğinin şematik gösterimi.....	5
Şekil 3. Kuersetin molekülünün UV spektrumunda iki farklı dalga boyunda absorpsiyon veren grupları.....	14
Şekil 4. A) MeOH'da farklı oranlarda QC:MAA UV/Vis spektrumları, B) MeOH'da farklı oranlarda QC:4VP UV/Vis spektrumları, C) THF'de farklı oranlarda QC:MAA UV/Vis spektrumları, D) THF'de farklı oranlarda QC:4VP UV/Vis spektrumları, E) DMSO'da farklı oranlarda QC:4VP UV/Vis spektrumları, F) DMSO'da farklı oranlarda QC:MAA UV/Vis spektrumları, G) ACN'de farklı oranlarda QC:MAA UV/Vis spektrumları. H) ACN'de farklı oranlarda QC:4VP UV/Vis spektrumları.....	15
Şekil 5. Kuersetin, 4VP, kuersetin-4VP kompleksi, MAA, kuersetin-MAA komplekslerinin FTIR spektrumları.	17
Şekil 6. MIP yıkama çözeltilerinin UV/Vis spektrumları	18
Şekil 7. NIP, MIP ve kuersetinin FTIR spektrumları	19
Şekil 8. Monomer ve başlatıcı derişimleri ile % bağlanma miktarı arasındaki tepki yüzeyi grafiği.	20
Şekil 9. MIP ve NIP'in adsorpsiyon izotermi ve Qmax, KD değerleri	21
Şekil 10. Farklı çözücülerin bağlanma kapasitesine etkisi.....	21
Şekil 11. Rutin ile elde edilen Scatchard grafiği	23
Şekil 12. Farklı mobil fazlar sonucunda elde edilen ITK silika jel görüntüleri. A) EtOAc:Glasiyel Asetik Asit:Formik Asit:Su (100:11:11:25, v/v), 1: <i>C. spinosa</i> L. ekstresi, 2: Kuersetin, 3: Rutin B) Toluene:EtOAc:Formik asit (5:4:0,2), 1: Kuersetin, 2: <i>C. spinosa</i> L. ekstresi C) Toluene:EtOAc:Formik asit (5:4:0,2), 1: Kuersetin, 2: Rutin.....	23
Şekil 13. Rutin ve kuersetin kromatogramları.	24
Şekil 14. Farklı derişimlerdeki kuersetin ve rutin kromatogramları ve kalibrasyon eğrileri.	25
Şekil 15. Ekstre kromatogramları (pembe çizgi) ve rutin/kuersetin kromatogramları (siyah çizgi).....	26
Şekil 16. A) MeOH-EtOAc (20:80 -10:90) ve metanol sonrası elde edilen fraksiyonlar, B) Toluene-etil asetat-formik asit (5:4:0.2, v/v) ile elde edilen fraksiyon bantları.....	27
Şekil 17. MISPE fraksiyonlarının ITK silika jel görüntüleri, 1) kuersetin, 2-6) ekstre fraksiyonları.	27



ÖZET

Biyoaktif bitki özlerinden biri olan ve yurt dışından ithal edilen kuersetin, elma, çilek, çay, fındık, kapari gibi bitkilerde bulunan flavonoidlerden olup önemli gıda maddelerinden biridir. Kuersetin molekülünün antioksidan, antiinflamatuvar ve antikanser gibi farmakolojik aktiviteler gösterdiği bilinmektedir. Antik zamanlardan bu yana kullanılmakta olan kapari bitkisi (*Capparis spinosa*) ılıman Akdeniz ikliminde yetişir ve ülkemizde geniş bir yayılış gösterir. Kaparinin kuersetin ve türevleri bakımından zengin olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur. Dolayısıyla, kapari bitkisi yüksek saflıkta kuersetin eldesine imkân tanımakta ve Türkiye'deki kapari üretimi göz önüne alındığında bu potansiyelin değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu projenin amacı ilk kez moleküler baskılanmış katı faz ekstraksiyonu (MISPE) ile kapari bitkisinden yüksek saflıkta kuersetin molekülü üretilmesi ve elde edilen hammaddenin ülke içinde kullanılmasını sağlamak, bu şekilde ülkemizin dışa bağımlılığını azaltmaktır.

Çalışma süresince öncelikle kuersetin ile fonksiyonel monomerler arasındaki etkileşim FTIR ve UV/Vis spektrofotometre ile incelenmiştir. Bu çalışmada sentez için en uygun monomerin 4VP ve uygun çözücünün DMSO olduğuna karar verilmiştir. Sentezlenen polimerler ile deney tasarımı çalışması yapılmış, en uygun monomer ve başlatıcı derişimleri sırasıyla % Cm = % 5,0, % Ci =% 3,0 olarak belirlenmiştir. Bu koşullarla sentezlenen polimerlerin karakterizasyonları FTIR analizleri ile yapılmıştır. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile kapari bitkisinin ekstraksiyonları gerçekleştirilmiş, en çok kuersetin elde edilen yöntemin asit hidrolizi içeren ekstraksiyon yöntemi olduğuna karar verilmiştir. Ekstrelerin içerisindeki kuersetin ve rutin varlığı İTK ve HPLC ile doğrulanmıştır. Çalışma sonucunda kuersetini tanıyan moleküler baskılanmış polimerler üretilmiş ve bu polimerlerin kapari ekstresindeki kuersetini diğer analoglarına oranla daha fazla tuttuğu sonucuna varılmıştır. Elde edilen bu polimerler kapariden kuersetin eldesinde kullanılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Moleküler baskılanmış polimer, kuersetin, kapari, katı faz ekstraksiyonu



ABSTRACT

Quercetin, that is one of the bioactive flavonoids, is found in many fruits, vegetables, leaves and grains such as caper, apple, strawberry, tea, and hazelnut. Researches show that quercetin has pharmaceutical activity like antioxidant, anti-inflammatory, anticancer actions. Caper (*Capparis spinosa*), which has been used since ancient times, is found in Mediterranean especially in Turkey. In literature, several researches concerning the plant were performed and it was reported that caper is rich in quercetin and its derivatives. Therefore, caper allows isolating quercetin with high purity. Considering abundance of caper in Turkey, quercetin should be extracted from caper plant. The main goal of the project is to isolate quercetin molecule with high purity from caper which is found in Turkey with a high abundance.

During the study, the interactions between quercetin and functional monomers were investigated by FTIR and UV / Vis spectrophotometer. In this study, it was decided that the most suitable monomer was 4VP and the appropriate solvent was DMSO for the synthesis of MIP. Experimental design studies were performed with the synthesized polymers and the optimum monomer and initiator concentrations were determined as $C_m \% = 5.0 \%$, $C_i \% = 3.0\%$, respectively. The characterization of the synthesized polymers was done by FTIR analysis. Extractions of caper plants were carried out with different extraction methods and it was decided that the method with highest quercetin amount was the method of extraction with acid hydrolysis. The presence of quercetin and rutine in the extracts were confirmed by TLC and HPLC. At the end of the study, molecularly imprinted polymers which recognize quercetin were produced and it was concluded that these polymers hold quercetin more than the other analogues in caper extract. These polymers will be used for the isolation of quercetin from the caper.

Keywords: Molecularly imprinted polymer, quercetin, caper, solid phase extraction



1.GİRİŞ

Moleküler baskılama belirli bir molekülü özel olarak tanıyan isteğe bağlı polimer tasarlanmasını sağlayan, sensör, ayırma gibi birçok uygulamada yer alan bir tekniktir. Biyoaktif bitki özlerinden biri olan ve yurt dışından ithal edilen kuersetin, elma, çilek, çay, fındık, kapari gibi bitkilerde bulunan flavonoidlerden olup önemli gıda maddelerinden biridir. Kuersetin molekülünün antioksidan, antiinflamatuvar ve antikanser gibi farmakolojik aktiviteler gösterdiği bilinmektedir. Antik zamanlardan bu yana kullanılmakta olan kapari bitkisi (*Capparis spinosa*) ılıman Akdeniz ikliminde yetişir ve ülkemizde geniş bir yayılış gösterir. Kaparinin kuersetin ve türevleri bakımından zengin olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur.

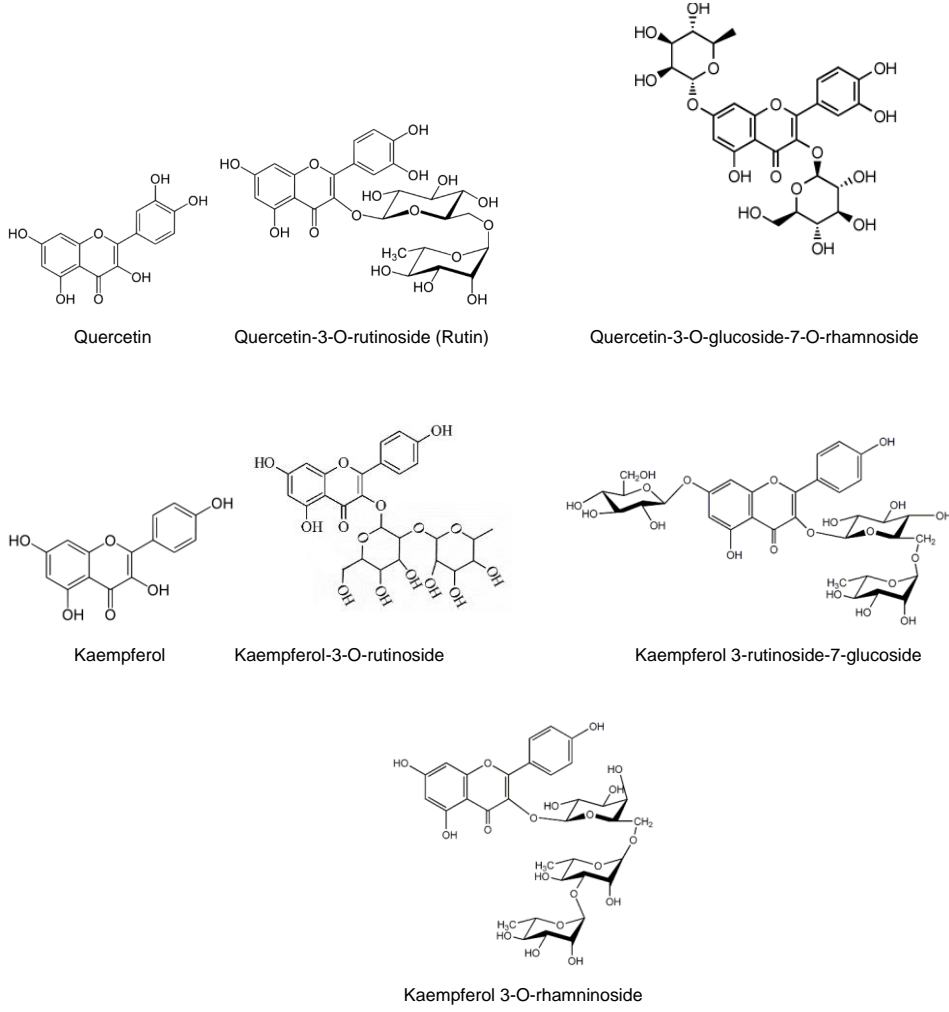
Bu projenin amacı ilk kez moleküler baskılanmış katı faz ekstraksiyonu (MISPE) ile kapari bitkisinden yüksek saflıkta kuersetin molekülü üretilmesi ve elde edilen hammaddenin ülke içinde kullanılmasını sağlamak, bu şekilde ülkemizin dışa bağımlılığını azaltmaktır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Dünya genelinde ve Türkiye’de bitkisel ürünlere olan talep her geçen gün gittikçe artmaktadır. İçerisinde bitki özleri barındıran kapsüller, ilaç, gıda, kozmetik gibi birçok alanda kullanılmaya başlanmıştır. Tüm dünyada olduğu gibi Türkiye’de de bu tip ürünlere ilgi giderek artmaktadır. Buna rağmen, hala ülkemizde endüstriyel boyutta yüksek saflıkta bitki özütü üretimi ve/veya bitki özünü içeren kapsül üretimi bulunmamaktadır. Türkiye’nin bitki örtüsü ve iklimi göz önünde bulundurulduğunda bitkisel ürünleri ithal ediyor olmamız bu projenin çıkış noktası olmuştur. Biyoaktif bitki özlerinden biri olan ve yurt dışından ithal edilen kuersetin, elma, çilek, çay, fındık, kapari gibi bitkilerde bulunan flavonoidlerden olup önemli gıda maddelerinden biridir (Kahraman vd. 2003). Kuersetin molekülünün antioksidan, antiinflamatuvar ve antikanser gibi farmakolojik aktiviteler gösterdiği bilinmektedir (Curcio vd. 2012).

Flavonoidlerin bir alt grubu flavonollerden biri olan kuersetin (Şekil 1), insan sağlığı üzerindeki etkilerinden ötürü araştırmacıların ilgisini çekmeyi başarmıştır. Biyokimyasal aktivitesi kanıtlanmış olup polifenoller içerisinde en etkili antioksidanlardan birisidir (Prior 2003, Moghaddasian vd. 2012). Antioksidanlar, hücreleri tekli oksijen (1O_2), süperoksit ($^{\cdot}O_2^-$), peroksi (ROO^{\cdot}), hidroksi ($^{\cdot}OH$) ve alkoksi (RO^{\cdot}) radikalleri gibi reaktif oksijen türlerinin yarattığı hasara karşı koruyan moleküllerdir. Antioksidan ve reaktif oksijen türü arasındaki dengenin bozulması oksidatif stresin artmasına ve dolayısıyla hücrel hasara yol açmaktadır. Oksidatif stres kanser, yaşlanma, damar tıkanıklığı, iltihap ve nörodejeneratif (Parkinson ve Alzheimer) hastalıklar gibi hastalıklarla ilişkilendirilmektedir. Literatürde, meyve ve sebzelerde bulunan flavonoidlerin oksidatif hücrel hasara engel olduğuna dair birçok çalışma mevcuttur (Formica vd. 1995). Flavonoidlerin antioksidan olarak davranma kapasiteleri moleküllerinin kimyasal yapılarına bağlıdır. Hidroksil grupların konumu serbest radikal süpürme karakterinde oldukça önemli rol oynar. Kimyasal yapısında bulundurduğu hidroksil grupların konumları sayesinde oldukça iyi antioksidan özellik göstermektedir.

Kuersetin doğadaki birçok meyve, sebze, yaprak ve tahılda bulunur. Kuersetin içeren bitkiler üzerine yapılan çalışmalar (Inocencio vd. 2000) ve ABD’de tarım araştırmaları birimi tarafından yayınlanan gıdaların flavonoid içeriği hakkındaki rapor (Bhagwat vd. 2014), 100 g yenilebilir porsiyonda en çok kuersetin miktarının kapari bitkisinde bulunduğunu göstermiştir. 100 g porsiyonda 172,55 mg kuersetin miktarına sahip olan kapari bitkisi içerdiği serbest kuersetin miktarına rağmen araştırma alanlarında hak ettiği ilgiyi görememiştir.



Şekil 1. Kaparıde bulunan kuersetin, kaempferol molekülleri ve türevleri

Antik zamanlardan bu yana kullanılmakta olan ve Kebere otugiller (*Capparaceae*) familyasının cinslerinden biri olan kaparı bitkisi (*Capparis spinosa*) ılıman Akdeniz ikliminde yetişir. Kaparı İtalya, Fas, Yunanistan, İspanya ve Türkiye gibi ülkeler tarafından yetiştirilmekte (Yaldız vd. 2012) ve ABD, İngiltere Orta Avrupa ülkelerine ihraç edilmektedir (Inocencio vd. 2000). Mevcut olan en zengin kuersetin kaynağı olarak tespit edilen kaparı bitkisinin ülkemizde geniş bir yayılış gösterdiği (Argun 2012, Ulukapı vd. 2013) bir gerçektir ve bu potansiyelin değerlendirilmesi gerekmektedir.

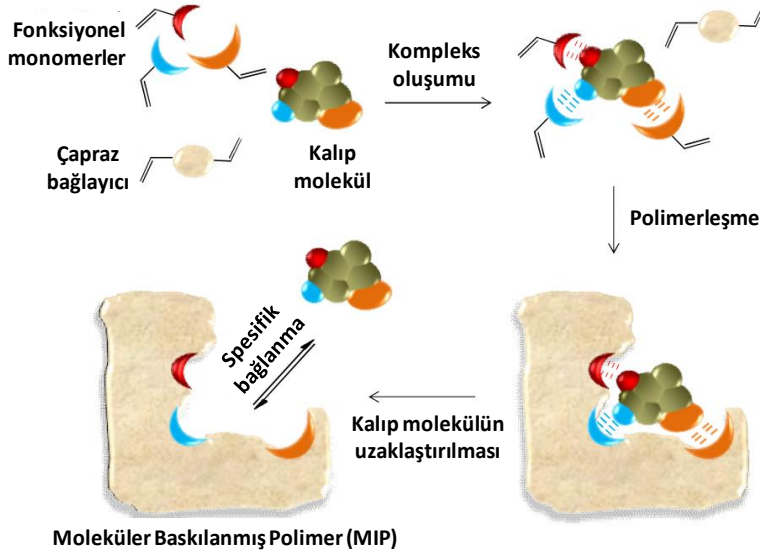
Kaparı bitkisinin iyileştirme karakteri özellikle Akdeniz çevresinde antik zamanlarda keşfedilmiştir. Antioksidan etkisi araştırılmış (Duman vd. 2013) antiromatizmal, kuvvet ilacı ve balgam söktürücü etkilerinin yanı sıra antihepatotoksik etkisi olduğu da kanıtlanmıştır (El Tanbouly vd. 1989). Yapılmış olan spektrofotometrik ve kromatografik çalışmalar kaparı bitkisinin yaprak ve tomurcuğundaki flavonoid içeriklerini ortaya çıkarmıştır (Tomás vd. 1976). Kaparı bitkisi içeriğinde kaempferol, kuersetin, kuersetin-3-O-rutinosid (rutin), kaempferol-3-O-

rutinosid, kaempferol 3-rhamnosyl-rutinoside, kuersetin 3-O-glucoside-7-O-rhamnoside, Kaempferol 3-O-rhamninoside gibi flavonoidler (Şekil 1) ile birçok uçucu bileşik barındırır (El-Ghorab vd. 2007).

Kapari bitkisinin içerisindeki flavonoidlerin nicel ve nitel analizleri ve bazı moleküllerin izolasyonuna yönelik çalışmalar olmasına rağmen (El-Ghorab vd. 2007) literatürde kapariden kuersetin izolasyonunu içeren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Kapari bitkisinin Türkiye'deki geniş yayılışı göz önünde bulundurulduğunda ve kuersetinin en yoğun bulunduğu bitkinin kapari olması dikkate alındığında kapari bitkisinden kuersetin izolasyonunun oldukça gerekli olduğu anlaşılmaktadır. Bu projede ilk kez olarak, moleküler baskılama tekniği ile kapari bitkisinden saf kuersetin eldesi gerçekleştirilmiştir.

Moleküler baskılama, hedef molekülü özel olarak tanıma özelliğine sahip, ihtiyaca göre tasarlanabilen ve sensör, ayırma, ilaç taşıma sistemi gibi birçok uygulamada kullanılabilen sentetik polimerler geliştirmek için kullanılan bir tekniktir (Haupt vd. 2000, Çakir vd. 2013). Fonksiyonel monomerler ile hedef molekül arasında oluşan etkileşimler ve bu etkileşimlerin çapraz bağlanmış polimer ile dayanıklı hale getirilmesi ilkesine dayanır. Hedef molekülün polimerden uzaklaştırılması ile polimerde özel bağlanma bölgeleri oluşur ve polimer moleküler hafızası olan bir yapı haline gelir (Şekil 2). Moleküler baskılama tekniği sayesinde belirli bir moleküle karşı yüksek seçicilik ve affinite gösteren polimerler geliştirmek mümkündür. Hedef molekül ile monomerler arasındaki etkileşim hidrojen bağ, hidrofobik ve elektrostatik gibi non-kovalent etkileşimler olabileceği gibi (Pérez-Moral vd. 2004) kovalent bağ şeklinde de olabilmektedir (Wulff 2002). Literatürdeki moleküler baskılama çalışmalarına bakıldığında non-kovalent yaklaşımın hedef molekülün uzaklaştırılmasındaki kolaylık nedeniyle daha çok tercih edildiği görülmektedir.

Bitki özütü üretim yöntemlerinden biri, son yıllarda sıkça kullanılmaya başlanan katı faz ekstraksiyonu (SPE) yöntemidir. Analitin katı faz tarafından tutulması esasına dayanmakta olan bu yöntemle elde edilen analitin saflığı katı fazın seçiciliğiyle doğru orantılıdır, dolayısıyla yüksek seçiciliğe ve affiniteye sahip moleküler baskılanmış polimerler (MIP) katı faz ekstraksiyonu yöntemini iyileştirmek için uygun adaylar olabilir (Anderson vd. 2008). Moleküler baskılanmış katı faz ekstraksiyonu (MISPE) uygulamaları mevcuttur ve sayısı gün geçtikçe artmaktadır (Song vd. 2009, Hong vd. 2013).



Şekil 2. Moleküler baskılama tekniğinin şematik gösterimi

Literatürde kuersetin molekülünün katı faz ekstraksiyonu ile saflaştırılmasına yönelik moleküler baskılama çalışmaları mevcuttur. Örneğin, 2002 yılında yapılan bir çalışmada şarap örneklerinde kuersetinin seçici olarak tanınması ve ayrılması için baskılanmış polimerler sentezlenmiştir (Weiss vd. 2001). Benzer moleküller varlığında kuersetini tanıyan moleküler baskılanmış polimerlerin, şarap örneklerinde flavonoid analizi ve izolasyonu için kullanılması planlanmıştır. Bu çalışmada fonksiyonel monomer olarak 4-vinilpiridin kullanılmıştır ancak daha sonra gerçekleştirilen kuersetin baskılanmış polimer çalışmalarında diğer fonksiyonel monomer de değerlendirilmiştir. Yan ve ark. fonksiyonel monomer olarak akrilamid kullanırken (Yan vd. 2006). He ve Deng ise metakrilik asit, akrilamid ve 2-vinilpiridin gibi farklı fonksiyonel monomerlerin MIP verimini etkilediğini raporlamışlardır (He vd. 2007). Song ve ark. ise fonksiyonel monomerin hedef moleküle oranının, farklı çözücü tiplerinin MIP verimi üzerine etkisini sistematik bir şekilde incelemiş ve cacumen platycladi (batı mazısı) örneklerinden kuersetin izolasyonunu gerçekleştirmiştir (Song vd. 2009). 2013 yılında yayınlanan bir çalışmada moleküler baskılanmış katı faz ekstraksiyonu ile Herba Lysimachiae (karga otu) bitkisinden kuersetin izole edilmiş (Hong vd. 2013), diğer bir çalışmada ise mangostan meyve kabuğundan kuersetin ve benzer moleküller ayrılmıştır (Piacham vd. 2015). Pardo 2014 yılında yaptığı çalışmada sentez koşullarının ve bağlanma çözücüsünün baskılanmış polimerin kuersetini tanıma özelliğini nasıl etkilediğini raporlamış ve soğan (*Allium cepa*) ekstresinden kuersetini seçici bir şekilde izole ederek moleküler baskılama tekniği ile bitki özlerinin saflaştırılabileceğini göstermiştir. Pakade ve ark. ise ilk kez yüksek sıcaklıkta ve sulu çözeltide çalışan baskılanmış polimer sentezlemiş ve bu polimerler kullanılarak soğandan kuersetin izolasyonunu sağlanmaya çalışılmıştır (Pakade vd. 2012). Sentezledikleri MIP soğandaki

kuersetini seçici olarak tanımış olmasına rağmen bağlanma faktörünün sulu çözeltide yeterince iyi olmadığı rapor edilmiştir.

Bu projede ilk kez moleküler baskılanmış katı faz ekstraksiyonu ile kapari bitkisinden yüksek saflıkta kuersetin molekülü üretilmesi planlanmıştır. Kapari bitkisinin içeriğine yönelik çalışmalar yapılmış olmasına rağmen, literatürde henüz yüksek saflıkta kuersetin eldesine yönelik bir çalışma bulunmamaktadır. Projenin özgünlüğü kapari bitkisinden kuersetin eldesinin ilk kez yapılmış olmasının yanı sıra, kuersetin baskılanmış polimer sentezine yönelik sistematik bir çalışma gerçekleştirilmiş olmasıdır. Doehlert Deney Tasarımı (Design of Experiments) yöntemi ile farklı polimerizasyon koşulları tasarlanmış ve bu koşulların bağlanma verimi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Deney tasarımı sonucu ortaya çıkan bilgiler ışığında kuersetine karşı en yüksek seçicilik ve affiniteye sahip baskılanmış polimerler elde edilmiş ve bu polimerler katı faz ekstraksiyonu için dolgu maddesi olarak kullanılmıştır.

Doehlert deney tasarımı, Doehlert tarafında geliştirilmiş kemometrik optimizasyon tekniklerinden biridir (Doehlert 1970). Bu tekniğin “deneme yanılma” yöntemine kıyasla en büyük avantajı önemli deneysel sonuçların elde edilmesi için çok az sayıda deneye ihtiyaç duyulmasıdır. Deney tasarımı yöntemi ile birçok parametrenin kendi aralarındaki ilişki ve bu parametrelerin sonuçlara etkisi belirlenebilmektedir. Moleküller arasındaki etkileşimlere ve bu etkileşimleri etkileyen parametrelere dayalı olan moleküler baskılama tekniği için deney tasarımı oldukça faydalı bir çalışmadır. Doehlert deney tasarımı, Dr. Pınar Çakır Hatır'ın doktora çalışmasını yaptığı grup tarafından daha önce moleküler baskılanmış polimerlere uygulanmıştır (Rossi vd. 2007). Moleküler baskılanmış polimerlerin bağlanma kapasitelerine çapraz bağlanma derecesinin etkisi incelenmiştir. Bu projede de farklı polimerizasyon koşulları tasarlanmış ve monomer ve başlatıcı derişimlerinin MIP verimine etkisi değerlendirilmiştir.

Nihai amaç, ülkemizde bolca bulunan kapari bitkisinden yüksek saflıkta kuersetin elde etmek ve elde edilen hammaddenin ülke içinde kullanılmasını sağlamak, bu şekilde ülkemizin dışa bağımlılığını azaltmaktır. Projenin devamı niteliğinde planlanan çalışma ise üretilen yüksek saflıktaki kuersetini mikrokapsüllerin içerisine hapsedmek ve gıda, kozmetik, tekstil gibi uygulamalar için kullanmak olacaktır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Gereçler

3.1.1 Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 1’de gösterilmiştir.

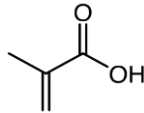
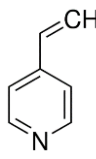
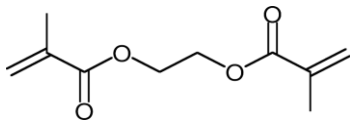
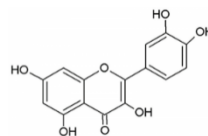
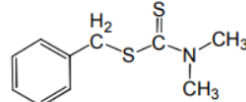
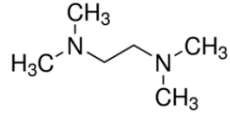
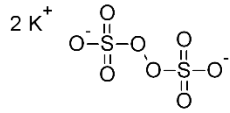
Tablo 1. Kullanılan cihazlar

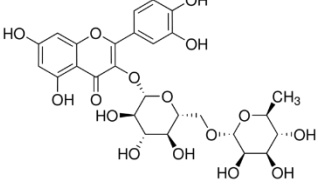
Cihaz	Marka
Mikrosantrifüj	Sigma
Vorteks	İsolab
Su Banyosu	Bandelin
Çeker ocak	GreenLab
UV/VIS Spektrofotometre	WTW
pH-metre	Hanna Instruments
Saf su distilasyon cihazı	Nüve
Vakum etüvü	MMM
Santrifüj	DLAB
Rotator	İsolab
HPLC	Shimadzu
Magnetic stirrer	Wisd
Analitik Terazî	Ohaus
pH meter	Hanna Instruments
Distilled water system	Merck
UV kabin	UVP

3.1.2 Malzemeler

Yapılan çalışmada kullanılan kimyasallar Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Kullanılan kimyasallar

Kimyasal adı	Kimyasal yapısı	İşlevi
Metakrilik asit		Fonksiyonel monomer
4-vinilpiridin		Fonksiyonel monomer
Etilen glikol dimetakrilat		Çapraz bağlayıcı
Kuersetin		Kalıp molekül
Benzil-N,N-dimetilditiokarbamat		Başlatıcı
N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamin (TEMED)		Başlatıcı
Potassium persulfate (KPS)		Başlatıcı
Asetonitril	CH ₃ CN	Çözücü
Dimetil sülfoksit	(CH ₃) ₂ SO	Çözücü
Metanol	CH ₃ OH	Çözücü

Tetrahidrofuran	C_4H_8O	Çözücü
Aseton	CH_3COCH_3	Çözücü
Su	H_2O	Çözücü
Asetik asit	CH_3CO_2H	Çözücü
Rutin		Kalıp molekül analogu

3.2 Yöntemler

3.2.1 Kuersetin ile monomer etkileşiminin UV/Vis spektroskopisi ile araştırılması

Kuersetin molekülünün ilgili fonksiyonel monomere (metakrilik asit (MAA), 4-vinilpiridin (4VP)) göre mol oranı 1:1, 1:4, 1:8, 1:12, 1:16 ve 1:20 olacak şekilde farklı ortamlarda (asetonitril, metanol, THF ve DMSO) çözeltisi hazırlanmış, 2 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra bu çözeltiler UV/Vis spektrofotometre kullanılarak analiz edilmiştir.

3.2.2 Kuersetin ile monomer etkileşiminin FTIR spektroskopisi ile araştırılması

Kuersetin molekülü ile fonksiyonel monomerler arasındaki etkileşim FTIR spektroskopisi ile de incelenmiştir. Belirli mol oranlarında karıştırılan moleküllerin ve saf hallerinin FTIR spektrumları analiz edilmiştir.

3.2.3 Deney tasarımı ile polimerizasyon koşullarının belirlenmesi

Deney tasarımı (Design of Experiments) yöntemi ile farklı polimerizasyon koşullarının belirlenmesi ve bu koşulların bağlanma verimi üzerindeki etkisinin incelenmesi planlanmıştır. 4VP ile deney tasarımı çalışması yapılmıştır. İki faktör olarak monomer ve başlatıcı derişimleri belirlenmiştir. Monomer derişimi (% Cm) alt ve üst limitleri % 0,3 ve % 20,0, başlatıcı derişim (% Cb) limitleri ise % 0,1 ile % 5,0 şeklinde hesaplanmıştır. Monomer ve başlatıcı derişimlerinin hesaplanması aşağıda gösterilmiştir.

$$\% C_m = \frac{\text{Toplam monomer ağırlığı}}{\text{Toplam ağırlık (monomer, çapraz bağlayıcı, başlatıcı, kuersetin, çözücü)}} \times 100$$

$$\% C_b = \frac{\text{Başlatıcı mol sayısı}}{\text{Monomer mol sayısı} + \text{Çapraz bağlayıcı mol sayısı} \times 2} \times 100$$

% Cm = % monomer derişimi

% Cb = % başlatıcı derişimi, polimerleşen çift bağ mol sayısı esas alınarak hesaplanmıştır. Monomerde polimerleşen bir çift bağ, çapraz bağlayıcıda ise iki çift bağ bulunmaktadır.

Belirlenen bu derişim limitleri ile deney tasarımı (Central Composite Design) yapılmış ve Tablo 3'deki polimerizasyon koşulları belirlenmiştir. Tablo 3'de verilen miktarlarda monomer ve başlatıcı kullanılarak baskılanmış ve baskılanmamış polimerler sentezlenmiştir.

Tablo 3. Deney tasarımı polimerizasyon koşulları

Std	Run	Cm %	Ini %
3	1	3,185	4,28241
1	2	3,185	0,817588
2	3	17,115	0,817588
8	4	10,15	5
11	5	10,15	2,55
9	6	10,15	2,55
4	7	17,115	4,28241
6	8	20	2,55
13	9	10,15	2,55
7	10	10,15	0,1
5	11	0,3	2,55
12	12	10,15	2,55
10	13	10,15	2,55

3.2.4 Baskılanmış polimerlerin sentezi ve karakterizasyonu

Kuersetin molekülü ile potasyum persülfat (KPS) dimetil sülfoksitte çözdürülmüş ve bu çözeltiliye çapraz bağlayıcı (Etilen glikol dimetakrilat) ve fonksiyonel monomer (4-vinil piridin) eklenmiştir. Daha sonra N,N,N',N'-Tetrametiletlen diamin eklenmiş ve çözelti içerisinde N₂ gazı geçirildikten sonra 40°C'lik fırına konulmuştur. 18 saat sonra polimerizasyona son verilmiştir. Çökelti polimerizasyonu tekniği ile sentezlenmiş polimerler santrifüj yardımıyla çöktürülmüş ve çözücünün uzaklaştırılması sağlanmıştır. Kuersetin molekülü polimerden

metanol:asetik asit (9:1, h:h) çözeltisi ile yıkanarak ayrıştırılmıştır. Yıkama işlemi santrifüj tüpü içerisinde gerçekleştirilmiştir. Polimerler tüp içine aktarılmış ve 5 kere metanol:asetik asit çözeltisi ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi UV/Vis spektrofotometre ile takip edilmiştir (Şekil 6). Her yıkamada 1 saat çözelti içerisinde karıştırılmış ve santrifüj edilmiştir. Daha sonra polimer içerisindeki asetik asitten kurtulmak için sadece metanol ile yıkama yapılmıştır. Polimerler yine aynı tüplerde metanol ile birer saat karıştırılmış, santrifüj edilmiş, taze metanol ile devam edilmiştir. Metanol ile yıkama işlemi de 4 kere tekrarlanmıştır. Son olarak sentezlenen polimerler vakum altında 40°C'de 24 saat boyunca tutularak kurutulmuştur. Baskılanmamış polimerler (NIP) kuersetin molekülü dâhil edilmeyerek aynı yöntemler ile sentezlenip hazırlanmıştır (Çakır vd. 2013). Polimerlerin karakterizasyonları FTIR spektroskopisi ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.5 Bağlanma testlerinin yapılması ve bağlanma faktörlerinin belirlenmesi

Kuersetin çözeltisi 1,0 ml'lik 50 µM derişim olacak şekilde hazırlanır. Bu çözeltilerin içerisine ayrı ayrı 5 mg baskılanmış ve baskılanmamış polimerler eklenir ve 4 saat boyunca karıştırılır. 10000 rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra üstte kalan çözelti alınır ve kuersetin derişimi UV-Vis Spektrofotometre ile ölçülür. Yüzde kuersetin bağlanması (% Bağlanma) aşağıdaki şekilde hesaplanır.

$$\% \text{Bağlanma} = \frac{C_i - C_s}{C_i} \times 100$$

C_i = Moleküler baskılanmış polimerler eklenmeden önceki kuersetin derişimi, mg/ml

C_s = Moleküler baskılanmış polimerler eklendikten sonraki kuersetin derişimi, mg/ml

Bağlanma kinetikleri çalışması ise farklı derişimlerdeki kuersetin çözeltileri ile yapılmıştır. Kuersetin çözeltileri 25, 50, 100, 500, 533 µM derişimde olacak şekilde hazırlanmış, bu çözeltilerin içerisine ayrı ayrı 5 mg baskılanmış ve baskılanmamış polimerler eklenmiş ve 4 saat boyunca karıştırılmıştır. 15000 rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra üstte kalan çözelti alınmış ve kuersetin derişimi UV-Vis spektrofotometrede ölçülmüştür. Yüzde kuersetin bağlanması (% Bağlanma) hesaplanmıştır. Q (bağlanmış kuersetin derişimi), C (bağlanmamış kuersetin derişimi) değerleri belirlenmiş, Q_{max} ve KD değerleri hesaplanmıştır. Q_{max} , polimerlere bağlanan maksimum kuersetin miktarı, KD ise ayrışma sabitidir.

3.2.6 Kapari bitkisi özütündeki moleküllerin belirlenmesi

Kapari tomurcukları tür teşhisi konusunda kesin bilgi alınamadığı için ticari olarak sağlanamamıştır. Bunun yerine çiçeklenme dönemi içerisinde 25.05.2018 tarihinde Adnan Menderes Üniversitesi merkez kampüsten toplanmış olan AYDN881 herbaryum No ile kayıtlı *Capparis spinosa* L. tomurcukları kullanılmıştır. Toplanan bitki materyali temizlendikten sonra 50°C etüvde kurutulmuş ve içerisindeki bileşikleri analiz etmek üzere ekstraksiyon işlemleri başlatılmıştır. Ekstraksiyon için üç farklı yöntem kullanılmıştır.

Ekstraksiyon yöntemi 1: Parçalanmış kapari tomurcuklarından 0,5 gr tartılarak 10 ml metanol:asetik asit: su (100:2:100, v/v/v) çözeltisinde oda sıcaklığında 1 sa. bekletilmiştir. Daha sonra 2000 rpm'de 10 dk. santrifüjlenerek üst çözelti toplanmış ve 0,22 µm filtreden süzülerek analiz yapılana kadar -20 °C'de bekletilmiştir (Moghaddasian, 2012).

Ekstraksiyon yöntemi 2: Parçalanmış kapari ve sulu metanol (%50) çözeltisi karıştırılarak 24 sa. boyunca karanlıkta bekletilmiş, sonrasında 6 sa. boyunca 80°C'de karıştırılarak kurutulmuş ve 25 ml etil asetat ile fraksiyonlandırılmıştır. Elde edilen organik faz evaporatörde uçurularak yeniden metanolde çözündürülmüştür (Pardo, 2014).

Ekstraksiyon yöntemi 3: Bu ekstraksiyon denemesi Nuutila'nın yönteminde değişiklik yapılarak gerçekleştirilmiştir (Nuutila, 2002). 5 gr öğütülmüş kapari tomurcuğu üzerine 25 ml metanol ve 10 ml 6M HCl eklendikten sonra toplam hacim distile su ile 50 ml tamamlanmış ve 2 sa. boyunca 80°C'de su banyosunda bekletilmiştir. Bu süre sonunda ekstre süzülerek 100 µl alınmış ve vakum altında kurutulmuştur. Bu örnek 1ml metanolde çözündürülerek 0,22 µm filtreden geçirilerek analiz yapılana kadar -20 °C'de bekletilmiştir.

Literatür çalışmaları kapari bitkisinin temel bileşenlerinden ikisinin rutin ve kuersetin olduğunu göstermektedir (Z.F., 2018) (Hussain, 2017). Bu sebeple kapari ekstresinin içerisindeki bileşenleri analiz edebilmek için kuersetin ve rutini ayırabilen bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir.

3.2.7 İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)

İTK analizleri silika gel 60 F254 tabakalara yüklenen ekstre ve standartların MeOH:glasiyel asetik asit:su (100:2:100, v/v), EtOAc:glasiyel asetik asit:formik asit:su (100:11:11:25, v/v), toluen:EtOAc:formik asit (5:4:0.2, v/v) karışımlarından oluşan mobil fazlar kullanılarak yapılmıştır. Silika gel tabakalar 105°C'de 10 dk. ısıtılarak aktif hale getirilmiş ve aynı zamanda 254 ve 366 nm dalga boyu ışık altında görüntülenmiştir (Hussain, 2017).

3.2.7 Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) analizi

Ekstrelerin ve standartların (kuersetin ve rutin) analizleri PDA dedektörlü bir Shimadzu Prominence UFLC (Shimadzu Scientific Instrument, USA) HPLC sisteminde gerçekleştirilmiştir. Bileşiklerin ayrımı için Phenomenex next (5 µm, 250 mm x 4.6 mm) C18 kolon ve hareketli faz olarak % 0.1'lik orto-fosforik asit/metanol (35:65, v/v) kullanılmıştır. Toplam yürütme süresi 12 dk., akış hızı 1ml/dk., enjeksiyon hacmi ise 20 µl olarak ayarlanmıştır (Sanghavi, 2014). Bileşikler 254 nm dalga boyunda analiz edilmiştir. Tüm bileşenler kullanılmadan önce 0,45 µm membrandan geçirilmiştir. Veriler LC Postrun (Shimadzu Scientific Instrument, USA) yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Ekstreler içindeki kuersetin ve rutin, standartların alıkonma zamanlarına (RT) göre belirlenmiştir.

3.2.8 Kuersetin molekülünün kolon kromatografisi ile saflaştırılması

3.2.6'da anlatılan 3. ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen ekstre silika jel (mesh 200-400) ile doldurulan kolonlara yüklendikten sonra çeşitli mobil fazlar kullanılarak kuersetin ayrıştırılmaya çalışılmıştır. Mobil faz olarak MeOH-EtOAc (20:80 -10:90), metanol, Toluen-etil asetat-formik asit (5:4:0.2, v/v) kullanılmıştır.

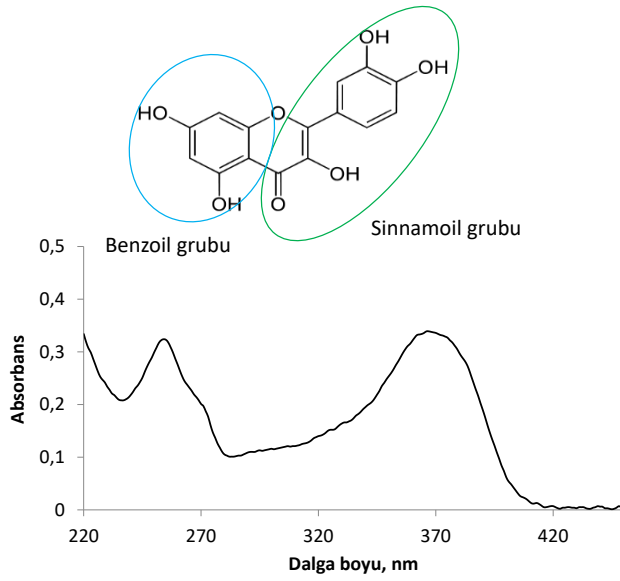
3.2.9 MISPE ile kapariden kuersetin eldesi

3.2.6'da anlatılan 3. ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen ekstre, önceden 100 mg MIP ile doldurulmuş ve metanol ile şartlandırılmış kolona yüklenmiştir. Önce metanol, ardından metanol:AA (9:1) mobil faz ile fraksiyonlara ayrılmış, bu fraksiyonların İTK ve HPLC ile analizleri yapılmıştır.

4. BULGULAR

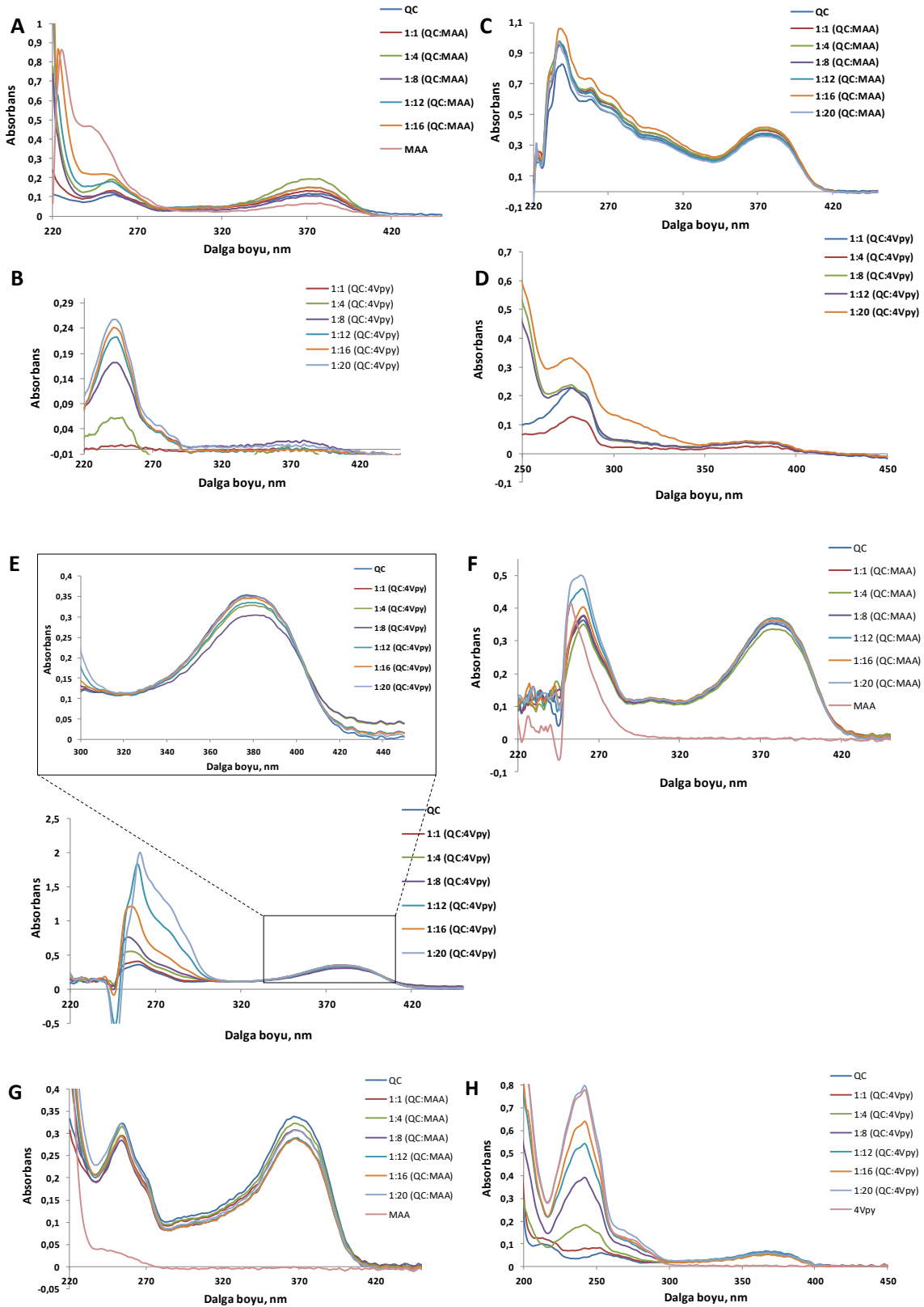
4.1 Kuersetin ile monomerlerin farklı çözücülerdeki etkileşimlerinin UV/Vis spektroskopisi ile araştırılması

Kuersetin (QC) molekülü ile ilgili fonksiyonel monomer (metakrilik asit (MAA), 4-vinilpiridin (4VP)) arasındaki etkileşim farklı ortamlarda (asetonitril (ACN), metanol (MeOH), THF ve DMSO) UV/Vis spektrofotometre kullanılarak incelenmiştir. Şekil 3'de kuersetin molekülünün kimyasal yapısı görülmektedir.



Şekil 3. Kuersetin molekülünün UV spektrumunda iki farklı dalga boyunda absorban veren grupları.

Kuersetin molekülünün maksimum absorbanları yaklaşık 250 nm (benzoil grubu) ve 370 nm (sınamoil grubu) dalga boylarında gözlenmektedir. Kuersetin molekülü ile fonksiyonel monomerlerin (Tablo 2) hidrojen bağ, elektrostatik etkileşim ve π - π etkileşimi gibi etkileşimler ile oluşturduğu kompleksler, benzoil ve sinamoil gruplarının absorbanlarındaki dalga boyu değişimleri ile incelenmiştir (Pakade vd. 2012). Şekil 4'te kuersetin molekülünün farklı monomerler ile farklı çözücülerde yapılan etkileşim çalışması spektrumları verilmiştir. UV spektrumlarına göre MAA ile kuersetin molekülü arasında farklı çözücülerde herhangi bir etkileşim tespit edilmemiştir. 4VP ile kuersetin arasında ise DMSO'da etkileşim gözlenmiştir (Şekil 4E). 4VP'den kaynaklanan 254 nm'deki maksimum absorban 4VP mol oranı arttıkça büyük dalga boyuna doğru kaymaktadır. QC:4VP 1:20 oranındaki karışımda maksimum absorban 261 nm'ye kadar kaymıştır. Benzer şekilde kuersetinin sinamoil grubunun maksimum absorbanı 377 nm'den 382 nm'ye kaymıştır. Monomer oranı arttıkça maksimum



Şekil 4. A) MeOH'da farklı oranlarda QC:MAA UV/Vis spektrumları, B) MeOH'da farklı oranlarda QC:4VP UV/Vis spektrumları, C) THF'de farklı oranlarda QC:MAA UV/Vis spektrumları, D) THF'de farklı oranlarda QC:4VP UV/Vis spektrumları, E) DMSO'da farklı oranlarda QC:4VP UV/Vis spektrumları, F) DMSO'da farklı oranlarda QC:MAA UV/Vis spektrumları, G) ACN'de farklı oranlarda QC:MAA UV/Vis spektrumları. H) ACN'de farklı oranlarda QC:4VP UV/Vis spektrumları.

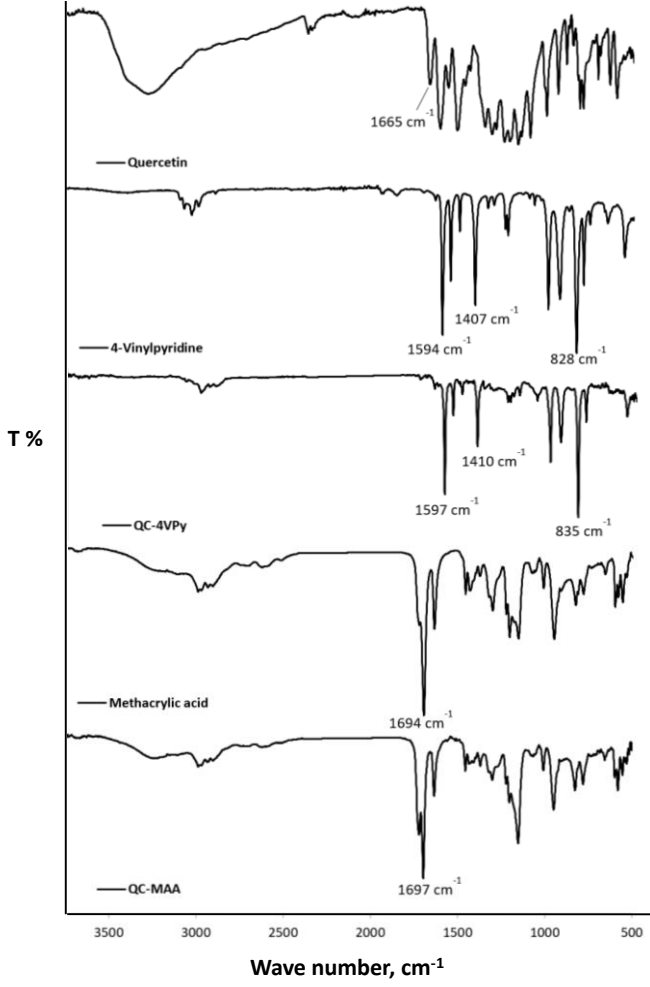
absorbansın daha uzun dalga boyuna kaydığı gözlenmiştir. Kuersetin ile monomer arasında kompleks oluştuğunda moleküllerin enerjilerinin düştüğü bu sebeple ışığın daha uzun dalga boylarını absorbe ettikleri düşünülmektedir. Kırmızıya kayma (redshift) olarak tanımlanan bu durum, kuersetin ile 4VP arasında oluşan hidrojen bağı ve π - π etkileşimlerinden kaynaklanmaktadır (Pakade vd. 2012).

Sonuç olarak, UV/Vis spektroskopi yöntemi kullanılarak kuersetin molekülünün iki farklı fonksiyonel monomer ile farklı çözücülerde (asetonitril, metanol, THF ve DMSO) oluşturduğu etkileşimler araştırılmıştır. Fonksiyonel monomer kuersetin etkileşim çalışması, kuersetin molekülünün suda çözünmemesi nedeniyle su ve sulu çözeltilerde yapılamamıştır. Organik çözücülerde gerçekleştirilen çalışmalarda ise öngörülen dalga boyu kaymasına ulaşılamamıştır. Bu bakımdan bu çözücülerin karışımları test edilmemiş, literatürde yapılan çalışmalar değerlendirilmiştir. Gerçekleştirilen bu çalışmalar ışığında 4- vinil piridin fonksiyonel monomer olarak daha uygun olacağına karar verilmiştir. UV/Vis spektroskopi analizleri ve yapılan literatür taraması (Pakade vd. 2012, López vd. 2012, Piacham vd. 2015, Pardo vd. 2014, Song vd. 2009, Weiss vd. 2001) 4-vinil piridin monomerini desteklemektedir.

4.2 Kuersetin ile monomer etkileşiminin FTIR spektroskopisi ile araştırılması

Monomer ile kalıp molekül polimerizasyon öncesi etkileşim çalışması sonucu FTIR spektroskopisi ile doğrulanmıştır. Şekil 5'de kuersetin, 4VP, MAA spektrumları ayrı ayrı ve kuersetin-4VP kompleksi, kuersetin-MAA kompleksi şeklinde verilmiştir. 4VP spektrumunda görülen üç bandın kuersetin varlığında kayması bu bantları oluşturan fonksiyonel grupların kuersetin ile etkileşime girdiğini göstermektedir. Bu kaymalar sırasıyla 1594 cm^{-1} 'den 1597 cm^{-1} 'e, 1407 cm^{-1} 'den 1410 cm^{-1} 'e, 828 cm^{-1} 'den 835 cm^{-1} 'e şeklindedir ve bu bantlar 4 vinilpiridin aromatik grubunu temsil eder. MAA spektrumunda gözlenen 1694 cm^{-1} 'deki C=O karboksil grubu bandı kuersetin varlığında 1697 cm^{-1} 'e kaymıştır. MAA'nın diğer piklerinde anlamlı bir kayma gözlenmemiştir. FTIR spektrumları kuersetinin her iki monomer ile etkileşime girdiğini göstermektedir. Ancak 4VP ile yaptığı kompleksin spektrumunda daha fazla pik kayması tespit edilmiş olduğu için 4VP ile daha kuvvetli bir etkileşime girdiği varsayılmıştır.

Monomer – kalıp molekül etkileşim çalışmaları ve literatür taraması sonucunda kuersetin baskılanmış polimer sentezinde kullanılacak fonksiyonel monomerin 4 vinil piridin olmasına karar verilmiştir.

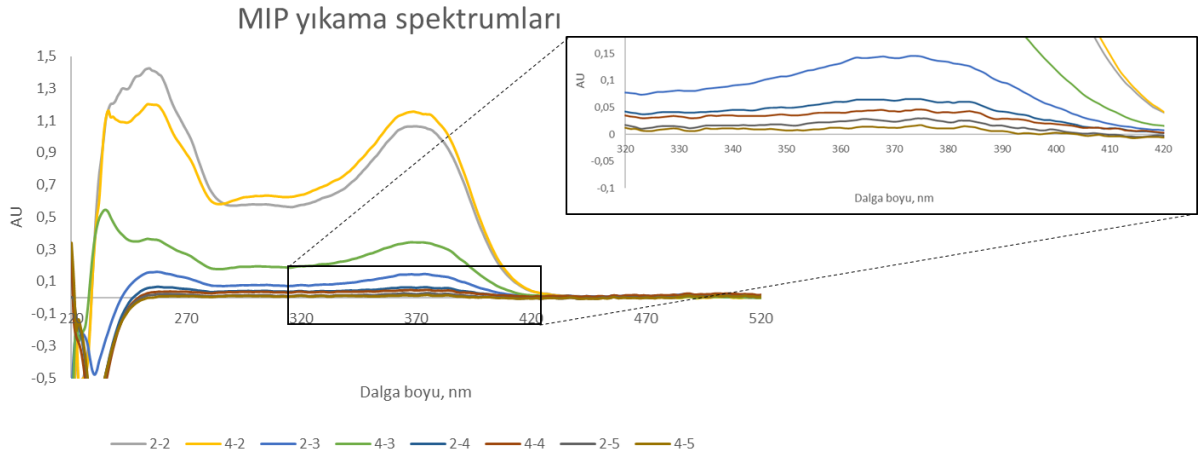


Şekil 5. Kuersetin, 4VP, kuersetin-4VP kompleksi, MAA, kuersetin-MAA komplekslerinin FTIR spektrumları.

4.3 Baskılanmış polimerlerin sentezi ve karakterizasyonu

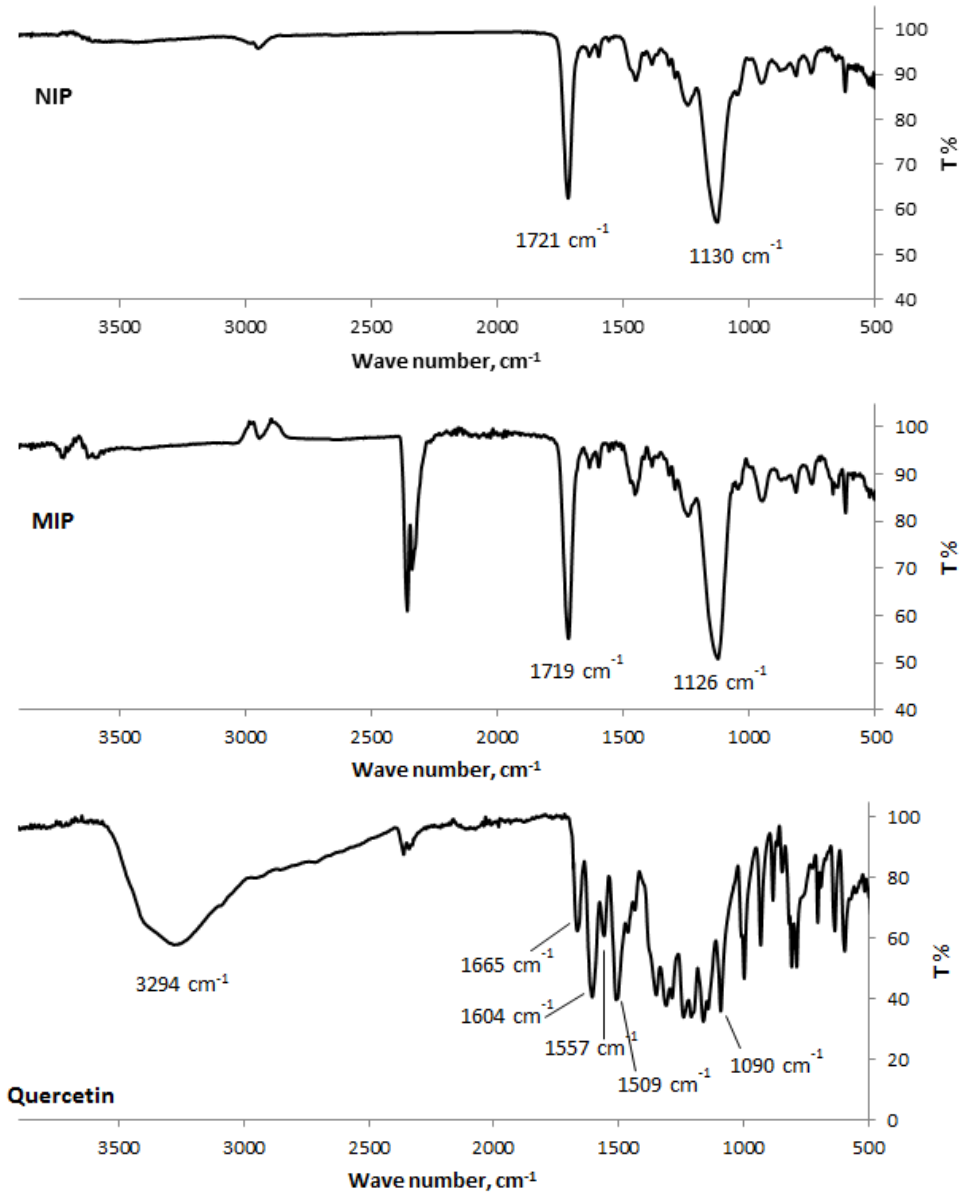
Literatür çalışmalarının çoğunda hem ısı hem de foto başlatıcı özelliği gösteren AIBN kullanılmıştır. Bu başlatıcı her ne kadar kullanışlı olsa da patlayıcı özelliğinden dolayı satışı sınırlandırılmıştır. AIBN temini mümkün olmadığı için, proje yazım aşamasında daha önce moleküler baskılanmış polimer sentezinde kullanılmış olan ve kontrollü radikal polimerizasyonuna olanak sağlayan foto başlatıcı BDC (benzil-N,N-dimetilditiokarbamat)'nin kullanılması planlanmıştır. Ancak foto başlatıcı kullanıldığında polimerizasyonun ilerlemediği gözlenmiştir. Yapılan literatür araştırmasında fotopolimerizasyon yöntemi ile polimer elde edilemediği görülmüş, yöntemin değiştirilmesi gerektiğine karar verilmiştir (López vd. 2012). Bu sebeple polimerler ısı başlatıcı kullanılarak sıcaklık aktivasyonu ile sentezlenmiştir. Başlatıcının değiştirilmesiyle polimerleşme tepkimesi başarı ile tamamlanmıştır.

Baskılanmış ve baskılanmamış polimerler sentezlendikten sonra içerisindeki kalıp molekülü çıkarmak için madde 3.2.4'te anlatıldığı gibi yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Santrifüjde üstte kalan çözelti UV/Vis spektrofotometre ile analiz edilmiş ve çözeltide kuersetin kalmadığından emin olana kadar yıkama yapılmıştır. Şekil 6'da gösterildiği gibi yıkama çözeltilerinin 370 nm'deki maksimum absorpsiyon değerleri ölçülmüştür. 370 nm'de bir absorpsiyon değeri kalmayana kadar yıkamaya devam edilmiştir. 5. yıkama sonrasında yıkama çözeltisindeki kuersetin miktarı yok denecek kadar azalmıştır. Daha sonra polimer içerisindeki asetik asitten kurtulmak için sadece metanol ile yıkama yapılmıştır. Polimerler yine aynı tüplerde metanol ile birer saat karıştırılmış, santrifüj edilmiş, taze metanol ile devam edilmiştir. Metanol ile yıkama işlemi de 4 kere tekrarlanmıştır. Son olarak, sentezlenen polimerler vakum altında 40°C'de 24 saat boyunca tutularak kurutulmuştur.



Şekil 6. MIP yıkama çözeltilerinin UV/Vis spektrumları

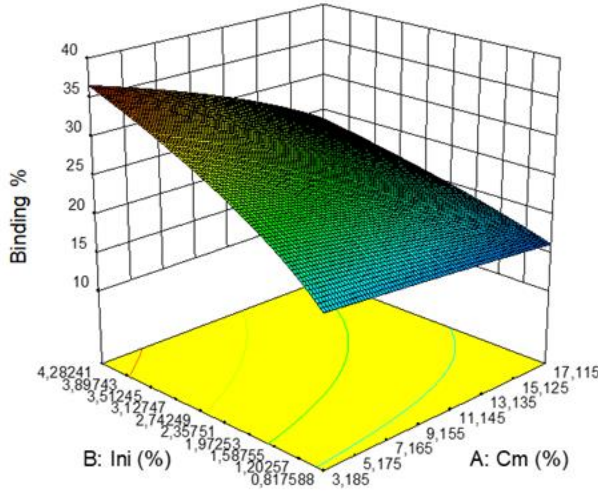
Sentezlenen moleküler baskılanmış polimerlerin FTIR Spektroskopi analizleri yapılmıştır. FTIR analizleri doğrultusunda polimerlerin (NIP, MIP) ve kuersetinin fonksiyonel grupları belirlenmiştir (Şekil 7). Kuersetin spektrumunda 3294 cm^{-1} 'de OH gerilme titreşimi, 1665 cm^{-1} 'de C=O gerilmesi, 1604 cm^{-1} , 1557 cm^{-1} , 1509 cm^{-1} 'de aromatik bölge, 1090 cm^{-1} 'de ise C-OH gerilmesi görülmektedir. Baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış polimer (NIP) spektrumlarında ise 1720 cm^{-1} civarında C=O gerilmesi, 1130 cm^{-1} 'de ise C-O titreşimi görülmektedir. Ayrıca, NIP ve MIP spektrumlarının tamamen aynı bantlara sahip olduğu ve spektrumlarında kuersetin bantlarının bulunmadığı tespit edilmiş olup kuersetin molekülünün başarılı bir şekilde polimerden uzaklaştırıldığı sonucuna varılmıştır.



Şekil 7. NIP, MIP ve kuersetinin FTIR spektrumları

4.4 Deney tasarımı analizi için bağlanma testlerinin yapılması ve bağlanma faktörlerinin belirlenmesi

Bağlanma testleri sonucunda elde edilen % bağlanma değerleri deney tasarımı tablosuna girilmiştir. Deney tasarımına girilmesi planlanan bağlanma faktörü değerleri çok düşük çıkmıştır. Bu sebeple değerlendirme % bağlanma değeri üzerinden yapılmıştır. Farklı koşullar ile sentezlenmiş moleküler baskılanmış polimerlerin % bağlanma değerlerine göre elde edilen tepki yüzeyi grafiği Şekil 8'de verilmiştir.



Şekil 8. Monomer ve başlatıcı derişimleri ile % bağlanma miktarı arasındaki tepki yüzeyi grafiği.

Şekil 8 incelendiğinde, en yüksek % bağlanma değerinin yüksek başlatıcı derişimi ve düşük monomer derişimi ile sentezlenen polimerlerde elde edildiği gözlenmektedir. Diğer bir deyişle, % bağlanma değeri başlatıcı derişimiyle doğru, monomer derişimiyle ters orantılıdır. Gerçekleştirilen bu deney tasarımı çalışmasının bir sonraki adımı, optimizasyon çalışmaları yaparak en uygun polimerizasyon koşulunun belirlenmesi olacaktır. Bu amaçla tepki yüzeyi grafiğinden elde edilen formül ($\% \text{Bağlanma} = -264,97355 + 66,71469 \cdot \text{Cm} + 3191,55714 \cdot \text{Ini} - 145,41962 \cdot \text{Cm} \cdot \text{Ini}$) incelenmiştir. Formüle göre monomer derişiminin katsayısı başlatıcı derişiminin katsayısına oranla çok küçüktür. Hem formül hem de tepki yüzeyi grafiğinden çıkan sonuç monomerin bağlanma değeri üzerinde çok anlamlı bir etkisinin olmadığıdır. Diğer yandan başlatıcı oranı oldukça etkilidir. Başlatıcı derişimi arttıkça polimerlerin bağlanma oranları da artmaktadır. Bu durumda optimum moleküler baskılanmış polimeri elde etmek için monomer derişimi çok yükseltilmeden başlatıcı derişimi artırılmalıdır.

Literatür araştırması, deney tasarımı analizi ve bağlanma testi sonuçları değerlendirildiğinde polimerizasyon koşullarının aşağıdaki gibi olmasına karar verilmiştir:

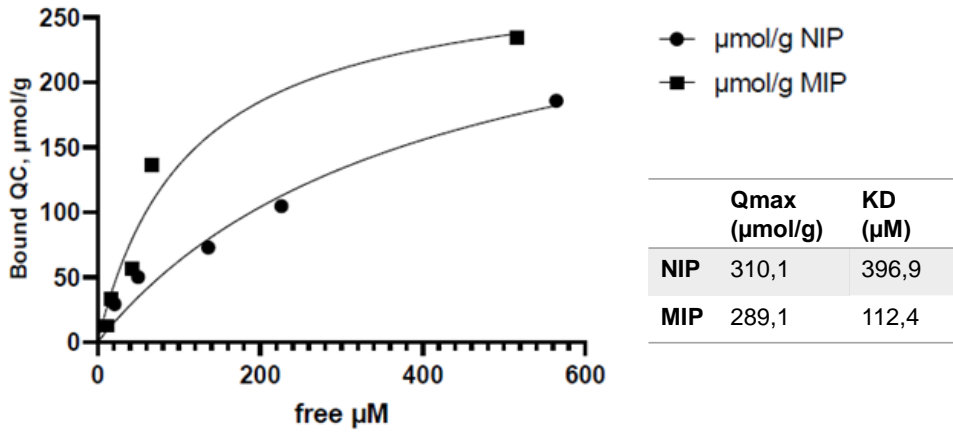
Kuersetin:monomer:fonksiyonel monomer (1:16:25), %Ci =% 3,0, %Cm = % 5,0

NIP ve MIP için elde edilen verimler sırasıyla % 93,7 ve % 97,2 olarak hesaplanmış olup, polimerizasyonun oldukça yüksek bir verimle gerçekleştiği gözlenmiştir.

4.5 Bağlanma kinetiklerinin belirlenmesi

Qmax ve KD değerleri hesaplanması için bağlanma testi 3.2.5'te anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiş ve bağlanma sonuçları GraphPad Prism8 yazılım programı ile analiz

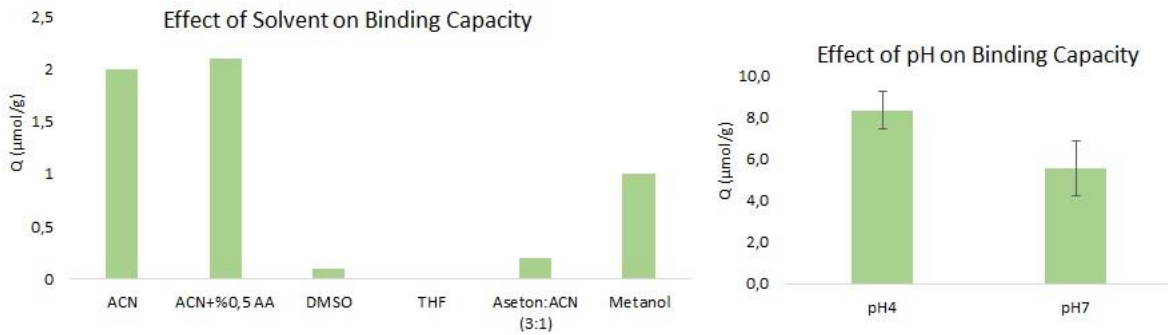
edilmiştir. Şekil 9'da görüldüğü gibi MIP ve NIP için adsorpsiyon izotermi çizilmiştir. GraphPad Prism8 programı ile elde edilen sonuçlara göre Q_{max} değeri NIP için $310,1 \mu\text{mol/g}$, MIP için $289,1 \mu\text{mol/g}$ olarak hesaplanmış olup NIP'in bağlanma kapasitesinin MIP'e göre biraz daha fazla olduğu gözlenmiştir. KD değerleri ise NIP için $396,9 \mu\text{M}$, MIP için ise $112,4 \mu\text{M}$ olarak hesaplanmıştır. Ayırma sabitleri karşılaştırıldığında MIP'in kuersetin molekülüne NIP'e kıyasla anlamlı olarak daha fazla bağlanma isteği duyduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 9. MIP ve NIP'in adsorpsiyon izotermi ve Q_{max} , KD değerleri

4.6 Farklı çözücülerde bağlanma çalışmalarının yapılması

Şekil 10'da aynı polimer ile farklı ortamlarda gerçekleştirilen bağlanma testleri gösterilmektedir. Çözücüler içerisinde kuersetinin polimer tarafında tanınmasını sağlayan en uygun çözücünün asetonitril olduğu görülmektedir. DMSO ve metanoldeki bağlanma yüzdeleri oldukça düşüktür. THF'de ise hiç bağlanma görülmemektedir.



Şekil 10. Farklı çözücülerin bağlanma kapasitesine etkisi.

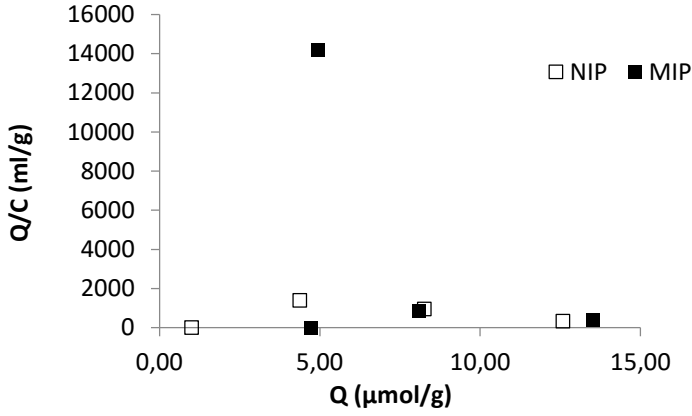
Moleküler baskılanmış polimerler ile kuersetin arasındaki etkileşim pH değişimi ile değişebilmektedir. Baskılanmış polimerler kuersetin molekülüne farklı pH değerlerinde farklı istek (affinity) gösterebilirler. Nötr ve asidik olmak üzere iki farklı pH değerine sahip tampon çözelti hazırlanmış, bu çözeltilerde baskılanmış polimerlerin kuersetin molekülünü tanıma özellikleri araştırılmıştır. Çalışmada bazik pH kullanılmamıştır, çünkü bazik ortamda kuersetin molekülün çok hızlı bir şekilde parçalandığı bilinmektedir (Zenkevich, 2007).

Farklı pH çalışması için pH 4 ve pH 7 çözeltileri kullanılmıştır. 5 mg baskılanmış polimer ile 50 μ M kuersetin içeren farklı pH değerlerine sahip 1 ml çözücüde bağlanma testi gerçekleştirilmiştir. Şekil 10'da moleküler baskılanmış polimerlerin farklı iki pH değerinde kuersetini tanıma değerleri verilmiştir. Grafikte gösterildiği gibi asidik ortamda bağlanma kapasitesi 8,2 μ mol/g iken, nötr ortamda 5,8 μ mol/g olarak hesaplanmıştır. Asidik ortamda bağlanma kapasitesinin daha fazla olmasının sebebi, kuersetinin protonlanmış olarak kalması ve polimer ile arasındaki hidrojen bağlarını muhafaza ediyor olması olarak düşünülmektedir (Pakade, 2016). Bağlanma kapasitesinin farklı pH'lardaki davranışını görmek adına pH çalışması genişletilmiş, pH 2, pH 3, pH 5, pH 6 çözeltileri hazırlanmıştır. Ancak, bütün bu tampon çözeltilerde kuersetin molekülünün bir süre sonra çöktüğü gözlemlenmiş ve çalışmaya devam edilememiştir.

4.7 Seçicilik çalışması

Moleküler baskılanmış polimerlerin seçici olup olmadığı, kaparıdeki iki majör bileşenden biri olan ve kimyasal yapısı kuersetine benzeyen rutin ile test edilmiştir. Rutin çözeltileri 25, 50, 100 μ M derişimlerde olacak şekilde hazırlanmış, bu çözeltilerin içerisine ayrı ayrı 5 mg baskılanmış ve baskılanmamış polimerler eklenmiş ve 4 saat boyunca karıştırılmıştır. 15000 rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra üstte kalan çözelti alınmış ve kuersetin derişimi UV-Vis Spektrofotometre ile ölçülmüştür. Yüzde kuersetin bağlanması (% Bağlanma) hesaplanmıştır. Q (bağlanmış kuersetin derişimi), C (bağlanmamış kuersetin derişimi) değerleri belirlenmiş, NIP ve MIP için Scatchard grafikleri çizilmiştir (Şekil 11).

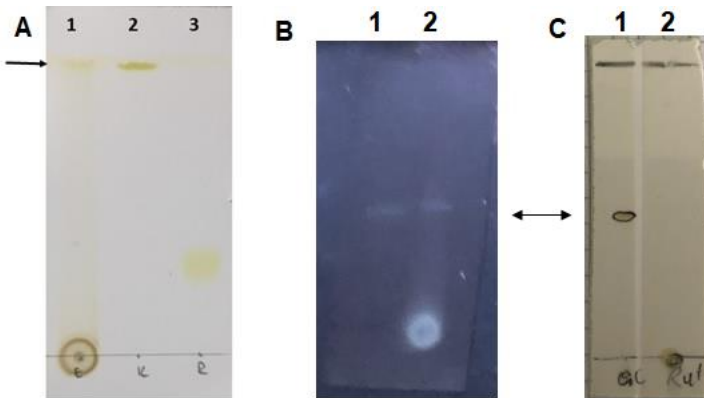
Şekil 11'de NIP ve MIP için Scatchard grafiği çizilmiştir. Grafikte görüldüğü üzere rutin molekülü NIP ve MIP'e bağlanma göstermektedir, ancak bir doğrusallık söz konusu olmadığı için spesifik bağlanma olmadığı düşünülmektedir.



Şekil 11. Rutin ile elde edilen Scatchard grafiği

4.8 Kapari bitkisi özütündeki moleküllerin belirlenmesi

Daha önceki çalışmalarda yapılan İTK analizlerinde ekstrede gözlenen bandın Rf değeri 0,96, kuersetin ve rutin standartlarının Rf değerleri ise sırasıyla 0,96 ve 0,17 olarak belirlenmiştir. Ekstraksiyon yöntemi 3 ile elde edilen kapari ekstresinin İTK analizi sonucunda kuersetin varlığı gözlenirken (Şekil 12A, ok ile gösterilmiştir) rutine rastlanmamıştır. Bu çalışmadan sonra ekstraksiyon koşulları ve İTK mobil fazları optimize edilmiş ve analiz tekrarlanmıştır. Mobil faz Toluen:EtOAc:Formik asit (5:4:0,2) oranlarında hazırlanmış, bu mobil faz ile elde edilen kuersetinin Rf değeri (yaklaşık 0,5) daha anlamlı bulunmuştur. Şekil 12B'de görüldüğü üzere ekstre içerisinde kuersetin bulunmaktadır ve hareket etmeyen polar grubun ise rutin olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 12C). Elde edilen bu sonuçlar HPLC ile de doğrulanmıştır (Şekil 12.).



Şekil 12. Farklı mobil fazlar sonucunda elde edilen İTK silika jel görüntüleri. A)

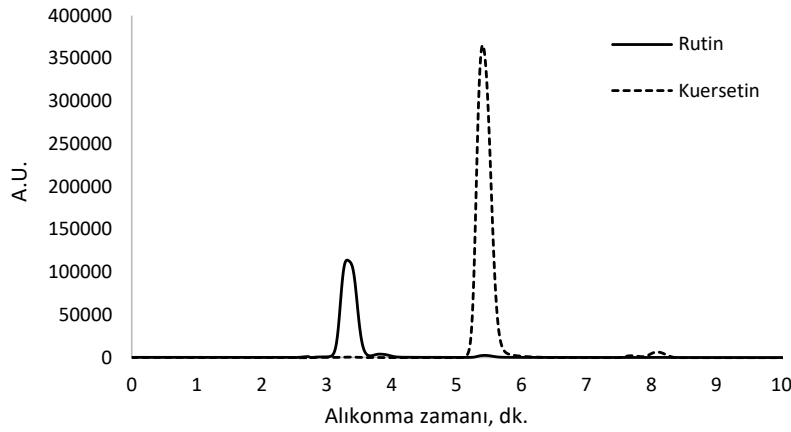
EtOAc:Glasiyel Asetik Asit:Formik Asit:Su (100:11:11:25, v/v), 1: *C. spinosa* L. ekstresi, 2:

Kuersetin, 3: Rutin B) Toluen:EtOAc:Formik asit (5:4:0,2), 1: Kuersetin, 2: *C. spinosa* L.

ekstresi C) Toluen:EtOAc:Formik asit (5:4:0,2), 1: Kuersetin, 2: Rutin

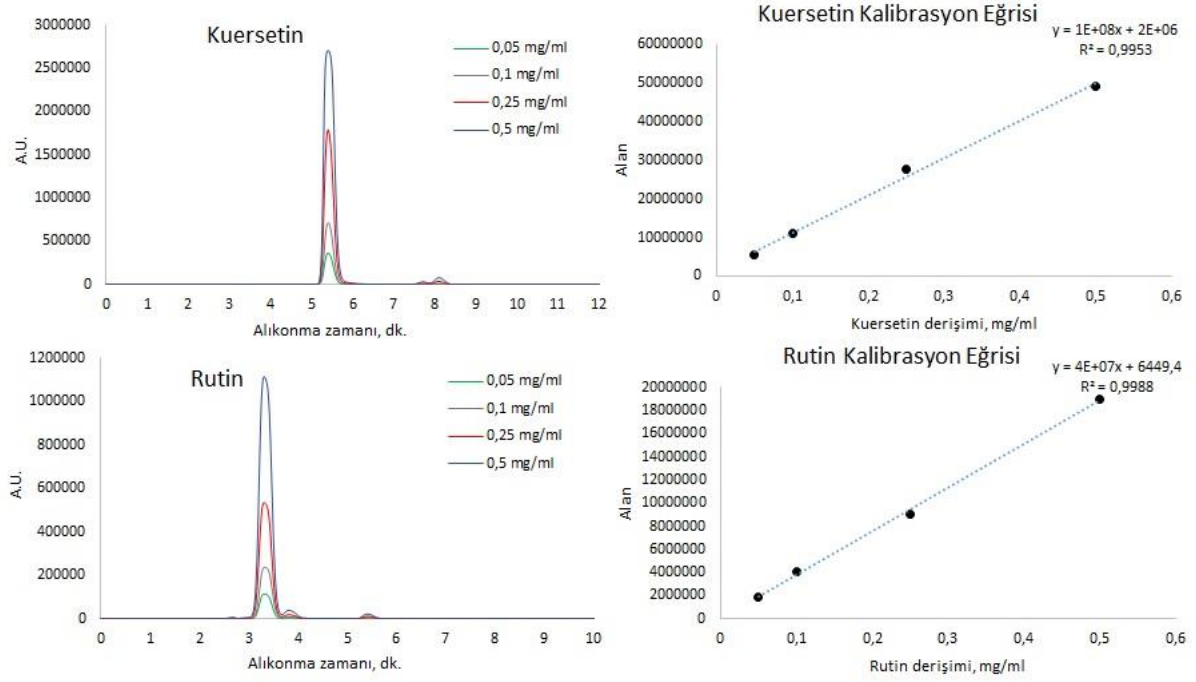
4.9 HPLC Metot Geliştirme

Proje süresince kullanılan kolonda değişiklik yapılmıştır. Bu sebeple 2. PGR’de sunulan HPLC metodunun tekrar valide edilmesi gerekmiştir. İlk kolonla yapılan çalışmalarda kuersetinin alıkonma zamanı 6,9 dk., rutin alıkonma zamanı ise 4,0 dk. olarak belirlenmiştir. Yeni kolon ile (Phenomenex next, 5 µm, 250 mm x 4.6 mm, C18 kolon) yapılan çalışmalardan elde edilen standart kromatogramları Şekil 13’de görülmektedir. Bu kromatogramlara göre alıkonma zamanları rutin için 3.3 dk., kuersetin için ise 5.4 dk. olarak belirlenmiştir. İki yöntemde de alıkonma zamanları oranı aynıdır (rutin/kuersetin = 0,6). Rutin ve kuersetin piklerinin farklı alıkonma zamanlarına sahip olmaları, aynı numunede iki molekülün analizine olanak sağladığı için HPLC yönteminin başarılı bir şekilde geliştirildiğini göstermektedir.



Şekil 13. Rutin ve kuersetin kromatogramları.

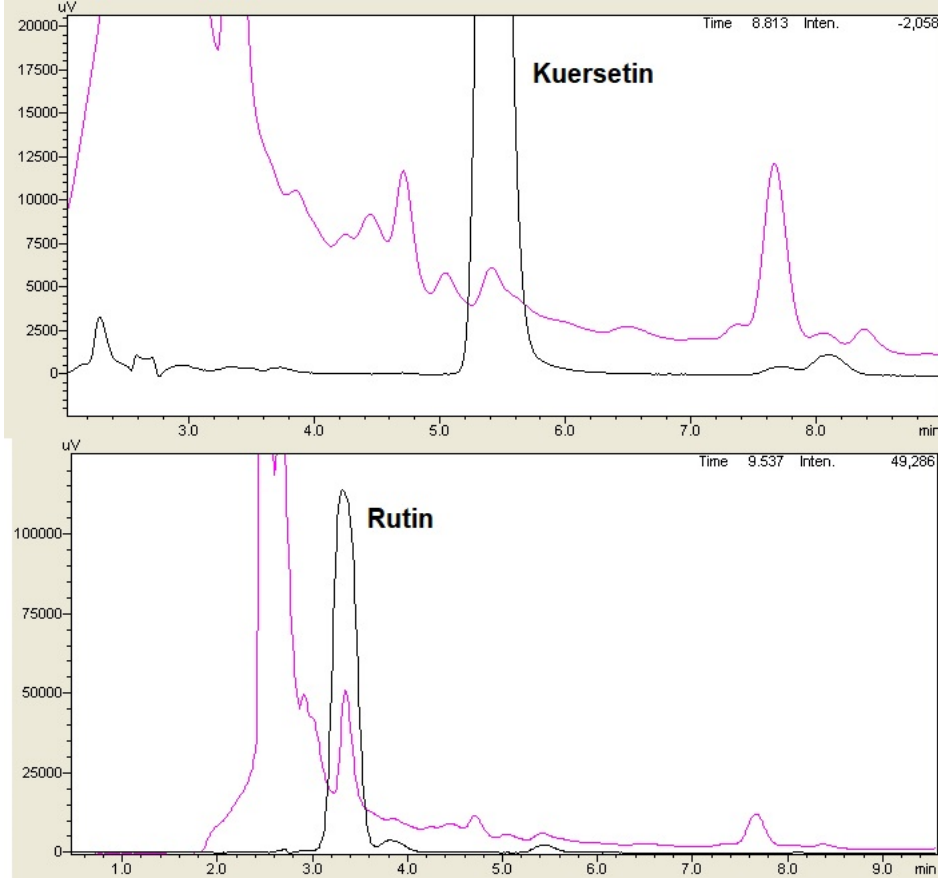
Rutin ve kuersetin için geliştirilen yöntem ile farklı derişimlerde standart çözeltiler hazırlanmış ve kalibrasyon eğrileri çizilmiştir. Kalibrasyon eğrilerinden elde edilen R^2 değerleri sırasıyla kuersetin için 0,9953, rutin için 0,9988 olarak bulunmuş olup, HPLC yönteminin doğrusallığı kanıtlanmıştır.



Şekil 14. Farklı derişimlerdeki kuersetin ve rutin kromatogramları ve kalibrasyon eğrileri.

4.10 Bitki özütünün HPLC ile analizi

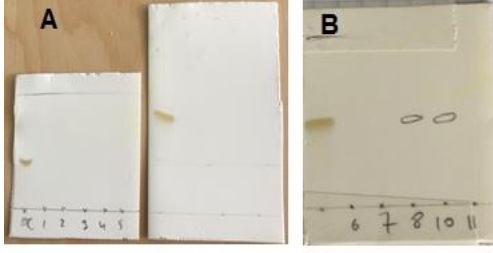
Literatür çalışmalarında *C. spinosa* L.'nin majör flavonoidlerinin rutin ve kuersetin olduğu (Patel, 2014) ancak kuersetinin bitkilerde serbest form dışında glikozit formunda da biriktirildiği ve bu formların en genelinin rutin olduğu bildirilmiştir (Hollman, 2000) (Biesaga, 2009) (Dmitrienko S. G., 2012). Yine asit hidrolizi sonucunda bitki ekstralarında kuersetin konsantrasyonunun 2-50 kat arttığı da literatür bilgilerinde yer almaktadır (Dmitrienko S. G., 2012) (Wach A, 2007). Bu doğrultuda asit hidrolizi içeren 3.yöntem ile yapılan ekstraksiyon sonucunda kuersetin miktarının artmış olması literatür sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Şekil 15'de görüldüğü gibi ekstre içerisinde hem kuersetin hem de rutin tespit edilmiştir.



Şekil 15. Ekstre kromatogramları (pembe çizgi) ve rutin/kuersetin kromatogramları (siyah çizgi).

4.11 Kuersetin molekülünün kolon kromatografisi ile saflaştırılması

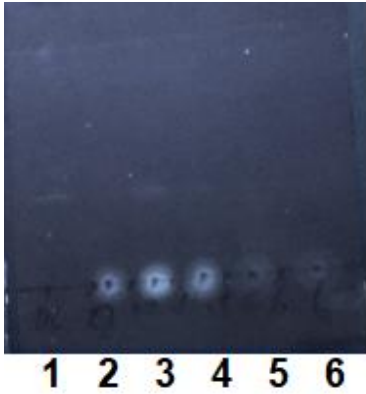
3.2.6'da anlatılan 3. ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen ekstre silika jel (mesh 200-400) ile doldurulan kolonlara yüklendikten sonra çeşitli mobil fazlar kullanılarak kuersetin ayrıştırılmaya çalışılmıştır. Mobil faz olarak MeOH-EtOAc (20:80 -10:90) gradient olarak uygulandığında 33 fraksiyon, metanol kullanıldığında 7 fraksiyon elde edilmiş ancak kuersetin ayrıştırılamamıştır (Şekil 16A). Toluen-etil asetat-formik asit (5:4:0.2, v/v) 'den oluşan mobil faz kullanıldığında ise 12 fraksiyon elde edilmiş bunlar içinden 8-10 fraksiyonlarda çok net olmayan bantlar gözlenmiştir (Şekil 16B). Bu fraksiyonlara HPLC analizi yapıldığında ise çok az miktarda kuersetin tespit edilmiştir.



Şekil 16. A) MeOH-EtOAc (20:80 -10:90) ve metanol sonrası elde edilen fraksiyonlar, B) Toluen-etil asetat-formik asit (5:4:0.2, v/v) ile elde edilen fraksiyon bantları.

4.12 MISPE ile kapariden kuersetin eldesi

3.2.6'da anlatılan 3. ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen ekstre, önceden 100 mg MIP ile doldurulmuş ve metanol ile şartlandırılmış kolona yüklenmiştir. Önce metanol, ardından metanol:AA (9:1) mobil faz ile fraksiyonlara ayrılmış, bu fraksiyonların ITK ve HPLC ile analizleri yapılmıştır. Şekil 17'de görüldüğü gibi 2. fraksiyonda kuersetin bandı mevcut olmamakla beraber 3'ten sonra görülmeye başlamaktadır ve 6. fraksiyonda çok hafif olarak görülmektedir. Daha polar olan rutin grubu moleküller 2. fraksiyonda kolondan çıkmış olmasına rağmen kuersetin MIP'e bağlanıp daha geç çıkmaya başlamış ve çıkışı yine diğer moleküllere göre daha uzun sürmüştür. Kolondan çıkan fraksiyonlar HPLC ile analiz edilmiş, her bir fraksiyondaki kuersetin alanı incelenmiştir. 2. Fraksiyondaki kuersetin piki alanının 3. fraksiyondaki kuersetin piki alanına oranı %68,7 olarak bulunmuş olup, aynı işlem NIP ile tekrarlandığında bu oran %92,5 olarak hesaplanmıştır. NIP'teki oranın MIP'e göre daha yüksek olması kuersetinin MIP'e kıyasla daha az tutulduğunun kanıtı olarak düşünülmektedir.



Şekil 17. MISPE fraksiyonlarının ITK silika jel görüntüleri, 1) kuersetin, 2-6) ekstre fraksiyonları.



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmanın amacı moleküler baskılanmış katı faz ekstraksiyonu (MISPE) ile kapari bitkisinden yüksek saflıkta kuersetin molekülü üretilmesi ve elde edilen hammaddenin ülke içinde kullanılmasını sağlamak, bu şekilde ülkemizin dışa bağımlılığını azaltmaktır. Proje süresince kuersetin ile fonksiyonel monomerler arasındaki etkileşim FTIR ve UV/Vis spektrofotometre ile incelenmiştir. Bu çalışmada sentez için en uygun monomerin 4VP ve uygun çözücünün DMSO olduğuna karar verilmiştir. Sentezlenen polimerler ile deney tasarımı çalışması yapılmış, en uygun monomer ve başlatıcı derişimleri sırasıyla % Cm = % 5,0, % Ci =% 3,0 olarak belirlenmiştir. Bu koşullarla sentezlenen polimerlerin karakterizasyonları FTIR analizleri ile yapılmıştır. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile kapari bitkisinin ekstraksiyonları gerçekleştirilmiş, en çok kuersetin elde edilen yöntemin asit hidrolizi içeren ekstraksiyon yöntemi olduğuna karar verilmiştir. Ekstrelerin içerisindeki kuersetin ve rutin varlığı İTK ve HPLC ile doğrulanmıştır. Çalışma sonucunda kuersetini tanıyan moleküler baskılanmış polimerler üretilmiş ve bu polimerlerin kapari ekstresindeki kuersetini diğer analoglarına oranla daha fazla tuttuğu sonucuna varılmıştır. Elde edilen bu polimerlerin kapariden kuersetin eldesinde kullanılması planlanmaktadır.



6. KAYNAKLAR

Anderson, R. A., et al. 2008. "Comparison of molecularly imprinted solid-phase extraction (MISPE) with classical solid-phase extraction (SPE) for the detection of benzodiazepines in post-mortem hair samples." *Forensic science international* 174(1): 40-46.

Argun, M. E. (2012). Kapari (*Capparis ovata* Desf. var. *Canescens*) çiçek tomurcuklarının fermantasyonu üzerine bazı baharat uçucu yağ ve ekstraktlarının etkisi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Bhagwat, S., et al. 2014. "USDA database for the flavonoid content of selected foods, Release 3.1." Beltsville: US Department of Agriculture: 03-01.

Curcio, M., et al. 2012. "Quercetin-imprinted nanospheres as novel drug delivery devices." *Journal of functional biomaterials* 3(2): 269-282.

Çakir, P., et al. 2013. "Protein-Size Molecularly Imprinted Polymer Nanogels as Synthetic Antibodies, by Localized Polymerization with Multi-initiators." *Advanced Materials* 25(7): 1048-1051.

Doehlert, D. H. 1970. "Uniform shell designs." *Applied statistics*: 231-239.

Duman, H., et al. 2013. "The antioxidant effects of *Capparis Ovata* and deferasirox in patients with thalassemia major." *J Blood Disorders Transf* 4(142): 2.

El-Ghorab, A., et al. 2007. "Chemical composition and antioxidant activities of buds and leaves of capers (*Capparis ovata* Desf. var. *canescens*) cultivated in Turkey." *Journal of Essential Oil Research* 19(1): 72-77.

El Tanbouly, N., et al. 1989. "Antihepatotoxic effect of aqueous extracts from *Capparis spinosa*."

Formica, J. and W. Regelson 1995. "Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids." *Food and chemical toxicology* 33(12): 1061-1080.

Haupt, K. and K. Mosbach 2000. "Molecularly imprinted polymers and their use in biomimetic sensors." *Chemical reviews* 100(7): 2495.

He, J. and Q. Deng 2007. "[Monomers optimization and properties evaluation of quercetin-imprinted polymer and its application to thin layer chromatography stationary phase]." *Zhong yao cai= Zhongyao cai= Journal of Chinese medicinal materials* 30(5): 588-591.

Hong, Y. and L. Chen 2013. "Extraction of quercetin from *Herba Lysimachiae* by molecularly imprinted-matrix solid phase dispersion." *Journal of Chromatography B* 941: 38-44.

Inocencio, C., et al. 2000. "Flavonoid content of commercial capers (*Capparis spinosa*, *C. sicula* and *C. orientalis*) produced in Mediterranean countries." *European Food Research and Technology* 212(1): 70-74.

Kahraman, A., et al. 2003. "The antioxidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesions." *Toxicology* 183(1): 133-142.



Moghaddasian, B., et al. 2012. "Quantitative analysis of quercetin in different parts of Capparis spinosa by HPLC." *Ann Biol Res* 3(12): 5775-5778.

Pakade, V., et al. 2012. "Molecularly imprinted polymers targeting quercetin in high-temperature aqueous solutions." *Journal of Chromatography A* 1230: 15-23.

Pérez-Moral, N. and A. G. Mayes 2004. "Noncovalent Imprinting in the Shell of Core-Shell Nanoparticles." *Langmuir* 20(9): 3775-3779.

Piacham, T., et al. 2015. "Quercetin-imprinted polymer for anthocyanin extraction from mangosteen pericarp." *Materials Science and Engineering: C* 51: 127-131.

Prior, R. L. 2003. "Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage." *The American journal of clinical nutrition* 78(3): 570S-578S.

Rossi, C. and K. Haupt 2007. "Application of the Doehlert experimental design to molecularly imprinted polymers: surface response optimization of specific template recognition as a function of the type and degree of cross-linking." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389(2): 455-460.

Song, X., et al. 2009. "Quercetin molecularly imprinted polymers: Preparation, recognition characteristics and properties as sorbent for solid-phase extraction." *Talanta* 80(2): 694-702.

Tomás, F. and F. Ferreres 1976. "Contribucion al estudio de la dotacion flavonoidea en Capparis spinosa [alcaparra, analisis de alimentos]." *Revista de Agroquimica y Tecnologia de Alimentos*.

Ulukapı, K. and S. Atmaca 2013. "TÜRKİYE'DE DOĞAL OLARAK YETİŞEN Capparis spinosa L.'nin In Vitro ve In Vivo KOŞULLARDA ÇİMLENDİRİLME OLANAKLARI." *Derim* 30(2): 62-70.

Weiss, R., et al. 2001. "Molecular imprinting and solid phase extraction of flavonoid compounds." *Bioseparation* 10(6): 379-387.

Wulff, G. 2002. "Enzyme-like catalysis by molecularly imprinted polymers." *Chemical reviews* 102(1): 1-28.

Yaldız, G. and N. Şekeroğlu 2012. "Küresel İklim Değişikliğinde Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Önemi."

Yan, L.-s., et al. 2006. "Preparation of quercetin-imprinted polymer and its property as a sorbent for solid phase extraction." *Chinese Journal of Analysis Laboratory* 25(5): 97.

**TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

Proje Yürütücüsü:	Dr. Öğr. Üyesi PINAR ÇAKIR HATIR
Proje No:	116Z775
Proje Başlığı:	Kapari Bitkisinden Moleküler Baskılama Yöntemi İle Yüksek Safılıkta Kuersetin Eldesi
Proje Türü:	3001 - Başlangıç AR-GE
Proje Süresi:	24
Araştırmacılar:	FATMA ELİF ÇEPNİ YÜZBAŞIOĞLU
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	İSTANBUL AREL Ü. MÜHENDİSLİK MİMARLIK F.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/02/2017 - 01/02/2019
Onaylanan Bütçe:	89371.0
Harcanan Bütçe:	76576.18
Öz:	<p>Biyoaktif bitki özlerinden biri olan ve yurt dışından ithal edilen kuersetin, elma, çilek, çay, fındık, kapari gibi bitkilerde bulunan flavonoidlerden olup önemli gıda maddelerinden biridir. Kuersetin molekülünün antioksidan, antiinflamatuvar ve antikanser gibi farmakolojik aktiviteler gösterdiği bilinmektedir. Antik zamanlardan bu yana kullanılmakta olan kapari bitkisi (Capparis spinosa) ılıman Akdeniz ikliminde yetişir ve ülkemizde geniş bir yayılış gösterir. Kaparinin kuersetin ve türevleri bakımından zengin olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur. Dolayısıyla, kapari bitkisi yüksek safılıkta kuersetin eldesine imkân tanımakta ve Türkiye'deki kapari üretimi göz önüne alındığında bu potansiyelin değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu projenin amacı ilk kez moleküler baskılanmış katı faz ekstraksiyonu (MISPE) ile kapari bitkisinden yüksek safılıkta kuersetin molekülü üretilmesi ve elde edilen hammaddenin ülke içinde kullanılmasını sağlamak, bu şekilde ülkemizin dışa bağımlılığını azaltmaktır.</p> <p>Çalışma süresince öncelikle kuersetin ile fonksiyonel monomerler arasındaki etkileşim FTIR ve UV/Vis spektrofotometre ile incelenmiştir. Bu çalışmada sentez için en uygun monomerin 4VP ve uygun çözücünün DMSO olduğuna karar verilmiştir. Sentezlenen polimerler ile deney tasarımı çalışması yapılmış, en uygun monomer ve başlatıcı derişimleri sırasıyla % Cm = % 5,0, % Ci =% 3,0 olarak belirlenmiştir. Bu koşullarla sentezlenen polimerlerin karakterizasyonları FTIR analizleri ile yapılmıştır. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile kapari bitkisinin ekstraksiyonları gerçekleştirilmiş, en çok kuersetin elde edilen yöntemin asit hidroizi içeren ekstraksiyon yöntemi olduğuna karar verilmiştir. Ekstrelerin içerisindeki kuersetin ve rutin varlığı ITK ve HPLC ile doğrulanmıştır. Çalışma sonucunda kuersetini tanıyan moleküler baskılanmış polimerler üretilmiş ve bu polimerlerin kapari ekstresindeki kuersetini diğer analoglarına oranla daha fazla tuttuğu sonucuna varılmıştır. Elde edilen bu polimerler kapariden kuersetin eldesinde kullanılacaktır.</p>
Anahtar Kelimeler:	Moleküler baskılanmış polimer, kuersetin, kapari, katı faz ekstraksiyonu
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır
Projeden Yapılan Yayınlar:	1- Synthesis And Characterization Of Molecularly Imprinted Polymers For Solid Phase Extraction Of Quercetin (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum),