



**AFLATOKSİN M1'İN MOLEKÜLER BASKILI POLİMER İLE
AYRILMASI VE TAYİNİ**

Ahmet Furkan KAYIŞ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

HAZİRAN 2021

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Ahmet Furkan KAYIŞ

22.06.2021

AFLATOKSİN M1'İN MOLEKÜLER BASKILI POLİMER İLE AYRILMASI VE TAYİNİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Ahmet Furkan KAYIŞ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Haziran 2021

ÖZET

Antikorlar, çeşitli proteinler, DNA ve organik moleküller gibi birçok tür, moleküler baskılama yönteminde, bu yapıya özgü ve seçici polimerler sentezlemek için kalıp olarak kullanılabilir. Bu çalışmada, aflatoksin M1 moleküllerine özgü boşluklara sahip olan baskılanmış polimer sentezlenmiş, aflatoksin M1'in karakteristik tanınması ve ortamdan ayrılabilmesi için su ve süt örneklerinde uygulamaları yapılmıştır. Moleküler baskılanmış polimerlerin (MIP) kolaylıkla ortamdan ayrılabilmesi için polimerin merkezinde çekirdek olarak manyetik nanoparçacıklar (MNP) kullanıldı. Moleküler baskılanmış manyetik nanoparçacıklar (MIP-MNP) yüzeyde baskılama yöntemi kullanılarak sentezlendi. MNP'ler $Fe^{2+} : Fe^{3+}$ bazik ortamında çöktürme yöntemi ile sentezlendi. MNP'lerin yüzeyinde polimerizasyonun başlatıcısı olarak viniltrimetoksisilan (VTMS) kullanıldı. Polimerizasyonda 2-hidroksietilmetakrilat (HEMA) fonksiyonel monomer olarak kullanıldı ve etilenglikoldimetakrilat (EGDMA) ise çapraz bağlayıcı olarak kullanıldı. Yüzeyde başlatılan polimerizasyon işlemi uygulanarak hazırlanan MIP-MNP'lerin hazırlanması 2 saatlik yüzeyde baskılama sonucunda tamamlandı. Elde edilen MIP-MNP'ler aflatoksin M1 moleküllerine karşı yüksek ilgi ve seçicilik gösterdi.

Bilim Kodu : 20102
Anahtar Kelimeler : Moleküler baskılama, aflatoksin, zenginleştirme
Sayfa Adedi : 69
Danışman : Doç. Dr. Özcan YALÇINKAYA

SEPARATION AND DETERMINATION OF AFLATOXIN M1 WITH
MOLECULARLY IMPRINTED POLYMER

(M. Sc. Thesis)

Ahmet Furkan KAYIŞ

GAZİ UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

June 2021

ABSTRACT

Many species such as antibodies, various proteins, DNA and organic molecules can be used as templates in molecularly imprinting to synthesize specific and selective polymers of this structure. In this study, imprinted polymer with specific spaces for aflatoxin M1 molecules was synthesized, and applications were made in water and milk samples for the characteristic recognition and separation of aflatoxin M1. Magnetic nanoparticles (MNP) were used as a core in the center of the polymer so that the molecularly imprinted polymers (MIP) can be easily separated from the medium. Molecularly imprinted magnetic nanoparticles (MIP-MNP) were synthesized using the surface imprinting method. MNPs were synthesized by precipitation method in $\text{Fe}^{2+} : \text{Fe}^{3+}$ basic medium. Vinyltrimethoxysilane (VTMS) was used as the initiator of polymerization on the surface of MNPs. In the polymerization, 2-hydroxyethylmethacrylate (HEMA) was used as functional monomer and ethyleneglycoldimethacrylate (EGDMA) was used as crosslinker. The preparation of MIP-MNPs, which were prepared by applying the polymerization process initiated on the surface, was completed after 2 hours of printing on the surface. The resulting MIP-MNPs showed high affinity and selectivity towards aflatoxin M1 molecules.

Science Code : 20102
Key Words : Molecularly imprinting, aflatoxin, enrichment
Page Number : 69
Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Özcan YALÇINKAYA

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca bilgileri ile bana yol gösteren, desteği ve güvenini her zaman hissettiren, hayatımın en önemli dönüm noktalarından birinde beni akademik kariyer yapmam konusunda yönlendiren ve bir abi sıcaklığıyla hem akademik hem sosyal anlamda her zaman yanımda olan kıymetli hocam Doç. Dr. Özcan YALÇINKAYA'ya sonsuz saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sürecinde bilgileri ile yol göstererek her zaman yanımda olan, ahlaklığını hiçbir zaman esirgemeyen kıymetli hocam Doç. Dr. Eylem TURAN'a sonsuz saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Bugünlere ulaşmamda en büyük desteği veren ve hayatımın her döneminde hem maddi hem manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, sevgisi her zaman içimi ısıtan, yorulduğumda omuz veren, düştüğümde kaldıran, her sıkıntıda kol kanat geren, doğruyu yanlış öğreten kıymetli annem Meryem KAYIŞ, kıymetli babam Seyfi KAYIŞ ve canımın parçası kardeşlerim Muhammed Esat KAYIŞ ve Mehmet Burhan KAYIŞ'e sonsuz sevgi ve minnetlerimi sunarım.

Bu süreçte dostlukları ile manevi desteklerini her zaman hissettiren ve hiçbir zaman yalnız bırakmayan kıymetli dostlarım Doğukan DOYDUK, Hakan SEYİS, Metehan YAZICIOĞLU ve Ali Osman BODUR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ve... Bu süreçte her zaman yanımda olan, benimle ağlayan, benimle gülen, derdime derman, yoluma yoldaş olan, sevgisi ile içimi ısıtan, gönlümde saklı olanlara en yakın olanım, hayat arkadaşım, can yoldaşım, ömrümün kıymetlisi biricik eşim Elif ÇALIK KAYIŞ'e sonsuz sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Aflatoksinler.....	5
2.1.1. Aflatoksinlerin genel özellikleri	6
2.1.2. Aflatoksinlerin sağlık üzerine etkileri.....	7
2.1.3. Aflatoksinlere yönelik yasal düzenlemeler	8
2.2. Nanoparçacıklar	9
2.2.1. Manyetik nanoparçacıklar.....	10
2.2.2. Fe ₃ O ₄ 'in özellikleri	10
2.2.3. Manyetik nanoparçacıkların uygulama alanları.....	11
2.2.4. Manyetik nanoparçacıkların sentezi	14
2.2.5. Manyetik nanoparçacıkların kararlılığı.....	15
2.2.6. Yüzey modifikasyonunda organik moleküllerin kullanımı	17
2.2.7. Yüzey modifikasyonunda yüzey aktif maddelerin kullanımı	17
2.2.8. Yüzey modifikasyonunda polimerlerin kullanımı	17
2.2.9. Yüzey modifikasyonunda biyolojik moleküllerin kullanımı	18
2.2.10. Yüzey modifikasyonunda inorganik moleküllerin kullanımı	18

	Sayfa
2.3. Moleküler Baskılama	19
2.3.1. Moleküler baskılı polimerlerin sentezlenmesi	20
2.3.2. Çapraz bağlayıcılar	21
2.3.3. Başlatıcılar	22
2.3.4. Çözücüler	23
2.3.5. Hedef moleküller	23
2.3.6. Fonksiyonel monomerler	24
2.4. Moleküler Baskılama Yöntemleri	24
2.4.1. Kovalent baskılama.....	25
2.4.2. Kovalent olmayan baskılama.....	26
2.4.3. Moleküler baskılı polimerlerin bazı uygulama alanları	27
3. DENEYSEL KISIM	31
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	31
3.2. Manyetik Nanoparçacıkların Sentezlenmesi.....	31
3.2.1. VTMS fonksiyonel manyetik nanoparçacıkların sentezlenmesi	32
3.2.2. Aflatoksin M1 baskılanmış manyetik nanoparçacıkların sentezlenmesi..	32
3.3. Baskılanmış Manyetik Nanoparçacıkların Aflatoksin M1 Uygulamaları.....	33
3.3.1. Aflatoksin M1 baskılanmış manyetik nanoparçacıkların adsorpsiyon süresi çalışmaları	33
3.3.2. Aflatoksin M1 baskılanmış manyetik nanoparçacıkların desorpsiyon çözeltisinin belirlenmesi	33
3.3.3. Aflatoksin M1 baskılanmış manyetik nanoparçacıkların desorpsiyon süresi çalışmaları	33
3.3.4. Aflatoksin M1 baskılanmış manyetik nanoparçacıkların adsorpsiyon çalışmaları.....	34
3.3.5. Aflatoksin M1 baskılanmış manyetik nanoparçacıkların süt örneklerine uygulanması.....	34
3.3.6. Aflatoksin M1 baskılanmış manyetik nanoparçacıkların adsorpsiyon kapasitesinin belirlenmesi.....	34

	Sayfa
3.4. Kullanılan Cihazlar	35
3.4.1. Geçirimli elektron mikroskobu (TEM).....	35
3.4.2. Titreşen örnek magnetometresi (VSM)	35
3.4.3. Dinamik ışık saçılımı (DLS).....	36
3.4.4. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR).....	36
3.4.5. Spektroflorimetre	36
3.4.6. Orbital çalkalayıcı.....	36
3.4.7. Isıtıcı manyetik karıştırıcı	36
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	37
4.1. Baskılanmış Manyetik Nanoparçacıkların Hazırlanması ve Adsorpsiyon Çalışmaları.....	37
4.2. Geri Kazanım Verimine Başlangıç Aflatoksin M1 Derişimi Etkisi	43
4.3. Adsorpsiyon İzotermi ve Adsorpsiyon Kapasitesi.....	44
4.4. Adsorpsiyon Süresinin Belirlenmesi.....	45
4.5. Desorpsiyon Çözeltilisinin Belirlenmesi.....	46
4.6. Desorpsiyon Süresinin Belirlenmesi.....	47
4.7. Aflatoksin M1 Moleküllerinin Seçicilik Çalışması	48
4.8. Baskılanmış Manyetik Nanoparçacıkların Tekrar Kullanılabilirliği	49
4.9. Aflatoksin M1'in Doğrusal Çalışma Aralığı ve LOD-LOQ Değerleri	50
4.10. Baskılanmış Manyetik Nanoparçacıkların Süt Numunlerindeki Uygulanabilirliği	51
5. SONUÇ	55
KAYNAKLAR	57
ÖZGEÇMİŞ	69

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.1. MNP, VTMS-MNP, NIP ve MIP manyetik nanoparçacıkların hidrodinamik çapları ve dispersite özellikleri	41
Çizelge 4.2. MIP manyetik nanoparçacıkların adsorpsiyon ve elüsyon sonrası % geri kazanımına başlangıç AfM1 derişimi etkisi.....	43
Çizelge 4.3. NIP manyetik nanoparçacıkların adsorpsiyonuna başlangıç AfM1 derişimi etkisi	43
Çizelge 4.4. MIP ve NIP manyetik nanoparçacıkların hedef moleküle seçiciliği	49
Çizelge 4.5. AfM1 ve AfB1 içeren süt örneklerinden MIP ve NIP manyetik nanoparçacıklar kullanılarak geri kazanımı ($n = 5$).....	52
Çizelge 4.6. AfM1 içeren süt ve su örneklerinden MIP manyetik nanoparçacıklar kullanılarak geri kazanımı ($n = 5$).	53

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Başlıca aflatoksin türleri	7
Şekil 2.2. Bazı farklı nanoparçacıkların fiziksel yapıları. (a) küresel, (b) dikdörtgen disk, (c) çubuk, (d) silindir, (e) elips, (f) disk, (g) mantar, (h) dairesel disk	9
Şekil 2.3. Histerezis eğrileri Fe_3O_4 (a), PDOP kaplı Fe_3O_4 (b) ve SiO_2 kaplı Fe_3O_4 (c)	11
Şekil 2.4. Karaciğer şeritlerinin, yapıştırıcılar kullanılarak yapışmasını gösteren fotoğraflar	12
Şekil 2.5. TSN'ler tarafından yapıştırılmış olan karaciğer dokularının sağlamlık testi	13
Şekil 2.6. Hasarlı karaciğer dokusuna TSN uygulanmasını gösteren fotoğraflar	13
Şekil 2.7. Fe_3O_4 'e ait $Eh - pH$ diyagramı	16
Şekil 2.8. Fe_3O_4 nanoparçacıkların sulu ortamda farklı pH değerlerindeki yapıları.....	17
Şekil 2.9. Bazı çapraz bağlayıcıların yapıları.....	22
Şekil 2.10. Kovalent baskılama örneği	26
Şekil 2.11. Kovalent olmayan baskılama örneği	27
Şekil 2.12. Moleküler baskılanmış polimerlere ait sentez süreci.....	28
Şekil 3.1. Doğrusallaştırılmış Langmuir izotermine ait bağıntı	35
Şekil 4.1. Baskılanmış manyetik nanoparçacıkların sentezlenmesi	38
Şekil 4.2. (a) MNPs, (b) VTMS-MNPs, (c) NIP-MNPs (d) MIP-MNPs FTIR spektrumları	39
Şekil 4.3. (a) MNP, (b) VTMS-MNP, (c) NIP ve (d) MIP nanoparçacıklara ait TEM görüntüleri.....	40
Şekil 4.4. MNP, VTMS-MNP, NIP ve MIP nanoparçacıkların manyetizasyon eğrileri.....	42
Şekil 4.5. AfM1 başlangıç derişimine karşı QE grafiği	44
Şekil 4.6. Doğrusallaştırılmış Langmuir eşitliğinin grafiği	45
Şekil 4.7. MIP ve NIP manyetik nanoparçacıkların adsorpsiyon süresi	46
Şekil 4.8. Kullanılan desorpsiyon çözeltisine karşı % geri kazanım verimleri.....	47

Şekil	Sayfa
Şekil 4.9. Aseton çözeltisi ile yapılan desorpsiyon işlemi için desorpsiyon süresine karşı % geri kazanım verimleri	48
Şekil 4.10. MIP manyetik nanoparçacıkların tekrar kullanılabilirliği	50
Şekil 4.11. AfM1 için floresans ölçümlerinden elde edilen kalibrasyon grafiği	51

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

emu g⁻¹	Manyetik moment
mg	Miligram
mL	Mililitre
ng	Nanogram
°C	Derece Celcius
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre

Kısaltmalar

Açıklamalar

AfB1	Aflatoksin B1
AfB2	Aflatoksin B2
AfG1	Aflatoksin G1
AfG2	Aflatoksin G2
AFM	Atomik kuvvet mikroskobu
AfM1	Aflatoksin M1
AfM2	Aflatoksin M2
APS	Amonyum persülfat
DLS	Dinamik ışık saçılması
DVB	p-divinilbenzen
EGDMA	Etilen glikol dimetilakrilat
GTX	Gonyautoksin
HEMA	2-Hidroksietil metakrilat
MAA	Metakrilik asit
MIP	Moleküler baskılı polimer
MIP-MNP	Moleküler baskılı manyetik nanoparçacık
MNP	Manyetik nanoparçacık

Kısaltmalar**Açıklamalar****NIP**

Baskılanmamış polimer

NIP-MNP

Baskılanmamış polimer kaplı manyetik nanoparçacık

PDIHidrodinamik $\text{\AA}$ ap**PDOP**

Polidopamin

SEM

Taramalı elektron mikroskobu

TEM

Geçirimli elektron mikroskobu

TEMED

Tetrametiletildiamin

TEOS

Tetraetilortosilikat

UV-GB

Ultraviyole-görünür bölge

VSM

Titreşen örnek manyetometresi

VTMS-MNP

VTMS fonksiyonel manyetik nanoparçacıklar

1. GİRİŞ

Bazı küf mantarları, uygun ortam koşullarında mikotoksin adı verilen toksik metabolitleri oluşturabilir. Bu mantarların başlıcaları *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Claviceps* adıyla bilinen mantarlardır. Bu mantarların oluşturduğu mikotoksinler, çeşit ve miktarlarına bağlı olarak ağız, soluma veya deri yollarıyla maruz kalındığında insan ve hayvan sağlığı üzerinde olumsuz etkilere neden olabilmektedir [1].

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü'nün verilerine göre, dünya genelinde üretilen tarım ürünlerinin yaklaşık % 25'inde mikotoksin kirliliği bulunmaktadır [2]. Dolayısıyla, mikotoksinler insan sağlığına verdiği zararlar sebebiyle kontrol altında tutulmaya çalışılmakta ve tüketilememesini sağlamak ve analiz çalışmaları sebebiyle dünya çapında her yıl ciddi derecede mali kayıplara sebep olmaktadır [3].

Aflatoksinler ise, *Aspergillus* familyasına ait küf mantarları tarafından üretilen mikotoksinlerdir [4]. Aflatoksinler, hayvanlarda ve insanlarda kanıtlanmış toksik ve kanserojen etkileri nedeniyle mikotoksin grupları içerisinde en çok araştırma konusu olan türdür. Tahıl ürünleri başta olmak üzere çok çeşitli gıda ürünlerinde saptanmıştır [5]. Aflatoksin türlerinin bilinen en toksik türü olan aflatoksin B1 ile kirlenen yemlerle beslenen ineklerin sütlerinde, aflatoksin B1 türünün bir metaboliti olan aflatoksin M1 türü tespit edilmektedir [6-8]. Aflatoksin M1, aflatoksin B1'e göre daha az biyolojik etki gösteren bir tür olmasına rağmen, Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından "Grup I" karsinojen (insanlar için kesin karsinojen) olarak sınıflandırılmıştır [9-11]. Aflatoksin M1'in sütteki varlığı bu toksik etkileri nedeniyle düşük düzeylerde bile olsa sütte bulunması, hem çocuk hem de yetişkinler açısından, özellikle uzun süreli maruziyette ciddi risk ortaya koymaktadır.

Aflatoksin M1'in analizi, dünyanın her yerinde olduğu gibi ülkemizde de oldukça ciddi önem arz etmektedir. Bu sebeple birçok araştırmaya konu olmakta ve birçok analiz laboratuvarında analizi gerçekleştirilmektedir. Bunun için başta HPLC olmak üzere çeşitli analiz yöntemleri kullanılmaktadır. Fakat analizden önce aflatoksin M1'in süt örneği içerisinde izole edilmesi gerekmekte ve bunun için de genellikle yüksek maliyetli olan immünoafinite kolonlar kullanılmaktadır [12].

Moleküler baskılama hedeflenen moleküle özgü boşluklar içeren, belirli bir kalıp molekülün kullanılmasıyla hedef moleküle karşı seçici polimerlerin sentezlenmesi işlemidir. Sentezinde kullanılan çapraz bağlayıcılar sayesinde kararlı ve mekanik olarak dirençli bir yapıya sahip olan polimerler, molekülün uzaklaştırılmasıyla elde edilen boşluklu yapı sayesinde spesifik tanımayaya uygun ve bozulmaya karşı dirençli adsorbanlar elde edilmesine olanak tanır [13]. Bu sayede birçok alanda spesifik tanıma özelliği gösteren moleküler baskılanmış polimerler sentezlenebilir. Moleküler baskılama tekniğinin temelinde belirli bir molekülün polimer tarafından tanınması vardır. Enzim-substrat, antijen-antikor, reseptör-ligant ilişkisinde olduğu gibi moleküler baskılanmış polimerler de hedef moleküle karşı anahtar-kilit ilişkisi içerisindedirler.

Manyetik nanoparçacıklar, manyetik özellikleri sayesinde oldukça önemli malzemelerdir. Ayrıca çekirdek-kabuk yapılarının fonksiyonel olması bu yapıları daha da önemli kılmaktadır. Yapılan uygulamalarda nanoparçacıkların kimyasal olarak kararlı olması, yaklaşık eşit büyüklükte olması aynı zamanda çözelti ortamında iyi dağılabilmesi son derece önemlidir [14]. Bu özellikleri gösterebilen ve en yaygın kullanıma sahip nanoparçacıklardan birisi de demir 2-3 oksit (Fe_3O_4) nanoparçacıklarıdır.

Manyetit adıyla da bilinen demir 2-3 oksit (Fe_3O_4) nanoparçacıklar demir(II) ve demir(III) oksitlerin bir arada bulunduğu bir yapıya sahiptir. Doğal minerallerde en çok bulunan demir cevherlerinden biri olan manyetit laboratuvar şartlarında da son derece kolay sentezlenebilmektedir. Fe_3O_4 ferrimanyetik özelliktedir ve doğal olarak bulunabilen minerallerin en manyetigidir [15]. Demir 2-3 oksit nanoparçacıklar kolay sentezi, geri dönüştürülebilmesi ve manyetik alan ile yönlendirilebilmesi sebebiyle biyomedikalden çevreye kadar birçok alanda kullanılmaktadır. Ayrıca yüzey modifikasyonuna imkân sağlaması sayesinde dış yüzeyi koruyucular ve polimerlerle kaplanabilir.

Bu çalışmada, manyetik nanoparçacıkların yüzeyinde hazırlanan moleküler baskılı polimerlerin (MIP), aflatoxin M1 moleküllerine uygulanarak, bu moleküle özgü, seçici davranabilen ve yüksek ilgiye sahip adsorbanların hazırlanması amaçlanmıştır. Bu sayede yüksek maliyetli ve tek kullanımlık olan immünoafinite kolon malzemelerine alternatif olabilecek, analiz öncesi ayırma işlemlerinde kullanılabilme imkânı olan, gerektiğinde de aflatoxin M1 moleküllerinin seçici olarak zenginleştirilmesini sağlayabilecek tekrar kullanılabilir, ucuz ve kolay sentezlenebilir malzemeler elde edilmiş olacaktır.

Ayrıca ekstraksiyon işlemlerinde kullanılan MIP, merkezinde bulunan manyetik özellikteki demir 2-3 oksit nanoparçacıklar sayesinde manyetik alan uygulanmak suretiyle ortamdan basit ve hızlı bir şekilde ayrılabilir. Bu yönüyle de birçok adsorban materyale göre daha kolay uzaklaştırılabilir ve bu sayede birçok farklı ortam ve şartlara uyum sağlayabilen yüksek seçiciliğe sahip ve dayanıklı adsorban materyaller elde edilmiş olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Aflatoksinler

Mikroorganizmalar içerisinde önemli bir grubu oluşturan küfler; hava, toprak, su gibi ortamlarda ve yaşayan tüm canlılarla birlikte neredeyse her yerde bulunabilirler [16, 17]. Mikotoksinler; hasat, depolama ve işleme süreci boyunca, bazı küflerin metabolik süreçleri sonucu ürettikleri toksik metabolitlerdir. Mikotoksinlerin memeli canlılar için en zararlı olan türleri aflatoksinler, fumonisinler ve okratoksin A'dır. Ayrıca aflatoksinler ise mikotoksin türleri içerisinde en çok araştırma yapılan ve en fazla bilinen toksinlerdir [18]. *Aspergillus flavus* (Asp.flavus) ve *Aspergillus parasiticus* (Asp. parasiticus) küflerinin ürettiği toksik metabolik ürünler aflatoksinler olarak adlandırılır. Farklı yörelerde üretilen yemlerin kullanılması, kullanılan teknolojik uygulamalar, hasat, depolama ve nakil süreci gibi besin üretiminin tüm aşamaları mikotoksin oluşumunda etkindir. Aflatoksinler temel olarak, bitkisel ürünlerden üretilen B1, B2, G1 ve G2 formundadır. Fakat memelilerde aflatoksin M1 (AfM1) ve aflatoksin M2 (AfM2) gibi diğer aflatoksinler metabolik faaliyetler sonucu süte de ortaya çıkabilir [17, 19].

En yaygın olarak üretilen mikotoksin türünün aflatoksin B1 (AfB1) olduğu bilinmektedir ve karaciğerde metabolize edilir [20]. Fakat başka metabolik dönüşümlere devam edebilir. Aflatoksin M1, aflatoksin B1 ile kirlenmiş olan yemle beslenen hayvanların sütlerinde bulunan aflatoksin B1'in hidroksil metabolitidir. Aflatoksin B1, karaciğerde AfM1'e dönüştürülür ve dışkı, süt ve idrar gibi vücut sıvılarıyla atılır [18, 21]. Yapılan çalışmalarda hayvan yemlerinde bulunan AfB1 düzeyinin, süte geçen AfM1 düzeyinde etkili olduğu belirtilmektedir [22, 23].

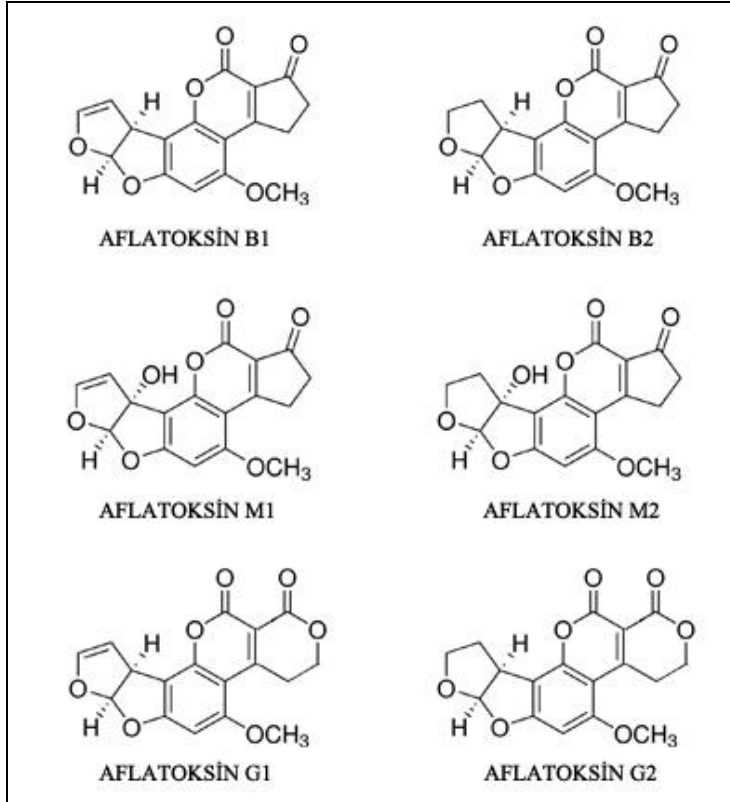
Süt ve süt ürünlerinin AfM1 ile kirlenmesi ve AfM1 derişimi; coğrafi bölge, ülkenin gelişmişlik düzeyi ve mevsimsel özellikler de dâhil olmak üzere birçok etmene bağlı olarak değişebilmektedir [24]. Fakat süte AfM1'in varlığı ve derişimini en çok etkileyen etmenlerin başında mevsimsel değişiklikler gelmektedir. Yapılan çalışmalar, yaz aylarında taze yeme ulaşılabilmesi sebebiyle sütteki AfM1 düzeylerinin daha az olduğunu göstermiştir [22, 25]. Yapılan bazı çalışmalarda, AfM1 düzeyinin sterilizasyon, pastörizasyon ve süt ürünlerinin hazırlanışına dair çeşitli süreçlere tabi tutulduğunda stabil olduğu bulunmuştur

[21, 26, 27]. Aynı zamanda AfM1 içeren süt ve süt ürünlerini birkaç ay dondurarak depolamanın AfM1 düzeyine etkisi olmadığı da belirlenmiştir [28, 29]. Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği'nde belirlenen değerlere göre çiğ süt, ısıtılmış süt ve süt bazlı ürünlerin üretiminde kullanılan sütlerde aflatoksin M1'in üst limiti 0.050 µg/kg'dır [30]. Süt, yüksek besin değeri itibarıyla her yaş grubu için önerilen önemli bir doğal besindir. Yüksek protein, kalsiyum ve vitamin kaynağıdır [18, 31, 32]. Sütün çok nemli bir besin kaynağı olması ile beraber, AfM1 açısından da oldukça riskli bir besin olduğu çalışmalarda belirtilmektedir [33, 34]. Aflatoksinlerden özellikle aflatoksin B1 yemlerde, aflatoksin M1 ise sütte bulunup memelilerde en güçlü karsinojen olarak kabul edilmektedir. İnsanlarda özellikle bu aflatoksin türlerinin hepatik karsinomaya neden olduğu bilinmektedir [35].

2.1.1. Aflatoksinlerin genel özellikleri

Doğada yaygın şekilde bulunan küfler 200'den fazla türe sahiptir ve bunlardan bir kısmının mikotoksin oluşturabildikleri bilinmektedir. Bu mikotoksin çeşitlerinden biri olan aflatoksinler, birçok farklı iklim koşulunda bulunabilen ve yüzden fazla türü bulunan *Aspergillus* cinsi küf türü tarafından üretilen toksinlerdir. Tarım ürünlerinde genellikle *Asp. flavus* ve *Asp. Parasiticus* türü küfler bulunur. Ayrıca nadiren de *Asp. nomius* gibi diğer küf türleri bulunabilir. Aflatoksinler, bu küf türlerinin metaboliti olan yüksek derecede toksik maddelerdir[36, 37]. Aflatoksinlerin küfler tarafından oluşturulan dört önemli temel türü vardır. Bunlar; aflatoksin B1 ve B2; UV ışığı altında mavi floresans özelliği gösterdiği için bu şekilde adlandırılırlar. Aflatoksin G1 ve G2; UV ışığı altında yeşilimsi sarı floresans özelliğe sahiptirler[38]. Hayvanların gıda yoluyla aflatoksin B1 ve G1 tüketmesi sonucu, bu toksinlerin az bir kısmı (%1-2) aflatoksin M1 ve M2 olarak süt yoluyla atılır. Aflatoksinlerin M1 ve M2 tespiti ilk kez, küflenerek aflatoksin B1 ve B2'ye maruz kalmış tahıllarla beslenen hayvan sütlerinde tespit edilmiştir.

Aflatoksinler yapısal olarak birbirine benzer özellik gösterirler ve aflatoksinlerin örnek içerisindeki miktarı genellikle AfB1+AfG1+AfB2+AfG2 türlerinin toplam miktarı olarak belirtilir. Aflatoksin B1'in metaboliti aflatoksin M1, aflatoksin B2'nin metaboliti ise aflatoksin M2'dir [38, 39].



Şekil 2.1. Başlıca aflatoksin türleri

Hayvanlar tarafından tüketilen yem türleri içerisindeki aflatoksin B1 (AfB1) düzeyinin sütte oluşan aflatoksin M1 (AfM1) miktarını doğrudan etkilediği bilinmektedir [40, 41]. Çiftlik hayvanları üzerinde yapılan kontrol çalışmalarında, hayvanlar tarafından tüketilen gıda içerisindeki AfB1 türünün metabozile olması sonucu yaklaşık %0,3-6,2'sinin AfM1 türüne dönüştüğü saptanmıştır [42, 43]. Fakat bu dönüşüm oranı; hayvan türü, süt dönemi, sağım zamanı, sağım sıklığı ve hayvan türünün süt verim seviyesi gibi faktörlere göre değişiklik gösterir [42].

2.1.2. Aflatoksinlerin sağlık üzerine etkileri

Mikotoksinlerin karsinojenik, dismorfolojik, mutajenik, östrojenik, genotoksik, nörotoksik ya da immünotoksik özellik gösterdiği saptanmıştır [35]. Akut mikotoksin zehirlenmesinin en yaygın olarak bilinen etkisi böbrek ve karaciğer fonksiyonlarında bozulma meydana gelmesidir. Yüksek düzeylerde maruz kaldığı durumlarda ölüme bile yol açabilir. Bazı mikotoksinler, ilk olarak protein sentezini engeller ve immün yetersizliğe neden olarak deri hassasiyeti ve nekrozise kadar değişen bulgu ve belirtiler gösterebilirler. Bazı mikotoksin

türleri ise hayvanlarda düşük dozda dahi alınsa, devamlı titremeye neden olabilen nörotoksinlerdir. Fakat daha yüksek düzeylerde maruz kalınırsa kalıcı beyin hasarı ve ölüme neden olabilirler[38]. Birçok mikotoksinin maruziyet sonrası kısa vadede başlıca etkisi kronik karaciğer harabiyeti ve özellikle karaciğer kanserine neden olmasıdır. Bazı toksinler ise DNA replikasyonuna neden olurlar [38]. Mikotoksin türlerinden olan aflatoksinlerin karsinojenik etkileri olduğu kanıtlanmıştır [44]. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansına (IARC) göre AfB1 insanlar ve hayvanlarda kanser yapıcı etkisinden dolayı Grup 1’de, AfM1 ise insanlarda kanser oluşturması şüpheli olarak grup 2B’de sınıflandırılmaktadır. AfM1’in hedef organı aflatoksinB1 gibi karaciğerdir [28, 44]. Aflatoksinle kirlenmiş gıda ve yemler, hem hayvan, hem de insan sağlığı için ciddi tehditlere neden olabilir. Gelişmekte olan ülkelerde aflatoksinle kirlenmiş olan besinlerin tüketilmesi sebebiyle kronik aflatoksin maruziyetine sahip insanların sayısının 5 milyardan fazla olduğu tahmin edilmektedir. Ayrıca aflatoksinin sebep olduğu karaciğer kanseri, özellikle de hepatosellüler karsinoma vakasının 4 milyardan üzerinde insanda olduğu tahmin edilmektedir [45]. 1974 yılında Hindistan’ın batısında aflatoksine maruz kalan 397 kişinin 108’i aflatoksin zehirlenmesi sonucu hayatını kaybetmiştir. 2004 yılında ise Kenya’da günlük besin olarak tükettikleri mısırdaki aflatoksin bulunması sebebiyle zehirlenen 317 kişiden 125’i ölmüştür. Dünya Sağlık Örgütü’nün raporlarına göre (WHO), aflatoksinler hem akut, hem de kronik olarak toksisiteye sebep olmaktadır [46-48].

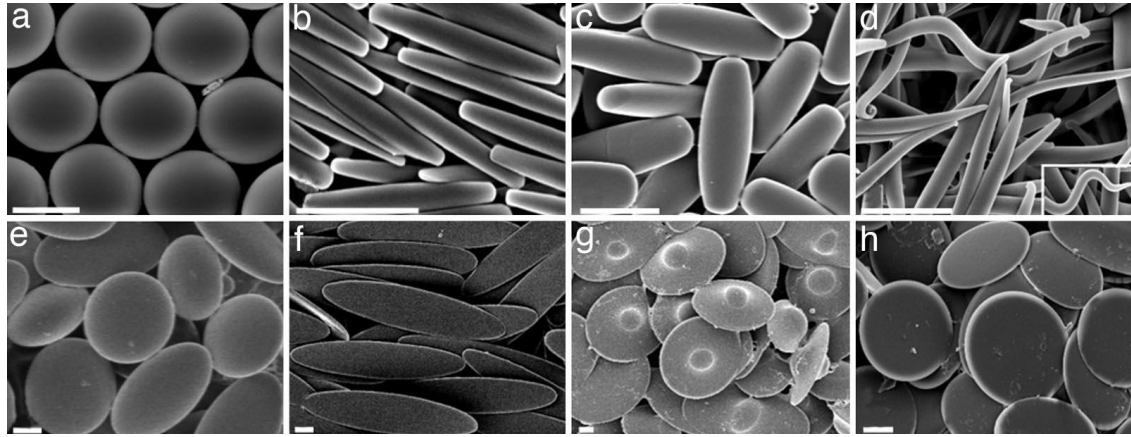
2.1.3. Aflatoksinlere yönelik yasal düzenlemeler

Aflatoksinlerin gıda maddelerindeki düzeyi ve insanların aflatoksinlere ne derece maruz kaldıkları kesin olarak tespit edilemediği için Gıda Katkı Maddeleri Ortak Uzmanlar Komitesi (JECFA) tolere edilebilir maruziyet miktarı için üst limit bildirmemiştir. Bunun yerine risk taşıyan gıdaların tüketiminin diyetle azaltılması ve yüksek aflatoksin içerikli besinlerin tüketiminin ise sınırlandırılması için ülkeler tarafından önlemlerin alınması gerektiğini vurgulamaktadır [49]. ABD Besin ve İlaç Dairesi’nin (FDA) yem ve besinlerde aflatoksinlerin kabul edilebilir düzeyleri ile ilgili olarak hazırladığı kılavuzda insanların tüketimine sunulan yiyecekler için toplam aflatoksin düzeyinin 20 ppb olması gerektiği belirtilmektedir. Bu besinlerden sadece sütlerde AfM1 düzeyi 0,5 ppb olarak belirlenmiştir [2]. Türk Gıda Kodeksi, Bulaşanlar Yönetmeliği’nde (2011) çiğ ve işlem görmüş sütler ile süt bazlı gıdaların üretilmesinde kullanılacak olan sütlerdeki maksimum AfM1 limitini

0,050 $\mu\text{g/kg}$ olarak belirlemiştir. Bebek ve devam gıdalarında bu limit düzeyleri 0,025 $\mu\text{g/kg}$ 'dır [30, 48].

2.2. Nanoparçacıklar

1-100 nm arasındaki boyutlara sahip olan parçacıklar, nanoparçacık olarak adlandırılır. Manyetik nanoparçacık birçok farklı materyal kullanılarak, birçok farklı yöntemle sentezlenebilir ve birçok farklı alanlarda uygulanabilir olması sebebiyle son zamanlarda sıklıkla tercih edilmektedir [50]. Nanoparçacıkların sentezinde metaller ve oksitleri, çeşitli biyomoleküller ve silikatlar gibi birçok materyal kullanılabilir. Fiziksel yapıları küre, tüp, kafes ve silindir gibi şekillerde olabilir [51].



Şekil 2.2. Bazı farklı nanoparçacıkların fiziksel yapıları. (a) küresel, (b) dikdörtgen disk, (c) çubuk, (d) silindir, (e) elips, (f) disk, (g) mantar, (h) dairesel disk [52]

Nanoparçacıklar, çeşitli yapılarda ve şekillerde elde edilebilmesi, birçok farklı ortamda uygulanabilmeleri ve ortamda dağılma gibi özgün özelliklere sahip olmaları sebebiyle birçok alanda sıklıkla kullanılmaktadır [53]. Nano boyutlardaki bu parçacıklar birçok özgün avantaj barındırması sebebiyle ilaç sektörü, biyomedikal uygulamaları gibi birçok biyoteknolojik alanda kullanılır hale gelmişlerdir [54]. Nanometre ölçeğinde ve kontrol edilebilen şekle sahip olan, moleküler baskılama yöntemleri kullanılarak hafıza özelliği kazandırılabilen, fonksiyonel gruplar kullanılarak istenilen özelliklerde elde edilebilen bu parçacıklar, istenirse manyetik özellik gösteren materyaller ile hazırlanarak bulunduğu ortamdan kolayca ayrıştırılabilirler. Bu sayede de nanoparçacıklar birçok uygulama alanında avantajlı ve kolay uygulanabilir hale gelmektedir. Parçacıkların manyetik özelliği sayesinde ortama manyetik alan uygulandığında parçacıklar mıknatıslanır ve parçacıklar ortamdan kolaylıkla ayrılabilir.

Uygulanan manyetik alan kaldırıldığında ise nanoparçacıklar kolaylıkla tekrar çözelti ortamına dağılırlar [55].

2.2.1. Manyetik nanoparçacıklar

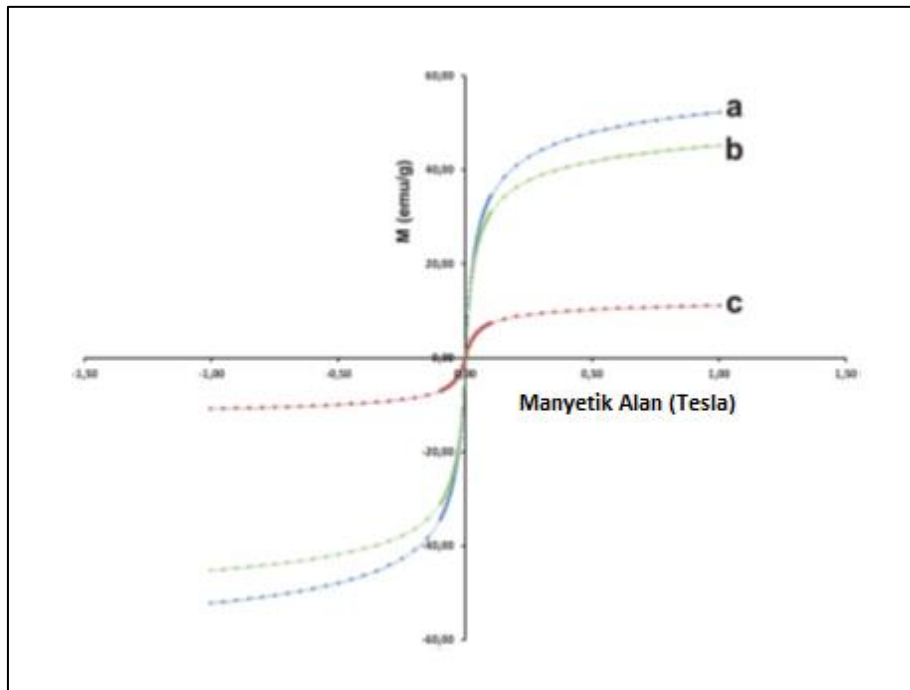
Nanoparçacıklar, yapıları ve sahip olabileceği özellikleri sebebiyle, son yıllarda oldukça fazla ilgi görmektedir [56]. Manyetik nanoparçacıklar karmaşık ortamlardan dış manyetik alan ile kolayca ayrılmaları sayesinde, hastalıkların teşhis ve tedavisinde, ilaç dağılımı, biyo-etiketleme ve biyomoleküllerin ayrılması ve saflaştırılması ve tıbbi görüntüleme dâhil olmak üzere, biyoloji ve tıp gibi alanlarda uygulanabilir özelliklere sahiptirler. Çözelti ortamında manyetik nano parçacıkların bir araya gelmesini engellemenin zor olması sebebiyle sulu çözeltilerini içeren uygulamalarda dağılım özelliklerinin iyi olması gerekmektedir. Yapılan son çalışmalarda, manyetik nanoparçacıkların manyetik özellikleri sebebiyle manyetik nano-çekirdek içeren çekirdek-kabuk yapıları fazla ilgi görmektedir aynı zamanda çekirdek-kabuk yapılarının fonksiyonel olması bu yapıları önemli malzemeler haline getirmektedir. Bu durum, nanoparçacıkların veri depolama, biyoetiketleme, biyomoleküllerin ayrılması gibi uygulamalarının olması sebebiyle oldukça fazla çalışmaya konu olmaktadır. Yapılan uygulamalarda nano parçacıkların kimyasal olarak kararlı olması, yaklaşık eşit büyüklükte olması aynı zamanda çözelti ortamında iyi dağılabilmesi istenmektedir [14]. Nanoparçacıkların kolay, çeşitli fiziksel şekillerde ve farklı manyetik duyarlılığa sahip olarak üretilmesi en büyük avantajlarından biridir. Yeni geliştirilen ürünlerde manyetik nanoparçacıkların kullanımındaki amaç, çevre dostu, dayanıklı ve aynı zamanda da hafif malzemelerin üretiminin sağlanmasıdır [57].

2.2.2. Fe₃O₄'in özellikleri

Demir 2-3 oksit aynı zamanda ferro-ferrik oksit ve manyetit olarak da bilinmektedir. Kimyasal formülünün ifadesi FeO.Fe₂O₃ şeklinde de yazılabilmektedir. Demir(II) ve demir(III) oksitlerin bir arada bulunduğu bir yapıya sahiptir. Doğal minerallerde en çok bulunan demir cevherlerinden biri olan manyetit laboratuvar şartlarında da son derece kolay sentezlenebilmektedir. Fe₃O₄ ferrimanyetik özelliktedir ve doğal olarak bulunabilen minerallerin en manyetiktir [15].

Demir 2-3 oksit nanoparçacıklar kolay sentezi, geri dönüştürülebilmesi ve manyetik alan ile yönlendirilebilmesi sebebiyle biyomedikalden çevreye kadar birçok alanda kullanılmaktadır.

Manyetik maddelerin uygulanan manyetik alana karşı davranışları histerezis eğrisi ile gösterilir. Manyetik alan şiddeti ile mıknastıslanma doğru orantılı olarak artar ve belirli bir düzeyden sonra doygunluk seviyesine ulaşır. Bir maddenin sahip olduğu manyetik özellikler histerezis eğrisine bakarak belirlenebilir [58].



Şekil 2.3. Histerezis eğrileri Fe_3O_4 (a), PDOP kaplı Fe_3O_4 (b) ve SiO_2 kaplı Fe_3O_4 (c) [59]

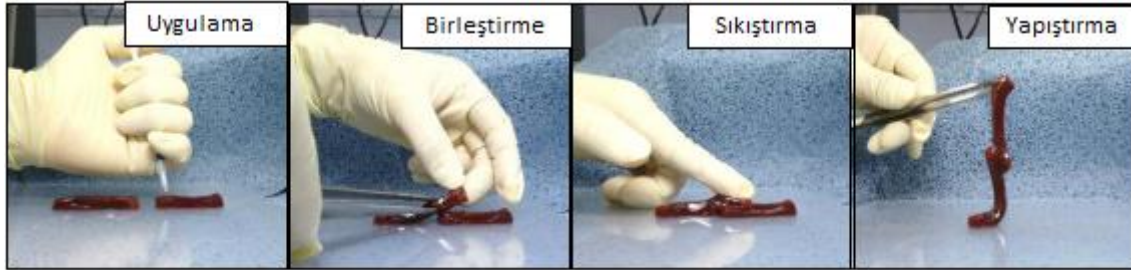
Histerezis eğrisine göre uygulanan manyetik alana karşı, materyallerin manyetik yönelimleri en yüksekten düşüğe doğru sırasıyla Fe_3O_4 , Polidopamin (PDOP) kaplı Fe_3O_4 ve SiO_2 kaplı Fe_3O_4 şeklindedir. Şekil 2.3'ten de anlaşıldığı üzere kaplanan Fe_3O_4 'ün manyetik yönelimi kaplama materyalinin türüne göre azalma göstermiştir [60].

2.2.3. Manyetik nanoparçacıkların uygulama alanları

Manyetik nanoparçacıklar düşük toksik özellikleri sebebiyle çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanılabilmektedir. Bunun yanında karmaşık matris sistemlerinden

manyetik alan uygulanarak kolayca uzaklaştırılabilmeleri sebebiyle hastalık teşhis ve tedavisi, ilaç salımı, çeşitli tıbbi görüntüleme, biyomolekül saflaştırılması ve ayrılması gibi çeşitli tıp ve biyoloji alanlarında kullanılmaktadır.

Doku yapıştırıcıları, kolay uygulanabilir olması ve yüksek etkinlikleri sebebiyle cerrahi yaraların ya da travma sonrası oluşan yaraların kapatılması ve hasarlı dokuların tekrar bağlanması için dikiş ve zımba ile kapatma yöntemlerine alternatif olarak ortaya çıkmıştır. Ancak bu yapıştırıcıların güvenli ve uygulanabilir olması, tıbbi görüntüleme yöntemleri ile tespit edilebilmesi ve biyouyumlu olmasına bağlıdır. Doku yapıştırıcılarının çok azı bu koşulları sağlamaktadır [61]. Yapılan bir çalışmada elde edilen tantal oksit bazlı silika nanoparçacıkların (TSN), biyouyumlu olduğu ve gerçek zamanlı tıbbi görüntüleme teknikleri için yüksek kontrast göstererek tespit edilmeye olanak sağladığı, bunun yanı sıra da yaranın kapatılması için iyi derecede yapışkan özellik gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca biyouyumlu TSN'lerin alternatifi olduğu diğer klinik görüntülemeye uygun doku yapıştırıcılarına göre oldukça az hücre toksisitesine ve enflamasyona neden olduğu tespit edilmiştir [61]. Aşağıda verilen şekillerde karaciğer dokusu için TSN'lerin yapıştırma gücü görülmektedir.



Şekil 2.4. Karaciğer şeritlerinin, yapıştırıcılar kullanılarak yapışmasını gösteren fotoğraflar [61]

Yapıştırıcının uygulanması, yapıştırıcının uygulandığı karaciğer dokusu şeritlerinin üst üste bindirilerek yapıştırılması, şeride hafifçe bastırarak sıkıştırılması ve analiz edilecek olan şeridin kaldırılması ve yapışmanın gerçekleşip gerçekleşmediğinin kontrolü.



Şekil 2.5. TSN'ler tarafından yapıştırılmış olan karaciğer dokularının sağlamlık testi [61]



Şekil 2.6. Hasarlı karaciğer dokusuna TSN uygulanmasını gösteren fotoğraflar [61]

Manyetik nanoparçacıklar, özgün fiziksel özellikler göstermesi ve biyoyumlu olması sayesinde, hipertermi hastalığının tedavisi, kanserli dokuların MRI ile görüntülenebilmesi ve ilaç salımı gibi birçok biyomedikal alanda kullanılmaktadır. Manyetik nanoparçacıkların tercih edilmesi, biyoyumlu olmaları, manyetik alana karşı yüksek duyarlılık göstermeleri ve birçok farklı sentez yöntemi ile sentezlenebilmeleri gibi özellikleri sayesinde [62]. Ayrıca manyetik nanoparçacıklar manyetik alan uygulanarak kolaylıkla ortamdaki uzaklaştırılabilirler ve bu sayede de antikanser ilaçların belirli bir bölgeye ve belirli bir salım hızında verilmesine olanak sağlarlar. Ayrıca biyo uyumlu olan bu malzemeler birçok hastalığın teşhis edilmesinde, ilaçların istenilen bölgeye taşınması ve ilaç etkileşimlerinin izlenmesi gibi birçok uygulamada kullanılmaktadır. Biyo uygulamalarda ilaç enjekte edilen nanoparçacıklar, manyetik özelliği sayesinde dışarıdan manyetik alan uygulanarak istenilen bölgeye taşınır ve ilacın hedef bölgeye enjeksiyonu sağlanır. İlaç enjeksiyonu tamamlandığında nanoparçacıklar tekrar aynı yöntemle müdahale edilen bölgeden uzaklaştırılır. Bu sayede kemoterapi uygulamalarında da alternatif bir yöntem olarak kullanılabilmesinin mümkün olduğu düşünülmektedir. Dışarıdan uygulanan manyetik alan nedeniyle nanoparçacıklar ısınır. Ayrıca kanser hücreleri de 40 °C üzerindeki sıcaklıklarda bozunmaya başlarlar. Bu özellikten istifade ederek nanoparçacıkların kanserli bölgede ısınması sağlanarak kanserli hücrelerin bozunmasının mümkün olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca gıda sektöründe analizi zor olan eser kimyasalların ve gıdalarda

oluşabilecek bakteri ve virüs gibi türlerin analizinde kullanılmak üzere nanosensör uygulamalarına dair çalışılmalar da yapılmaktadır [63].

Demir oksit temelli nanoparçacıklar doğal olarak kayalarda ve deniz diplerinde bulunabildiği gibi laboratuvar ortamında yapay yöntemlerle istenilen şekil ve özelliklerde de sentezlenebilirler. Nanoparçacıklarda en yaygın kullanılan demir oksitleri γ -Fe₂O₃ (maghemit), Fe₃O₄ (manyetit) ve α -Fe₂O₃ (hematite) türleridir. Manyetik nanoparçacıkların kimyasal sentezi oldukça kolaydır. Bu nanoparçacıklar, pH, Fe²⁺/Fe³⁺ oranı ve iyonik şiddet gibi faktörler değiştirilerek istenilen şekil ve boyutlarda sentezlenebilir [64].

Manyetik nanoparçacıklar yüksek yüzey alanına ve yüksek manyetik özelliklere sahiptir. Bu sayede manyetik nanoparçacıklar, bazı ağır metallerin sulu ortamdan manyetik olarak ayrılması için de kullanılabilir. Toksik etkiye sahip olan ağır metaller, nanoparçacıkların adsorban olarak kullanılması ve ardından dışarıdan manyetik alan uygulanarak ortamdan uzaklaştırılması sayesinde başka bir yöntem gerektirmeksizin kolay ve hızlı bir şekilde ayrılır [65].

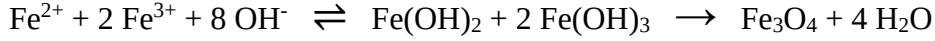
2.2.4. Manyetik nanoparçacıkların sentezi

Manyetik nanoparçacıkların istenilen boyut ve özelliklerde sentezlenebilmesine dair birçok çalışma yapılmış ve en çok kullanılan yöntem olan ikili çöktürme yöntemi de dâhil birçok farklı yöntem bulunmuştur [66].

İkili çöktürme yöntemi

Bu yöntem manyetik nanoparçacıkların sentezinde en çok kullanılan yöntemdir. Alternatif yöntemlere göre uygulanabilirliğinin kolay ve maliyetinin ucuz olması sebebiyle daha avantajlı hale gelmektedir. Ayrıca bu yöntem, toksik kimyasalların kullanılmaması sebebiyle biyo medikal uygulamalarında da sıkça tercih edilmektedir [67]. İkili çöktürme yönteminde Fe²⁺ ve Fe³⁺ iyonlarının uygun oranlarda bulunduğu sulu ortama, oda sıcaklığında veya daha yüksek sıcaklıklarda baz ilave edilmesi sonucunda manyetik nanoparçacıklar elde edilir. Çökmenin tamamlanması için pH'nın 9-12 aralığında olması gerekir [68].

İkili çöktürme yöntemi vasıtasıyla nanoparçacıkların sentezlenmesi işlemi aşağıdaki kimyasal reaksiyon üzerinden gerçekleşir.



Sentezlenen parçacıkların boyut ve şekil özelliklerinin belirlenmesinde, $\text{Fe}^{3+} / \text{Fe}^{2+}$ iyonlarının oranı, tepkime sıcaklığı, baz çözeltisinin ilave hızı, karıştırma hızı, iyonlar için kullanılan tuz türü (klorürler, nitratlar, perkloratlar, sülfatlar) ve ortam pH'sı gibi birçok değişken önem arz etmektedir [69]. Bu yöntemle aynı fiziksel özelliklere sahip, homojen nanoparçacıkların sentezlenebilmesi, pH değerinin iyi ayarlanmasına bağlıdır [70].

Manyetik nanoparçacıklar havadan oksitlenirler. Bu yüzden oksijensiz ortamda sentezlenmeleri gerekmektedir. Fe_3O_4 nanoparçacıklar oda koşullarında çok kararlı değildirler. Oksijenle temas etmeleri halinde kolaylıkla Fe_2O_3 yapısına oksitlenir, asidik ortamlarda ise kolaylıkla çözünürler [71]. Bu sebeple Fe_3O_4 nanoparçacıkların oksijensiz ortamda sentezlenmeleri gerekir.

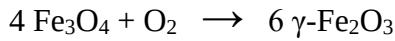
2.2.5. Manyetik nanoparçacıkların kararlılığı

Manyetik nanoparçacıklar birçok alanda kullanılmaktadır. Ancak verimli bir şekilde kullanılabilmesi nanoparçacıkların kullanılan ortamdaki kararlılığına bağlıdır. Nanoparçacıkların en ideal kararlılığı genellikle parçacık boyutunun 20 nm altında olmasıyla sağlanır. Bu sayede parçacıklar tek bir parçacık gibi davranırlar [72]. Buna rağmen bir süre sonra parçacıkların manyetik duyarlılıkları azalarak kararlılıklarını kaybederler. Yüzeylerinde modifikasyon yapılan parçacıkların manyetik duyarlılığında azalma olsa da modifiye edilmeyen taneciklerin zamanla kararlılığını kaybetmesi modifikasyonun tercih edilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Polimerler, organik moleküller, biyolojik moleküller, yüzey aktif maddeler, silika ve metaller vasıtasıyla nanoparçacıklara yüzey modifikasyonları uygulanması çalışılan ortamda daha uzun süre kararlı kalmalarını sağlar [73, 74].

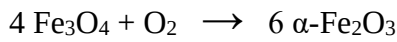
Bu modifikasyonlar nanoparçacıkların çözelti ortamında iyi dağılmasını ve kararlılıklarının artarak kullanılabilirliklerinin artmasını sağlar. Ayrıca bu uygulamalar nanoparçacıkların

yüzeylerinin farklı yapılarla modifiye edilmesi sayesinde farklı fonksiyonlar elde edilmesini sağlar. Manyetik özellikleri sebebiyle çalışma ortamından kolaylıkla uzaklaştırılabilen bu parçacıklar kataliz, ilaç salımı gibi çalışmalarda kullanılarak düşük maliyet ve kısa reaksiyon süresi gibi avantajlar sağlanmaktadır [75].

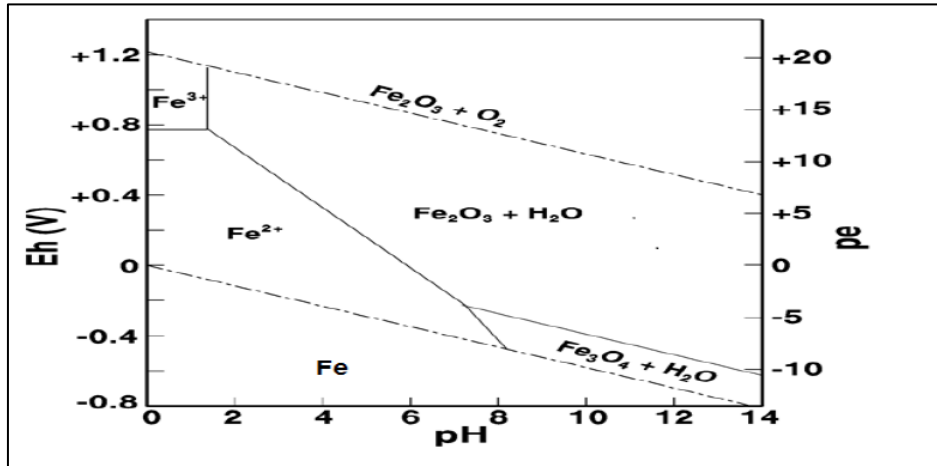
Manyetit havayla teması sonrası kolaylıkla oksidasyona uğrayarak kahverengi maghemit türüne dönüşür [76].



300 °C üzerindeki sıcaklıklarda ise hematite dönüşür [76].

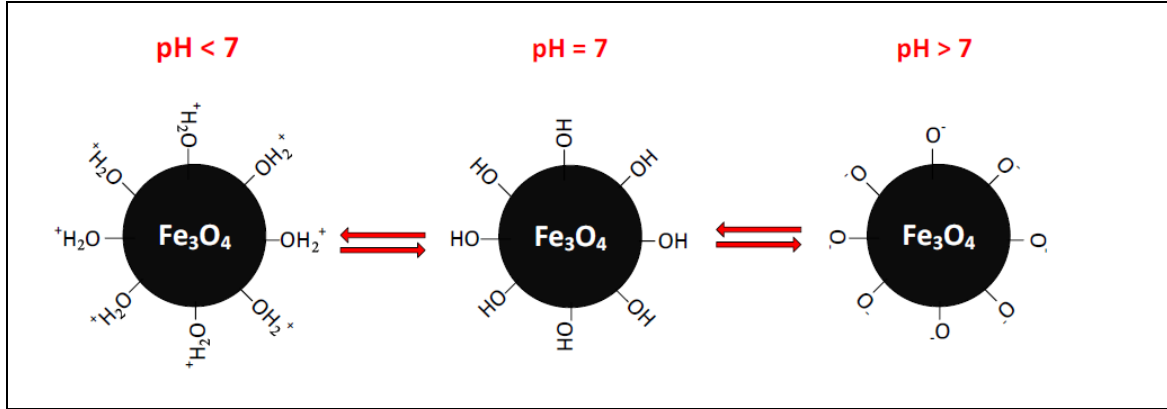


Eh-pH diyagramı, nanoparçacıkların sulu ortamda hangi formda bulunduğunun belirlenmesini sağlar [92].



Şekil 2.7. Fe₃O₄'e ait Eh – pH diyagramı [77]

Fe₃O₄ nanoparçacıkların sulu ortamdaki kararlılıkları ortamın pH değerinin 7 – 14 aralığında olmasına bağlıdır. Ayrıca ortamın potansiyeli de düşük olmalıdır [78]. Fe₃O₄ (hematit) formu, ortamın bazik olduğu ve potansiyelin sıfır ve üzerinde olduğu durumlarda bulunur. Bu sebeple bazı biyolojik uygulamalarda kararlı davranamayabilirler. Bu kararlılığın sağlanması da çeşitli yüzey modifikasyonları ile mümkün kılınmaktadır.



Şekil 2.8. Fe_3O_4 nanoparçacıkların sulu ortamda farklı pH değerlerindeki yapıları [79]

2.2.6. Yüzey modifikasyonunda organik moleküllerin kullanımı

Manyetik nanoparçacıkların kolaylıkla topaklanma eğilimindedirler. Bu topaklanmayı engellemek için yüzeyleri organik moleküller ile modifiye edilebilir. Bu modifikasyonlar sayesinde manyetik nanoparçacıklara hidrofobik özellikler de kazandırılabilir. Bu hidrofobik etki ise nanoparçacıklar arasında topaklanma oluşturabilir ve bundan dolayı da parçacık büyüklüğünde artış gözlenebilir [80].

2.2.7. Yüzey modifikasyonunda yüzey aktif maddelerin kullanımı

Yüzey aktif maddelerin yüzey modifikasyonunda kullanılması, nanoparçacıklara hem hidrofobik özellikler hem de hidrofilik özellikler kazandırmak amacıyla tercih edilebilir. Hidrofobik özellik kazandırmak amacıyla yağ asidi, fenol, alkil gibi bazı modifikasyon grupları kullanılabilir. Hidrofilik özellik kazandırmak içinse amonyum tuzu ve lizin gibi yapılar tercih edilebilir [81]. Termodinamik kararlılık sağlanması amacıyla da diheksadesil fosfat ve alkil fosfanat gibi organik maddeler kullanılabilir [82].

2.2.8. Yüzey modifikasyonunda polimerlerin kullanımı

Nanoparçacıkların modifikasyonunda polimerler genellikle topaklanmanın engellenmesi için kullanılır. Polimerler manyetik nanoparçacıkların yüzeyinde oluşturdukları katman ile topaklanmayı önleyerek kararlı bir nano yapı oluşmasını sağlarlar [83].

Polimerlerle modifiye edilen bu nanoparçacıklar ilaç salımı, manyetik rezonans görüntüleme gibi işlemlerde sıklıkla kullanılmaktadır [84]. Nanoparçacıkların yüzeyinin polimerlerle modifiye edilmesi manyetik özelliklerinde kısmen de olsa azalmaya sebep olabilir [85]. Polimer yüzey modifikasyonları manyetik nanoparçacıkların oksidasyonunun engellenmesinde yeterli olamazlar ve yüksek sıcaklıklarda kararsız oldukları için stabilizasyon sağlayamazlar [85].

2.2.9. Yüzey modifikasyonunda biyolojik moleküllerin kullanımı

Manyetik nanoparçacıkların yüzeyleri polipeptit, antikor, protein, biyotin ve avidin gibi biyolojik moleküllerle kimyasal yollarla kaplanarak hedef noktaya özgü hale gelir. Bu tip biyofonksiyonel yapılarla modifikasyon yapılması nanoparçacıkların biyoyumlu hale gelmesinde etkin rol oynar. Bir literatür örneğinde maghemit nanoparçacıkların streptavidin proteini kullanılarak biyofonksiyonel hale getirilmesi sayesinde biyotin ile işaretlenmiş oligonükleotitleri spesifik olarak tanınması için çalışmalar yapılmıştır.

İlk olarak suda çözünürlüğü yüksek karboksilli asit grupları manyetik nanoparçacıklara bağlanmış ve 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid ile aktif hale getirilmiştir [86]. Daha sonra da maghemit nanoparçacıkların yüzeyine streptavidin proteini bağlanmıştır. Bu sayede biyotin ile işaretlenmiş olan oligonükleotitlerin tanınması sağlanmıştır. Bu tanıma işlemi streptavidin ile biyotin arasında bulunan anahtar-kilit ilişkisiyle, kolay ve özgün bir şekilde gerçekleşmiştir [87].

2.2.10. Yüzey modifikasyonunda inorganik moleküllerin kullanımı

İnorganik moleküllerin yüzey modifikasyonunda kullanılması nanoparçacıkların kararlı hale gelerek oksidasyona karşı dirençli olmalarını sağlar. Bu sayede daha dayanıklı yapılar elde edilir ve yeni uygulama alanları elde edilir. Bu tip yüzey modifikasyonları uygulanırken metal, silika, sülfür ve metal oksit türleri yaygın olarak kullanılmaktadır [88].

Manyetik nanoparçacıkların yüzey kaplamasında topaklanmanın önlenmesi, parçacıklar arası etkileşimlerin azaltılabilmesi ve daha kararlı bir yapı elde edilebilmesi sayesinde genellikle silika kullanılır. Ayrıca silika ile modifiye edilen nanoparçacıklar biyoyumludur. Nanoparçacıkların silika ile modifiye edilmesinde en çok sol-jel tekniği tercih edilir [89].

Ferrosivılarda yüzey modifikasyonu için sol-jel tekniği ile yüzeye tetraetilortosilikat (TEOS) kaplanan çalışmada tetraetilortosilikat (TEOS) ve amonyak derişimi ile kaplamanın genişliğinin kontrol edilebildiği belirlenmiştir [90]. Bir başka çalışmada ferrosivılar 2-propanol ile seyreltilerek ilave edilen TEOS ile modifikasyon yapılmıştır. Yapılan bu modifikasyon sonucunda da silika ile modifiye edilen yüzeyde silikanın genişliğini ortama ilave edilen TEOS miktarı ile ilişkili olduğu gözlemlenmiştir [91].

Manyetit nanoparçacıkları oksidasyondan koruyacak yüzey modifikasyonları yapabilmek amacıyla platin, karbon, altın, paladyum, gümüş ve demir gibi metal ve ametaller de tercih edilebilir.

2.3. Moleküler Baskılama

Hedeflenen moleküle özđü boşluklar içeren, monomer, çapraz bağlayıcı ve kalıp molekülün bir arada kullanılmasıyla hedef moleküle karşı seçici polimerlerin sentezlenmesine moleküler baskılama denir. Son yıllarda birçok araştırmacının ilgisini çekmiştir ve birçok çalışmaya konu olmuştur. Çapraz bağlayıcılar sayesinde kararlı ve mekanik olarak dirençli, fonksiyonel bir monomer kullanılarak da hedeflenen molekül ile polimer arasında kovalent veya kovalent olmayan bağlanmalar oluşturulan polimerler elde edilir ve son olarak uygun bir çözücü vasıtasıyla polimer yapısından baskılanmış olan molekülün uzaklaştırılmasıyla spesifik tanımaya uygun boşlukların elde edilmesi sonucu baskılanmış polimer elde edilmiş olur.

Moleküler baskılı polimerler antikor benzeri davranış göstermekle beraber antikorlardan daha geniş bir kullanım alanına sahiptir. Moleküler baskılı polimerler antikorlarla kıyaslandığında daha kararlıdır ve ekonomik ve pratik açılardan sentezlenmesi daha kolaydır. Moleküler baskılı polimerler ilaçlar, hormonlar, proteinler, nükleotid bazlar ve antikorlar gibi birçok molekülün kullanılması ile sentezlenebilir ve birçok alanda uygulanabilirler [13]. Bu sayede birçok alanda spesifik tanıma özelliği gösteren moleküler baskılanmış polimerler sentezlenebilir. Moleküler baskılama tekniğinin temelinde belirli bir molekülün polimer tarafından tanınması vardır. Enzim-substrat, antijen-antikor, reseptör-ligant ilişkisinde olduğu gibi moleküler baskılanmış polimerler de hedef moleküle karşı anahtar-kilit ilişkisi içerisinde dirler. Bu polimerlerin sentezlerinde de bu ilişkiler örnek alınmıştır. Yapay reseptörler hedef moleküllerin kullanılmasıyla sentetik olarak tanıma

bölgeleri oluşturulmuş yapılardır. Yapay olarak elde edilen reseptörler, doğal reseptörlerle karşılaştırıldığında bir hayli kararlı, kolay ve ucuz üretilen reseptörlerdir [92]. Ancak bu avantajlarının yanında heterojen bağlanma bölgelerinin oluşması, tanıma boşluklarına bağlanmada karşılaşılabilen güçlükler, hedef molekülün yapıdan uzaklaştırılması esnasında karşılaşılan güçlükler ve bazı yapılarda görülen düşük bağlanma kapasitesi gibi dezavantajları da bulunmaktadır.

2.3.1. Moleküler baskılı polimerlerin sentezlenmesi

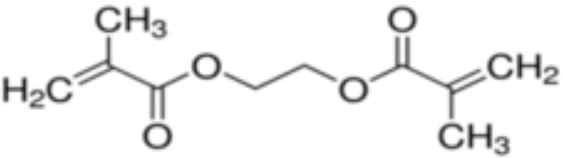
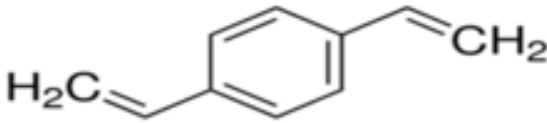
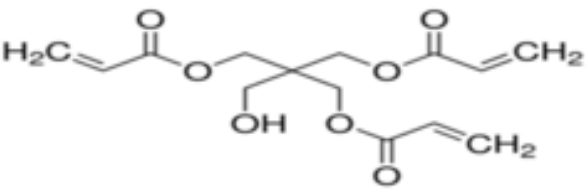
Moleküler baskılı polimer sentezinde kullanılan yöntemlerden ilki yığın polimerizasyon yöntemidir. Bu yöntem sentezlenecek olan baskılanmış polimerlerin boyutlarını istenilen ölçülerde elde edebilmek için öğütme, eleme gibi basamakları içerir. Bu yöntem çok basit şekilde uygulanabilmesi ve ekonomikliği açısından son derece uygundur. Fakat bağlanma performansının düşük olması ve baskılanan molekülün zor uzaklaştırılması da dezavantajlarındandır. Bu sebeple farklı baskılama tekniklerinin tercih edilmeye başlanması gerekmiştir [93]. Bu alternatif baskılama tekniklerinin başında yüzey baskılama tekniği gelir. Bu teknikte baskılanan molekül yüzey veya yüzeye yakın bir bölgede bağlandığı için uzaklaştırılması oldukça kolaydır [94]. Bu sayede bağlanmada kolaylık sağlanmış olur ve kütle transferi oldukça hızlı gerçekleşir.

Moleküler baskılanmış polimerler yüksek spesifik seçiciliği, kararlı yapıları, kolay bir şekilde sentezlenebiliyor olmaları, oldukça ekonomik olmaları ve birçok farklı ortamda birçok farklı molekül ile çalışabilmeleri sebebiyle son dönemlerde yüksek derecede ilgi odağı olmuştur. Başlıca kullanım alanları ayırma, kataliz, kimyasal tayin, sentetik enzim, tıbbi ilaçlar ve kimyasal reseptör uygulamalarıdır. Biyolojik reseptörlerin kararsız ve mekanik olarak dayanıksız olmalarıyla birlikte küçük moleküllere sahip ve yüksek çözünürlükte olmalarına karşın moleküler baskılanmış polimerlerin en az bir yıl kararlı kalabilmeleri, mekanik olarak yüksek dayanıma sahip olmaları, büyük molekül yapıları ve düşük çözünürlükte olmaları moleküler baskılanmış polimerleri daha uygun hale getirmektedir. Baskılanmış polimerlerde baskılama molekülünün büyük boyutlarda olması istenmeyen bir durumdur. Büyük boyutlardaki baskılama moleküllerinin baskılanma işlemi sonrasında yapıdan uzaklaştırılması oldukça zordur [95].

Moleküler baskılı polimerlerin sentezlenmesindeki bileşenler baskılama molekülü, çapraz bağlayıcı, fonksiyonel monomer, başlatıcı ve çözücüdür. Baskılama için uygun yöntemin belirlenmesinde baskılama molekülünün yapısı, çözünürlüğü ve boyutu önemli bir rol oynar. Baskılama molekülü-fonksiyonel monomer oranı sentezlenen polimerde oluşan özgün bağlanma bölgelerinin kararlılığı için önem arz eder. Ayrıca polimerin ve tanıma bölgelerinin yapısı ve kararlılığında çapraz bağlayıcı, çözücü, sıcaklık, başlatıcı ve pH da önemli etkenlerdir. Fonksiyonel monomerler baskılama yapılacak olan yüzeye tutunarak polimerleşme işlemi başlar. Baskılama molekülü polimerizasyon işlemi esnasında kalıp görevi görür ve kovalent veya kovalent olmayan etkileşimlerle polimer yüzeyinde tutunur ve moleküle özgü bölgesel yapıların oluşumu sağlanır. Baskılanan molekül ve monomer arasındaki etkileşim sonucunda kendiliğinden kompleks oluşur. Daha sonra çapraz bağlayıcının oluşturduğu bağlar ile birlikte polimer yapısında çapraz bağlar oluşur. Uygun çözücü yardımıyla oluşan ağ benzeri polimer yapı yıkanır ve baskılama molekülü yapıdan uzaklaştırılır. Bu molekülün yapıdan uzaklaştırılmasıyla yapıda, moleküle özgü ve yüksek ilgiye sahip boşluklu bölgeler kalır. Moleküle özgü bu bölgeler polimer yapısı sayesinde kararlı bir şekilde muhafaza edilir [96].

2.3.2. Çapraz bağlayıcılar

Moleküler baskılı polimerlerin sentezinde çapraz bağlayıcılar yüksek miktarda kullanılır. Manyetik nanoparçacıkların yüzeyinde yapılan moleküler baskılama işlemlerinde çapraz bağ oranı %75'in üzerindedir. Bu yapılarda kullanılan yüksek oranda çapraz bağ, baskılanmış polimer yapısının mekanik direncinin yüksek olmasını sağlar ve baskılanmış molekülün uzaklaştırılmasıyla oluşan bağlanma bölgelerinin kararlılığını artırır [97]. Ancak gereğinden fazla çapraz bağlayıcı kullanılması baskılama molekülünün yapıdan uzaklaştırılmasını zorlaştırmaktadır. Bu sebeple doğru miktarda çapraz bağlayıcı kullanılması önemlidir. En çok tercih edilen çapraz bağlayıcılara örnek olarak Etilen glikol dimetakrilat (EGDMA), p-divinilbenzen gibi maddeler verilebilir [98].

Çapraz Bağlayıcı	Çapraz Bağlayıcının Yapısı
Etilen glikol dimetakrilat	
p-Divinilbenzen	
Pentaeritrol tetraakrilat	

Şekil 2.9. Bazı çapraz bağlayıcıların yapıları [99]

2.3.3. Başlatıcılar

Polimerizasyon işleminin başlaması için bir takım kimyasallara ihtiyaç vardır. Bu kimyasallar başlatıcılar olarak adlandırılır. Bu işlemlerde genellikle radikalik polimerizasyon gerçekleşir ve radikaller oluşturularak tepkimeler zincirinin başlaması sağlanır. Radikal oluşum işlemi ışık, ısı, elektrokimyasal yöntemler ve yüksek enerjili ışınlar gibi bir takım etmenlerle gerçekleştirilir. Bazı monomer türleri kendiliğinden polimerleşebilirken, stiren, metil metakrilat, vinil klorür ve izopren gibi bazı monomer türleri ise yüksek enerjili ışınlarla radikaller oluşturularak, bu radikallerin zincir polimerizasyonunu başlatması sonucu polimerleşebilmektedirler. Moleküler baskılamada polimerizasyon için termal başlatıcılar da kullanılabilir. Bu yöntem basit ve ekonomik olmasına rağmen düşük termal kararlılığa sahip olan baskılama molekülleri kullanıldığında baskılama işlemi olumsuz etkilenmektedir. [99]

2.3.4. Çözücüler

Moleküler baskılanmış polimerlerde ağ yapısı ve gözenek oluşumunda çözücünün türü ve miktarı önemli bir role sahiptir. Polimerizasyonda çözücünün baskılama molekülü ve diğer polimerizasyon bileşenlerini çözmek dışında da görevleri vardır.

Bu görevler, baskılama molekülü ile fonksiyonel monomer arasında kararlı kompleks oluşumunun sağlanması ve polimer yapısında gözeneklerin oluşumunu sağlanmasıdır. Çözücü, polimerizasyon işlemlerinde baskılanmış molekül ile fonksiyonel monomer arasında oluşturulacak olan kompleksin kararlılığında son derece etkilidir. Özellikle kovalent olmayan baskılama türünde çözücünün polaritesi, oluşturulacak kompleksin polimerizasyon işlemi öncesinde kararlılığının sağlanması üzerinde oldukça etkilidir. Kloroform, benzen gibi düşük polariteye sahip olan çözücüler kompleks oluşumunu arttırarak hidrojen bağları ve elektrostatik etkileşimler gibi polar olmayan etkileşimlerin artmasını sağlar. Yüksek polariteye sahip olan çözücüler ise fonksiyonel monomer ile baskılama molekülü arasındaki etkileşimleri zayıflatarak, kovalent olmayan etkileşimleri azaltma eğilimi gösterirler. Yapılan bir çalışma çözücü polaritesinin artması sonucunda daha düşük seçicilik değerleri elde edildiğini göstermiştir [100].

2.3.5. Hedef moleküller

Baskılanmak istenen molekülün geometrik yapısı, boyutu ve içerdiği fonksiyonel gruplar gibi özellikleri, baskılama için önem arz etmektedir. Baskılama molekülünün seçimi maliyeti, organik çözücülerdeki çözünürlüğü, monomerlerle olan etkileşimi gibi özellikleri dikkate alınarak gerçekleştirilir [101]. Kovalent olmayan baskılama işleminde, baskılama molekülü ile fonksiyonel monomer arasında zayıf etkileşimler olduğu için, baskılama molekülünün birden fazla fonksiyonel gruba sahip olması gerekmektedir. Baskılanan molekül polimerin ağ yapısı içerisinde uzaklaştırıldıktan sonra, o moleküle özgü, fiziksel ve kimyasal olarak molekülü tanıyabilen bağlanma bölgeleri oluşmaktadır. Bu esnada baskılama molekülünün yapısında meydana gelebilecek herhangi bir değişiklik, seçicilikte azalmaya neden olmaktadır. Bu sebeple baskılama molekülünün gerek maliyeti ve ulaşılabilirliği nedeniyle gerekse de kararlılığı nedeniyle fiziksel ve kimyasal özellikleri yönünden baskılama molekülüne benzeyen sahte (dummy) moleküller kullanılabilmektedir.

Kovalent olmayan baskılama türünde baskılanan molekülün polimerik yapıdan tamamen uzaklaştırılması gerekmektedir [13]. Tamamen uzaklaştırılmaz ise, geri bağlanma işlemi esnasında baskılama molekülü ağ yapı içerisinde sızıntı yaparak çözeltiye geçer. Bu problemin ortadan kaldırılması için de sahte baskılama molekülleri tercih edilebilir.

2.3.6. Fonksiyonel monomerler

Fonksiyonel monomerin seçimi, baskılanacak molekül ile arasındaki kuvvetli etkileşimler ile kararlı bir kompleks oluşturabilmesi için oldukça önemlidir. Kovalent baskılama türünde fonksiyonel monomer ile baskılama molekülünün oranı önemli değildir [102]. Çünkü polimerizasyon sürecinden önce baskılanacak molekül ve fonksiyonel monomer arasında oluşan kompleks bir dengeye bağlı olarak oluşmaz. Kovalent olmayan baskılama türünde ise fonksiyonel monomer ile baskılanacak molekül arasındaki oran önemlidir. Çünkü polimerizasyon öncesinde kompleksin oluşturulması denge tepkimesi sonucunda gerçekleşir [103]. Le Chatelier ilkesine göre dengeyi kompleks oluşumunun sağlanacağı yöne kaydırabilmek için monomerin fazlasının eklenmesi gerekir. Ancak bu durum özgün olmayan bağlanma bölgelerinin de oluşabilmesi gibi olumsuz bir durumu da beraberinde getirmektedir. Bu baskılama türünde hidrojen bağı oluşturma potansiyelinin yüksek olması nedeniyle çoğunlukla metakrilik asit kullanılmaktadır [104]. Metakrilik asit (MAA) hidrojen bağı oluşumu esnasında donör ve akseptör ilişkisi içerisinde davranış gösterdiği için geri bağlanma çalışmalarında birçok çeşit analitin tutulması ve ayrılması için imkân sağlamaktadır.

MAA ile baskılanacak molekül arasında daha güçlü etkileşimler olabilmesi için polar olmayan çözücülerin kullanımı önemlidir. Daha polar çözücülerin tercih edileceği durumlarda fonksiyonel monomer olarak akrilamit monomerlerinin kullanılması daha uygun olacaktır. Akrilamit, metakrilik asitten daha polar olduğu için, baskılanacak molekül ile arasında oluşacak güçlü hidrojen bağları, çözücü ortamının polar olmasına bağlıdır [99].

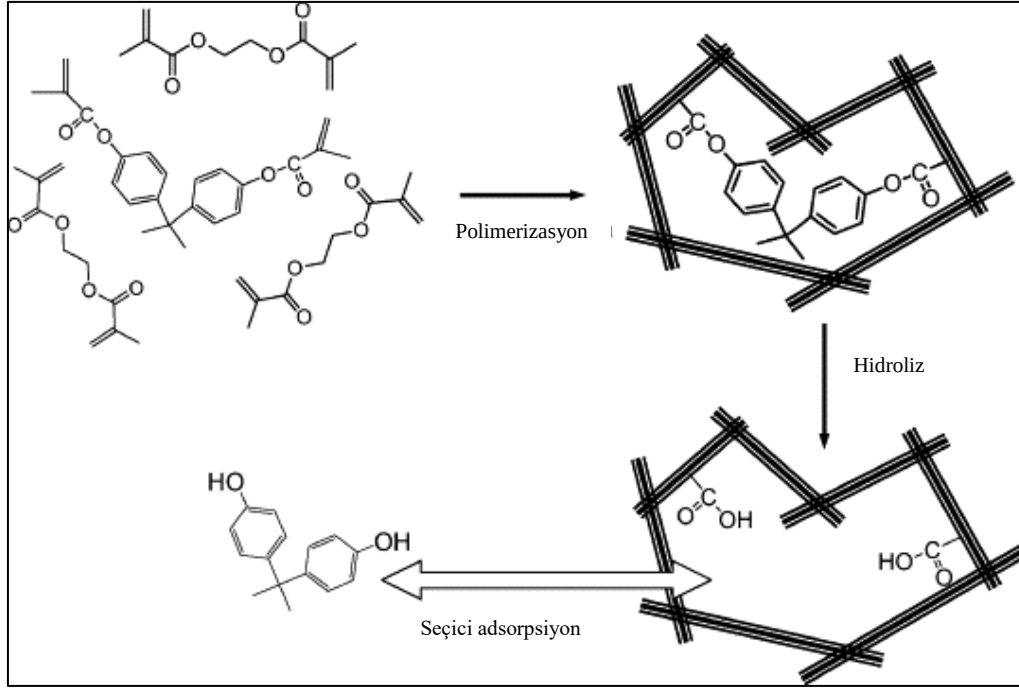
2.4. Moleküler Baskılama Yöntemleri

Moleküler baskılama yöntemleri kovalent ve kovalent olmayan baskılama olmak üzere iki ana başlık altında toplanır. Bu yöntem, baskılanacak olan molekül ile kullanılacak olan fonksiyonel monomer arasında oluşması istenen etkileşimin türüne göre belirlenir [99].

2.4.1. Kovalent baskılama

Kovalent baskılama yöntemi, baskılanacak olan molekül ile fonksiyonel monomer arasında tersinir özellikte kovalent etkileşimlerin oluşması temeline dayanır [105].

1970’lerde Wulff ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışma ile ilk kez uygulanan kovalent baskılama yönteminde, cis-diol fonksiyonel grubu içeren moleküller ile boronat ester köprülerinin kovalent olarak etkileşmesinden faydalanıldı. Bu yöntemde, baskılama molekülünün polimer yapı içerisinde hidroliz yoluyla uzaklaştırılması sağlanır. Bu sayede oluşturulan spesifik bağlanma bölgeleri baskılama molekülü için yüksek seçicilik göstermektedir [105]. Kovalent baskılama yönteminde, tersinir özellikteki kovalent bağlar sadece baskılanan molekül ve kullanılan fonksiyonel monomer arasında oluşmaktadır [13]. Bu nedenle fonksiyonel monomer ile baskılanacak olan molekül arasında stokiometrik bir oranla reaksiyon gerçekleşir ve bu sayede özgün ve homojen geri bağlanma bölgelerinin oluşması sağlanmaktadır [106]. Bu yöntem, fonksiyonel monomer ve baskılama molekülü arasında kararlı kompleks oluşturulması nedeniyle dış etkenlerden (sıcaklık, pH, vb.) daha az etkilenmektedir. Baskılanan molekülün polimere bağlanması ve ardından tekrar yapıdan uzaklaştırılması süreci yavaş ve uzun işlemler olduğu için kromatografik ayırmalar için uygun bir yöntem değildir. Ayrıca bu yöntemin uygulanabileceği baskılama molekülünün sınırlı sayıda olması da bu yöntemi dezavantajlı olma sebeplerindendir [107].

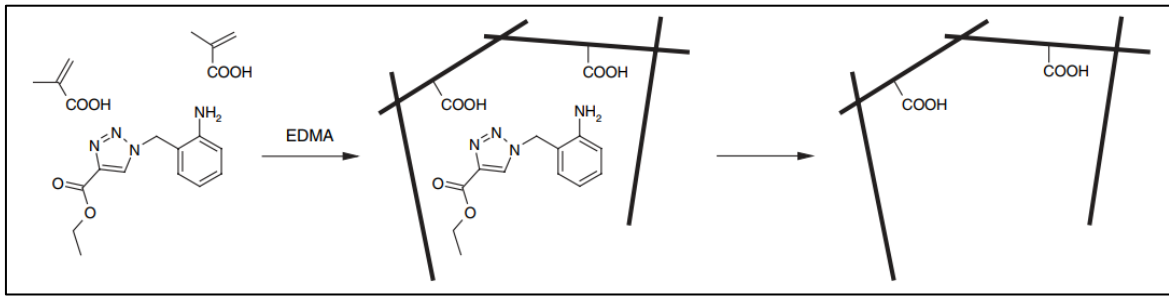


Şekil 2.10. Kovalent baskılama örneği [107]

2.4.2. Kovalent olmayan baskılama

Mosbach ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma ile moleküler baskılı polimerlerin, fonksiyonel monomer ile baskılama molekülü arasında oluşturulan kovalent olmayan etkileşimler vasıtasıyla da uygulanabileceğini kanıtlar niteliktedir [108, 109]. Bu baskılama tipi, fonksiyonel monomer ve baskılanacak olan molekül arasında oluşan hidrojen bağı, elektrostatik, iyonik ve dipol-dipol etkileşimlerin kullanıldığı bir yöntem olmakla beraber, sentezinin kolay ve ekonomik olması nedeniyle daha çok tercih edilmektedir [110]. Bununla birlikte baskılanan molekülün, polimerin ağ yapısı içerisinde kolaylıkla uzaklaştırılabilmesi ve kolaylıkla tekrar bağlanabilmesi, kovalent baskılamaya göre çok daha kolay sentez basamaklarına sahip olması ve hızlı gerçekleştirilebilmesinden dolayı daha çok tercih edilmektedir. Baskılama molekülünün kolaylıkla ayrılabilmesi ve kolaylıkla geri bağlanabilmesi sebebiyle de yüksek performanslı sıvı kromatografilerinde de (HPLC) sıklıkla uygulanmaktadır. Kovalent olmayan baskılama, birçok çeşit baskılama molekülü ve fonksiyonel monomerlerin kullanımına olanak sağlar. Bu yöntemin uygulamalarında asidik bir monomer olan metakrilik asit (MAA) ve bazik bir monomer olan 4-vinil piridin en çok tercih edilen monomerlerdendir [99].

Kovalent olmayan baskılama yönteminde çoğunlukla hidrojen bağı etkileşimlerinden faydalanılmaktadır [97]. Bunun sebebi, sıklıkla kullanılan fonksiyonel monomerler olan akrilik asit ve metakrilik asit yapılarından bulunan karboksil gruplarının, hidrojen bağı oluşumu esnasında hem donör hem de akseptör gibi davranmasıdır. Bu baskılama türünde işlem zayıf etkileşimler üzerinden yürüdüğü için bağlanma sabiti daha zayıftır. Bu etkinin giderilmesi için polimerleşme ortamına fonksiyonel monomerin fazlası eklenmelidir. Monomerin fazlası eklendiğinde denge kompleks oluşumu yönüne kayacaktır. Ancak bu durum ağ yapı içerisinde fonksiyonel monomere ait farklı bağlanma bölgelerinin oluşmasına neden olarak bir dezavantajı da beraberinde getirmektedir [98]. Bu durum da özgün olmayan geri bağlanmalara neden olur. Fonksiyonel monomer ile baskılanacak olan molekül arasında oluşacak olan kompleksin kararlılığında sıcaklık, pH, çözücü gibi faktörler de önemli derecede etkilidir.

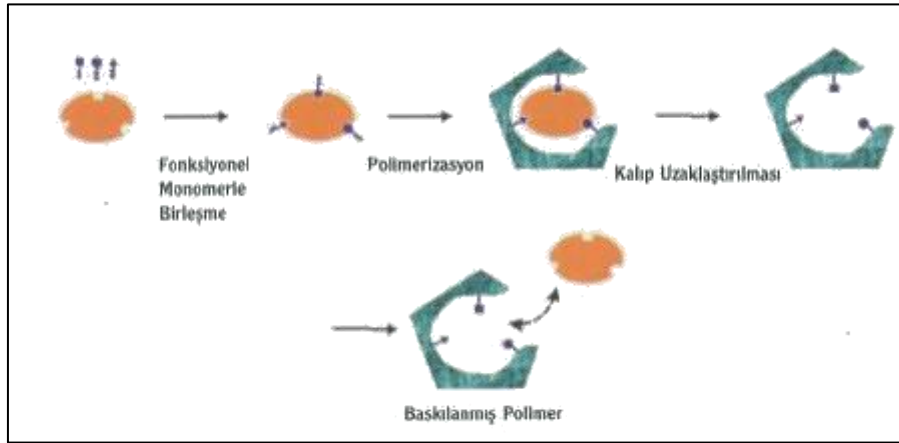


Şekil 2.11. Kovalent olmayan baskılama örneği [111]

2.4.3. Moleküler baskılı polimerlerin bazı uygulama alanları

Moleküler baskılama, antijen antikor, enzim substrat gibi anahtar kilit ilişkisi olan doğal seçici özellikteki mekanizmaların, polimerik yapılara aktarılması amacıyla elde edilmiş bir yöntemdir. Bu yöntemle, iyonların ve çeşitli yapılardaki moleküllerin farklı matrislerden ayrılması ve moleküler baskılanmış polimerlerin çok geniş bir uygulama alanında kullanılması mümkün olmuştur [112]. Moleküler baskılama işlemi, genelde kovalent ve non-kovalent etkileşimlerin kullanılmasıyla, karakteristik boşluk oluşturulmak istenen molekül veya iyonun, polimer yapısında kullanılan moleküllerin fonksiyonel gruplarına uygun olarak bağlanması temeline dayanır. Baskılama sonrasında baskılanan molekül yapıdan uzaklaştırılarak o moleküle özgü bağlanma noktaları elde edilmiş olur [113]. Bu oluşturulan karakteristik bağlanma noktaları sayesinde hazırlanan baskılanmış polimer hedef yapıya oldukça yüksek derecede seçicidir. Bu yöntemle ligand işlevi sağlayan, yapay spesifik

boşluklar üretilir. Bu polimerler ısı ve basınca dirençli, fiziksel olarak sağlam, düşük maliyetli ve yüksek seçiciliğe sahip olmakla beraber, asidik/bazik çözücüler, metal iyonları ve organik çözücüler gibi ortamlarda da son derece kararlı olmaları nedeniyle oldukça geniş bir kullanım alanı sağlamaktadırlar. Performansları bozulmadan birkaç yıl saklanabilirler [114]. Moleküler baskılanmış polimerler ayırma işlemlerinde destek malzemesi olarak kullanıldığı gibi, yapay biyoreseptör ve biyosensörler olarak da kullanılmaktadır [115].



Şekil 2.12. Moleküler baskılanmış polimerlere ait sentez süreci

Moleküler baskılı polimerler afinite ayırmalarının yanında, kendine özgü özelliklerinden dolayı, katı faz ekstraksiyonları, ilaç salımı ve biyosensörler gibi birçok farklı uygulamalarda kullanılmaktadır [116]. Bu malzemeler, seçici tanıma özellikleri sayesinde kromatografik ayırma yöntemleri için de oldukça uygun materyallerdir. Son dönemlerde bazı ilaçların enantiyomerlerinden ayrılmasında sıklıkla kullanılmaktadırlar [117]. Moleküler baskılı polimerler ticari kolonlara nazaran daha avantajlı kolon dolgu maddeleridir. Bunun nedeni hedeflenen moleküle karşı seçici davranışlarıdır. Ayrıca doğal antikorlara benzeyen yapay taklitçileri olarak kullanılabilirler [118]. Moleküler baskılı polimerler, HPLC yöntemi ile aminoasitler ve ilaçlar gibi rasemik karışımların enantiyometrik olarak ayrılmasında kolon dolgu malzemesi olarak kullanılabilirler [119]. Kempe ve Mosbach'ın yaptığı çalışmada, sıvı kromatografisi yönteminde sabit faz olarak aminoasit türevlerini ayırt etmekte kullanılmak üzere moleküler baskılı polimerler kullanılmıştır [120]. Moleküler baskılı polimerlerin en önemli uygulama alanlarından bir diğeri de katı faz ekstraksiyonudur. Moleküler baskılı polimerler, katı faz ekstraksiyonu uygulamalarında adsorplanan molekülün uzaklaştırılmasındaki zorluklar olmaksızın uygulanabilmektedir. Yapılan bir çalışmada nikotinamid molekülleri baskılanarak hazırlanan polimer materyal, katı faz

ekstraksiyonu işlemi için adsorban malzeme olarak kullanılmıştır [121]. Moleküler baskılı polimerlerin katı faz ekstraksiyonu işlemlerinde ilk kullanımı Sellergren tarafından yapılan çalışmada pentamidin'in seçiciliği için gerçekleştirilmiştir.

Başka bir çalışmada ise HPLC ile doğal flavoid antioksidanların analizinde kullanılmak üzere antioksidan baskılanmış polimer ile hazırlanmış katı faz ekstraksiyon kolonu kullanılarak analizinde başarılı sonuçlar elde edilmiştir [122]. Saraji ve Yusefi'nin yapmış olduğu çalışmada Nikel baskılı polimerler hazırlanmış, adsorban olarak kullanılarak sulu çözelti içerisindeki Nikel iyonlarının ayrılması başarılı bir şekilde sağlanmıştır [123].

Analitik kimya alanında, moleküler baskılı polimerlerin kullanımı ile hazırlanan sensörlere ait çalışmaların sayısı son yıllarda giderek artmaktadır. Moleküler baskılanmış polimerler, kararlı yapıları, su ve organik çözücülerde kullanılabilmesi, düşük derişimlerde dahi yüksek seçicilik özelliklerine sahip olması gibi nedenlerden dolayı yapay sensörlerde sıklıkla kullanılmaktadır. Peng ve arkadaşları, atropin molekülünün tanınması için QCM-MIP (Kuvars Kristal Mikrobals) sensörü geliştirerek insan serum ve idrarında atropin tespitinde başarı ile kullanmıştır [124]. Tan ve arkadaşları ise polimer kaplı sensörler hazırlamış ve parasetamol ve nikotin miktarının insan kanı ve idrarında tayini için kullanarak başarılı sonuçlar elde etmiştir [125]. Turan ve Şahin tarafından 2016 yılında yayınlanan bir çalışmada, PEG temelli biyo uyumlu oligo(etilenglikol) monometil eter metakrilat monomeri kullanılarak yüzeyde başlatılan atom transfer radikal polimerizasyonu ile okratoksin A baskılanmış ve baskılanmamış manyetik nanoparçacıklar hazırlanmıştır. Başlangıç derişimi, adsorpsiyon kapasitesi ve adsorpsiyon hızı incelenmiş ve 30 dakika gibi çok kısa bir sürede baskılama molekülü olan toksinin hızla geri bağlandığı sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca hedef molekül ile kirletilmiş üzüm suyu örneklerinden moleküler baskılanmış manyetik nanoparçacıkların geri kazanımlarının % 97,4 olduğu belirlenmiştir. Hazırlanan baskılanmış manyetik nano parçacıkların 12 adsorpsiyon - desorpsiyon döngüsü neticesinde hala dayanıklılıklarını korudukları sonucuna ulaşılmıştır [126]. Rahma A.G. Abou-Hany ve arkadaşları tarafından 2015 yılında yayınlanan bir çalışmada *Alternaria* mantarları tarafından üretilen bir fenolik mikotoksin olan alternariolün (AOH) seçici bağlanması amacıyla 4 farklı sahte(dummy) molekül vasıtasıyla baskılanarak moleküler baskılanmış gözenekli polimer mikroküreler hazırlandı. Mikotoksinin seçici ayrılması için domates örnekleri ile yapılan çalışmalarda 4 farklı dummy ile baskılanarak hazırlanan bu polimerler, % 81–103 aralığında geri kazanım seviyelerinin elde edilmesini sağlamıştır

[127]. Xiao-Qi Mei ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada taklit şablon molekül olarak guanozin kullanılarak hazırlanan moleküler baskılı polimerin, gonyautoksin 1,4 (GTX 1,4)'e karşı seçiciliği deniz suyu örneklerinde incelenmiş ve % 88 seviyelerinde geri kazanım seviyeleri elde edilmiştir [128]. Mónica Díaz-Bao ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, taklit (dummy) şablon kullanılarak manyetik moleküler baskılı karıştırma çubukları hazırlanmıştır. Hazırlanan bu polimerler gıdalarda bulunabilecek beş farklı aflatoksinin izole edilmesi için uygulanmıştır. Süt tozu bazlı bebek mamasında AfM1'in, tahıl bazlı bebek mamasında ise AfB1, AfB2, AfG1 ve AfG2'nin izole edilmesi için uygulandığında bu moleküller için sırasıyla % 60, 43, 40, 44, 39 geri kazanım verimleri elde edilmiştir [129].

3. DENEYSEL KISIM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmalarda manyetik nanoparçacıkların sentezinde kullanılan demir(II) klorür tetrahidrat ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, %99,99), demir (III) klorür heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\geq$ %99,0) ve sodyum hidroksit (NaOH , $\geq$ %99,99) Sigma Aldrich firmasından temin edilmiştir. Çözme ve desorpsiyon işlemlerinde kullanılan mutlak etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ susuz, $\geq$ %99,5), asetik asit ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$, $\geq$ %99,7), metanol (CH_3OH , $\geq$ %99,9), aseton (CH_3COCH_3 , $\geq$ %99,9) ve asetonitril (CH_3CN , $\geq$ 99,8) Sigma Aldrich firmasından temin edilmiştir. Manyetik nanoparçacıkların fonksiyonelleştirilmesinde Sigma Aldrich marka viniltrimetoksisilan (VTMS, $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}_3\text{Si}$, $\geq$ %98,0) kullanılmıştır. Polimerizasyon işlemi için kullanılan etilenglikoldimetakrilat (EGDMA, $\geq$ %98,0), 2-hidroksietil metakrilat (HEMA, $\geq$ %97,0), amonyum persülfat ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, $\geq$ %98,0) ve *N,N,N',N'*-tetrametiletilediamin ($(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $\geq$ %99,0) kimyasalları Sigma Aldrich firmasından temin edilmiştir. Moleküler baskılama işlemi ve adsorpsiyon çalışmaları için kullanılan aflatoxin M1 (AfM1, $\geq$ %99,0) ve aflatoxin B1 (AfB1, $\geq$ %99,0), Fermentek firmasından temin edilmiştir. Gerçekleştirilen bütün işlemlerde yüksek saflıkta kimyasal maddeler kullanılmış, hiçbir saflaştırma işlemi uygulanmamıştır. Sulu ortam çalışmalarının tamamında deiyonize su kullanılmıştır. Gerçek örnek çalışmalarında ise çeşitli marketlerden alınan çeşitli markalardaki süt örnekleri kullanılmıştır.

3.2. Manyetik Nanoparçacıkların Sentezlenmesi

50 mL 2,0M Fe^{2+} ve 1,0M Fe^{3+} içeren çözelti, $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 'ın ultra saf su içerisinde çözülerek hazırlandı. Manyetik nanoparçacıklar, manyetik karıştırıcılı ısıtıcı düzeneği üzerinde sıcaklık 50 °C'a ayarlanarak, akış hızı 50 mL/min olan $\text{N}_2(\text{g})$ atmosferinde, bir büret vasıtasıyla 2-3 mL/min akış hızında 1,5 M NaOH çözeltisinin Fe^{2+} ve Fe^{3+} iyonlarını içeren çözeltiye eklenmesiyle ve çözeltinin manyetik balık vasıtasıyla 1500 devir/min hızla karıştırılmasıyla sentezlendi. Sentez düzeneğinde siyah renkli manyetik nanoparçacıkların birkaç dakika içinde oluşmaya başladığı gözlemlendi. Manyetik nanoparçacıklar, sentezlenmesinden sonra sırasıyla ultra saf su ve mutlak etanol ile, 3'er defa "yıkama-manyetik alan uygulayarak toplama" süreci uygulanarak yıkandılar ve daha

sonra mutlak etanol içerisinde yeniden dağıtıldılar. Ardından manyetik nanoparçacıklar 45 °C vakum etüvünde 24 saat süreyle kurutuldu [99].

3.2.1. VTMS fonksiyonel manyetik nanoparçacıkların sentezlenmesi

Manyetik nanoparçacıkların yüzeyinde polimerizasyonun yürütülebilmesi için VTMS ile fonksiyonelleştirilmiştir. Bu işlem için alınan 1,0 g manyetik nanoparçacık 20,0 mL mutlak etanol içerisinde sonik banyo ile dağıtıldı ve üzerine 1,0 mL VTMS damla damla eklenerek manyetik karıştırıcı ile 24 saat boyunca karıştırılarak VTMS'in nanoparçacıklara bağlanması sağlandı. Tepkime sonunda VTMS fonksiyonel manyetik nanoparçacıklar (VTMS-MNP) mıknatıs ile balon çeperinde toplanarak çözücünden ayrıldıktan sonra aseton ile yıkama işlemi yapıldı ve ardından vakum etüvde kurutuldu [99].

3.2.2. Aflatoksin M1 baskılanmış manyetik nanoparçacıkların sentezlenmesi

Baskılanmış manyetik nanoparçacıkların sentezi için, aflatoksin M1 (AfM1) baskılama molekülü, 2-hidroksietilmetakrilat (HEMA) fonksiyonel monomer, etilenglikoldimetakrilat (EGDMA) çapraz bağlayıcı, amonyum persülfat (APS) başlatıcı, *N,N,N',N'*-tetrametiletildiamin (TEMED) hızlandırıcı ve VTMS fonksiyonel manyetik nanoparçacıklar (VTMS-MNP) ise çekirdek olarak kullanıldı. Polimerizasyon, VTMS-fonksiyonel manyetik nanoparçacıkların yüzeyinde yürütüldü. Bu işlem için, HEMA (1,0 mL), EGDMA (0,1 mL), AfM1 (0,1 mg) ve 20,0 mL mutlak etanol 3 boyunlu 50 mL'lik balon içerisinde karıştırılarak 30 dakika boyunca azot atmosferine maruz bırakıldı ve iyice karışması sağlandı. Ardından bu karışıma 1 g VTMS-MNP eklenerek dağılması sağlandı. Son olarak APS (0,05g) ve TEMED (0,1mL) ilave edilerek polimerleşme başlatılarak karıştırma işlemi yapıldı. 60 dakika boyunca gerçekleştirilen polimerizasyon işleminin ardından nanoparçacıklar mıknatıs yardımıyla toplanarak mutlak etanol ile yıkandı. Ardından aseton ile 120 dakika boyunca muamele edilerek molekülünün yapıdan uzaklaşması sağlandı. Sonuç olarak AfM1 baskılanmış manyetik nanoparçacıklar elde edilmiş oldu. Hazırlanan baskılanmış manyetik nanoparçacıklar (MIP-MNP) mutlak etanol ile 3 kez yıkandı ve ardından sonra vakum etüvünde kurutuldu [99].

Adsorpsiyon çalışmalarında karşılaştırma amacıyla kullanılacak olan baskılanmamış manyetik nanoparçacıklar (NIP-MNP) de aynı yöntem kullanılarak, ortamda baskılama molekülü olmaksızın gerçekleştirilen işlemler sonucunda hazırlandı.

3.3. Baskılanmış Manyetik Nanoparçacıkların Aflatoksin M1 Uygulamaları

3.3.1. Aflatoksin M1 baskılanmış manyetik nanoparçacıkların adsorpsiyon süresi çalışmaları

15,0 mg MIP-MNP 5,0 mL 50,0 ng/mL başlangıç derişimine sahip AfM1 çözeltisinde dağıtıldıktan sonra 45 dakika boyunca oda sıcaklığında çalkalanarak her 5 dakikada bir çözeltinin derişimi belirlendi.

Derişimlerin belirlenmesi işlemi için çözeltilerin floresans şiddetleri floresans spektrofotometresi ile ölçüldü ve AfM1 derişimleri Lambert-Beer Kanunu'ndan yararlanıldı.

3.3.2. Aflatoksin M1 baskılanmış manyetik nanoparçacıkların desorpsiyon çözeltisinin belirlenmesi

Adsorpsiyon işlemlerinde kullanılmış olan MIP-MNP kurutulduktan sonra her 15,0 mg MIP-MNP ayrı ayrı 5,0'er mL aseton, asetonitril, mutlak etanol, metanol, metanol:asetik asit (9:1, v/v), su, su:metanol (1:1, v/v) içerisine alınarak 120 dakika boyunca oda sıcaklığında çalkalanarak derişimleri belirlendi.

Derişimlerin belirlenmesi işlemi için çözeltilerin floresans şiddetleri floresans spektrofotometresi ile ölçüldü ve AfM1 derişimleri Lambert-Beer Kanunu'ndan yararlanıldı.

3.3.3. Aflatoksin M1 baskılanmış manyetik nanoparçacıkların desorpsiyon süresi çalışmaları

Adsorpsiyon işlemlerinde kullanılmış olan MIP-MNP kurutulduktan sonra 15,0 mg MIP-MNP 5,0 mL aseton içerisine alınarak 180 dakika çalkalama zamanı boyunca oda sıcaklığında çalkalanarak her 15 dakikada bir çözeltinin derişimi tayin edildi.

AfM1 derişimlerinin belirlenmesi işlemi için çözeltilerin floresans şiddetleri floresans spektrofotometresi ile ölçüldü ve Lambert-Beer Kanunu'ndan yararlanıldı.

3.3.4. Aflatoksin M1 baskılanmış manyetik nanoparçacıkların adsorpsiyon çalışmaları

15,0 mg MIP-MNP (ya da karşılaştırma materyali NIP-MNP) farklı derişim ve hacimlerdeki AfM1 çözeltilerinde dağıtıldıktan sonra 15 dakika boyunca oda koşullarında çalkalandı. Daha sonra nanoparçacıklar mıknatıs yardımıyla toplandı ve aseton ile 120 dakika boyunca yıkanarak baskılama molekülünün yapıdan uzaklaşması sağlandı. Eluentin floresans şiddeti floresans spektrofotometresi kullanılarak ölçüldü ve AfM1 moleküllerine özgü boşluklar tarafından adsorplanan AfM1 miktarı (ve ya NIP-MNP yüzeylerinde adsorplanan) Lambert-Beer Kanunu'ndan yararlanılarak belirlendi.

3.3.5. Aflatoksin M1 baskılanmış manyetik nanoparçacıkların süt örneklerine uygulanması

60,0 mL'lik süt örnekleri içerisine 0,0; 25,0; 50,0; 100,0; 250,0 ng/mL derişimlerde olacak şekilde AfM1 veya AfB1 ilave edilerek çalkalandı. Bu işlemin ardından süt örnekleri 4000 devir/min değerinde 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası ayrılan yağ tabakası atıldı. Yağı uzaklaştırılmış olan süt örneği wattman no. 4 süzgeç kağıdı ile süzülerek 50,0 mL örnek alındı [12]. 15,0 mg MIP-MNP (ya da karşılaştırma materyali NIP-MNP) farklı derişimlerde AfM1 veya AfB1 içeren süt örneklerinde dağıtıldıktan sonra 15 dakika boyunca oda koşullarında çalkalandı. Daha sonra nanoparçacıklar mıknatıs yardımıyla toplandı ve aseton ile 120 dakika boyunca yıkanarak baskılama molekülünün yapıdan uzaklaşması sağlandı. Eluentin floresans şiddeti floresans spektrofotometresi kullanılarak ölçüldü ve AfM1 moleküllerine özgü boşluklar tarafından adsorplanan AfM1 miktarı (ve ya NIP-MNP yüzeylerinde adsorplanan) Lambert-Beer Kanunu'ndan yararlanılarak belirlendi.

3.3.6. Aflatoksin M1 baskılanmış manyetik nanoparçacıkların adsorpsiyon kapasitesinin belirlenmesi

AfM1 in denge derişimine karşı MIP ve NIP gramı başına adsorplanan AfM1 miktarı grafiğe geçirilerek Langmuir adsorpsiyon grafiği elde edildi. Aşağıda verilen doğrusallaştırılmış Langmuir eşitliği doğrultusunda C_E 'ye karşı C_E/Q_E grafiği çizildi. Bu grafikten, doğrunun

eğim ve kesim noktasından yararlanılarak Q_0 ve b Langmuir sabitleri hesaplandı. Doğrusallaştırılmış Langmuir izotermi için bağıntı aşağıda verilmiştir:

$$\frac{C_E}{Q_E} = \frac{C_E}{Q_0} + \frac{1}{Q_0 b}$$

Şekil 3.1. Doğrusallaştırılmış Langmuir izotermine ait bağıntı

Burada;

C_E : Dengedeki AfM1 derişimi (ng/mL),

Q_E : Dengede MIP ve NIP'in gramı başına adsorbe ettiği AfM1 miktarı (µg/g),

b : Langmuir sabiti (L/mg),

Q_0 : Kapasite parametresi (adsorpsiyon kapasitesi) (mg/g)

dir.

3.4. Kullanılan Cihazlar

3.4.1. Geçirimli elektron mikroskobu (TEM)

TEM görüntülerinin elde edilmesinde JEOL marka JEM 2100F STEM cihazı kullanıldı. Manyetik nanoparçacıklar 10,0 µL etanol içerisinde dağıtıldı. Daha sonra bu etanol karbon kaplı bakır plakanın üzerine damlatılarak çözücünün uzaklaşması için beklendi ve nanoparçacıkların yüzeyde toplanması sağlanarak TEM görüntüleri çekildi.

3.4.2. Titreşen örnek magnetometresi (VSM)

Nanotaneciklerin manyetik duyarlılığı hakkında bilgi sahibi olabilmek için dışarıdan bir manyetik alan uygulanması sonucu o maddenin verdiği tepkiyi gösteren Cryogenic Limited PPMS marka magnetometre kullanılmıştır.

3.4.3. Dinamik ışık saçılımı (DLS)

Çözelti içerisine gönderilen ışığın saçılması sonucunda taneciklerin yapısının belirlenmesini sağlayan ve seyreltik olarak hazırlanan örnekte dinamik boyut dağılımını veren DLS analizleri için Malvern Zetasizer Nano ZS marka DLS cihazı kullanıldı.

3.4.4. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR)

Fourier dönüşümü yöntemi kızılötesi ışınların örnek üzerine gönderilmesi ve buna karşın ışığın infrared yoğunluğuna karşı dalga sayısını ölçen bir kimyasal analitik yöntemdir. Yapılan analizler Thermo Scientific marka ID5 başlığı kullanılarak yapılmıştır.

3.4.5. Spektroflorimetre

Moleküller, gönderilen belirli dalga boyundaki ışın vasıtasıyla üst enerji seviyelerine uyarılması ve ardından temel hale dönmek için daha uzun yani daha düşük enerjilerde emsiyon yapmasına floresans denir. Adsorplanan ve emisyon yapılan fotonlar arasındaki enerji farkı moleküler titreşimler ya da ısı olarak ortaya çıkar. Bu emisyon sonucu elde edilen floresans ışınlarının şiddetinin derişime karşı olan ilişkisi analitik ölçümlerde kullanılan bir yöntemdir. Yapılan ölçümlerde Agilent marka Cary Eclipse spektroflorimetre cihazı kullanılmıştır.

3.4.6. Orbital çalkalayıcı

Adsorpsiyon ve desorpsiyon işlemleri için Daihan marka SHO 2D orbital çalkalayıcı kullanıldı.

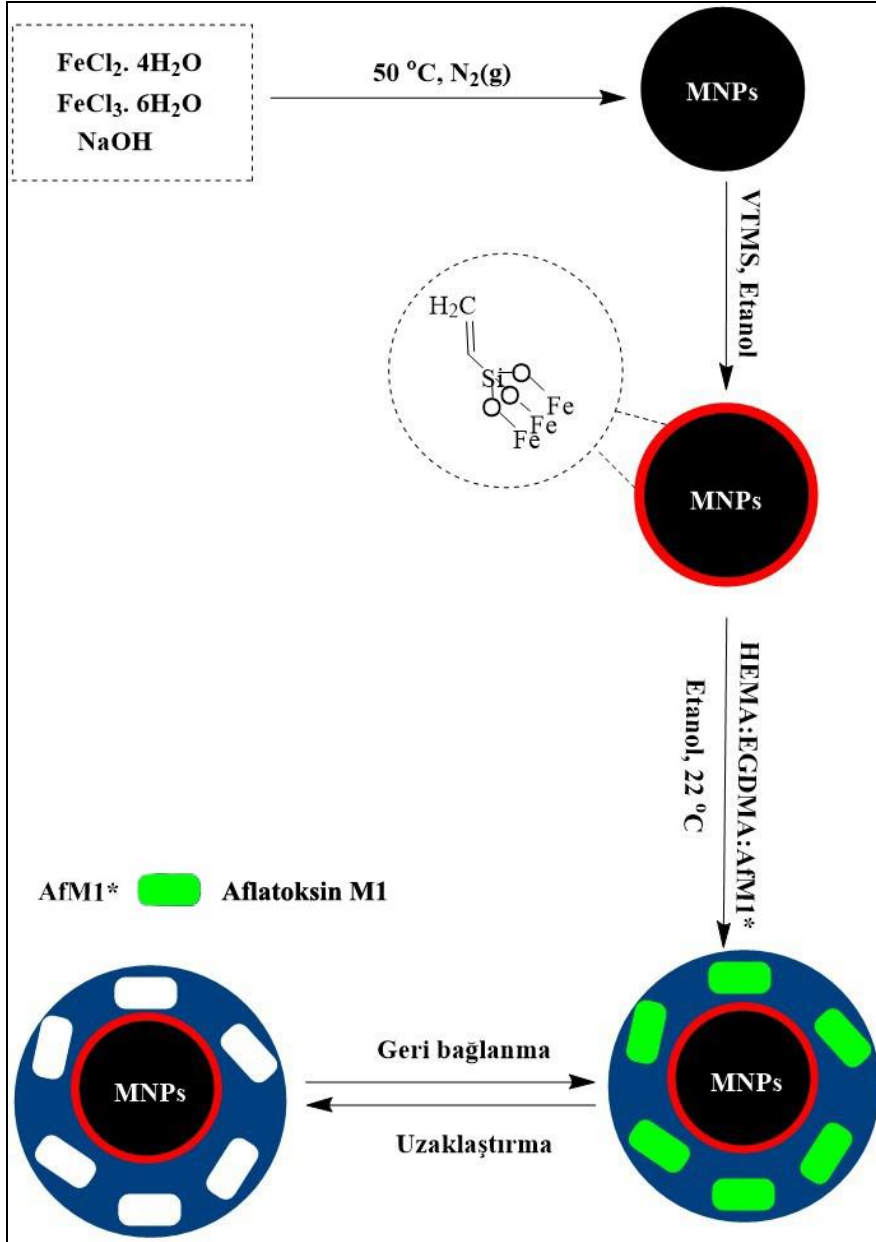
3.4.7. Isıtıcıli manyetik karıştırıcı

Manyetik nanoparçacıkların (MNP) ve moleküler baskılanmış manyetik nanoparçacıkların (MIP-MNP) sentezlenmesinde ISOLAB marka ısıtıcıli manyetik karıştırıcı kullanıldı.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

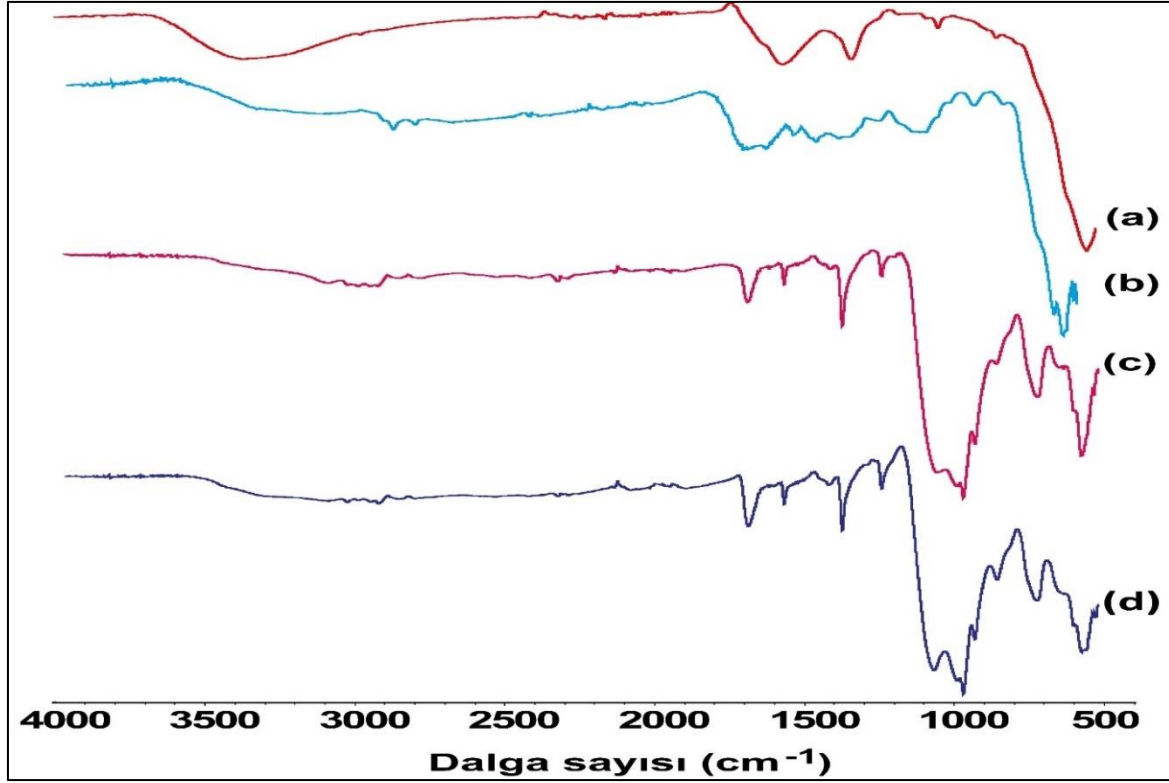
4.1. Baskılanmış Manyetik Nanoparçacıkların Hazırlanması ve Adsorpsiyon Çalışmaları

AfM1 baskılı manyetik nanoparçacıklar Şekil 4.1’de gösterildiği gibi yüzeyde başlatılan polimerizasyon ile sentezlendi. HEMA fonksiyonel monomer, EGDMA çapraz bağlayıcı, APS başlatıcı, VTMS-fonksiyonel manyetik nanoparçacıklar çekirdek ve AfM1 baskılama molekülü olarak kullanıldı. İlk olarak, manyetik nanoparçacıkların yüzeyi VTMS ile fonksiyonelleştirildi. Ardından HEMA ve EGDMA etanol içerisinde karıştırılarak VTMS-fonksiyonel manyetik nanoparçacıklar ilave edildi. Son olarak çözeltiye AfM1 eklenerek iyice karışması sağlanarak ortama APS eklendi ve polimerizasyon başlatıldı. 60 dakika süren polimerizasyon sonucunda AfM1 baskılanmış polimer tabakası ile kaplı manyetik nanoparçacıklar elde edilmiş oldu. Ardından bu nanoparçacıklar, aseton içerisine alınarak kalıp molekül olan AfM1’in yapıdan uzaklaştırılması sağlandı ve böylece moleküle özgü boşlukları bulunan baskılanmış manyetik nanoparçacıklar elde edilmiş oldu (Şekil 4.1.). Aynı yöntemle ortama AfM1 ilavesi yapılmadan NIP-MNP’ler sentezlendi.



Şekil 4.1. Baskılanmış manyetik nanoparçacıkların sentezlenmesi

Hazırlanan tüm nanoparçacıkların karakterizasyon işlemleri FTIR, TEM, DLS ve VSM analizleri ile gerçekleştirildi.



Şekil 4.2. (a) MNPs, (b) VTMS-MNPs, (c) NIP-MNPs (d) MIP-MNPs FTIR spektrumları

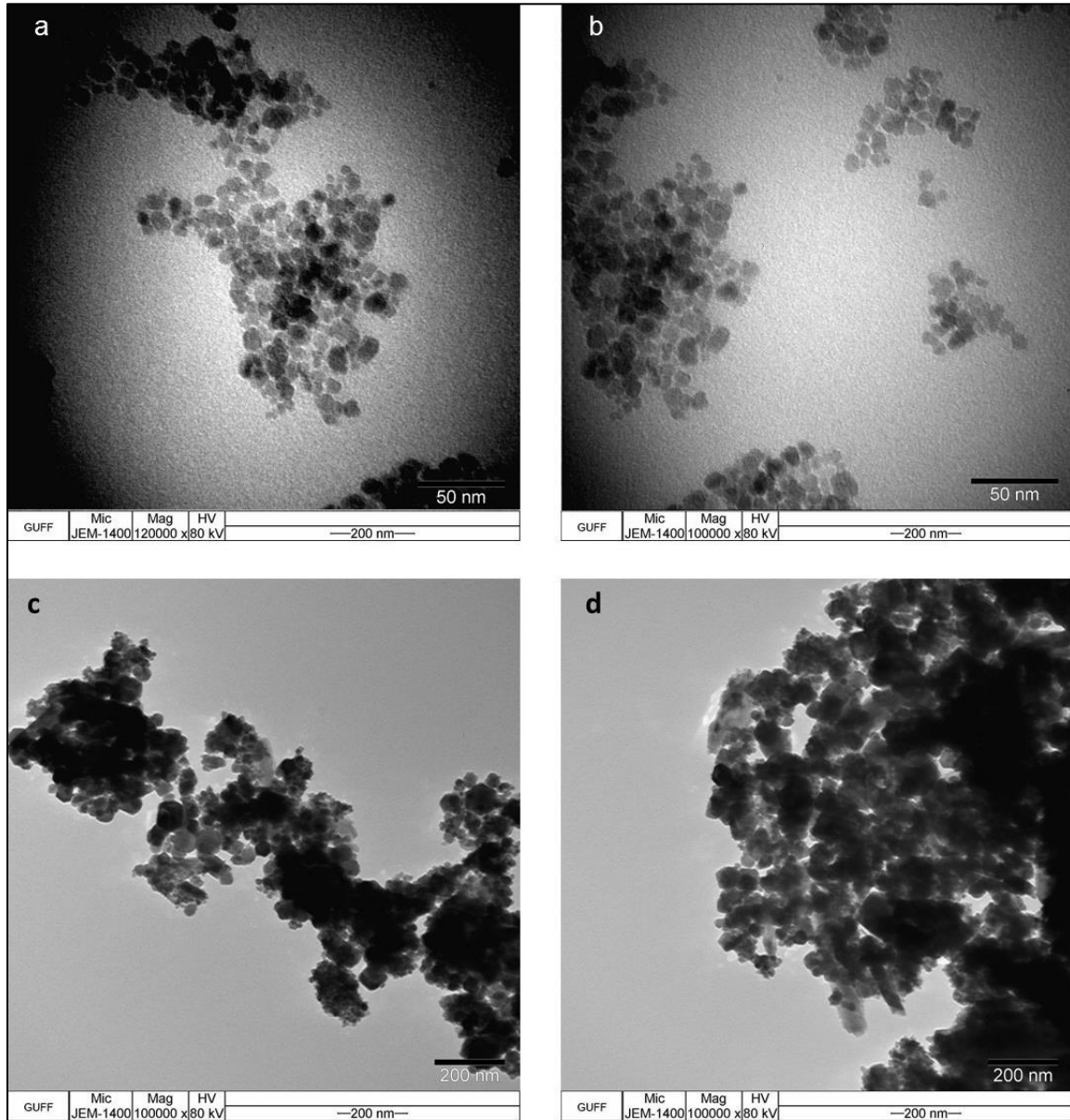
Şekil 4.2.a incelendiğinde MNP'lere ait olan spektrumda $3000-3500\text{ cm}^{-1}$ arasında O-H gerilme bandı görülmektedir.

VTMS-MNP'lere ait olan Şekil 4.2.b incelendiğinde O-H gerilme bandının kaybolduğu ve $3000-3100\text{ cm}^{-1}$ aralığında =C-H gerilme bandı zayıf olsa da görülmektedir. $1500-1700\text{ cm}^{-1}$ aralığında C=C fonksiyonel grubundan dolayı gerilme bandı görülmektedir. Bu bize VTMS modifiyesinin gerçekleştiğini göstermektedir.

NIP-MNP'lere ait olan Şekil 4.2.c incelendiğinde çapraz bağlayıcı ve fonksiyonel monomer nedeniyle $1000-1200\text{ cm}^{-1}$ aralığında C-O bağ gerilmesi görülmektedir. Bu yüzeyin polimer tabakası ile kaplandığını göstermektedir.

MIP-MNP'lere ait olan Şekil 4.2.d incelendiğinde de aynı şekilde çapraz bağlayıcı ve fonksiyonel monomer nedeniyle $1000-1200\text{ cm}^{-1}$ aralığında C-O bağ gerilmesi görülmektedir. Bu yüzeyin polimer tabakası ile kaplandığını göstermektedir.

Hazırlanan bütün nanoparçacıkların TEM görüntüleri Şekil 4.3'te verildiği gibidir.



Şekil 4.3. (a) MNP, (b) VTMS-MNP, (c) NIP ve (d) MIP nanoparçacıklara ait TEM görüntüleri

TEM görüntüleri incelendiğinde MNP ve VTMS-MNP'lerin (Şekil 4.3.a ve 4.3.b) çeşitli boyularda olduğu görülmektedir. TEM görüntülemesinde MNP ve VTMS-MNP'lerin ortalama çaplarının 30 nm olduğu tespit edilmiştir. NIP ve MIP manyetik nanoparçacıklara ait TEM görüntüleri incelendiğinde ise (Şekil 4.3.c ve 4.3.d), nanoparçacıkların yüzeylerinin polimer tabakası ile kaplanmış olduğu ve yığın oluşturma eğilimi gösterdikleri gözlenmiştir.

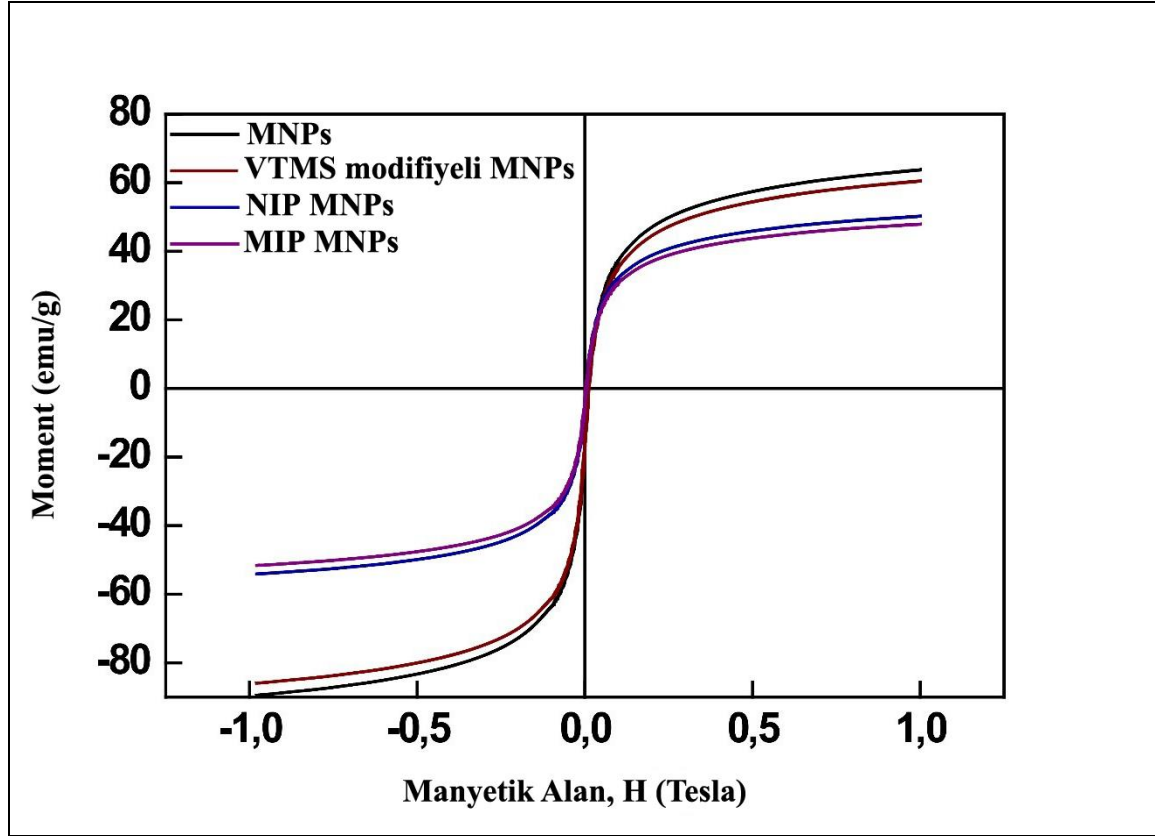
NIP ve MIP 'lere ait TEM görüntülemesinde ise ortalama $\text{\AA}$ apların 55 nm olduğu tespit edilmiştir.

MNP, VTMS-MNP, NIP ve MIP manyetik nanoparçacıkların karakterizasyonunda elde edilen dinamik ışık saçılımı (DLS) verileri Çizelge 4.1.'de özetlendi.

Çizelge 4.1. MNP, VTMS-MNP, NIP ve MIP manyetik nanoparçacıkların hidrodinamik $\text{\AA}$ apları ve dispersite özellikleri

Nanoparçacık	Hidrodinamik $\text{\AA}$ ap(nm)	PDI
MNP	35	0,201
VTMS-MNP	38	0,203
NIP	99	0,275
MIP	91	0,258

DLS ile ölçülen ortalama hidrodinamik $\text{\AA}$ apların TEM ile ölçülen ortalama $\text{\AA}$ aplardan daha büyük olduğu tespit edilmiştir. Bunun sebebi taneciklerin hidrofilik olması ve çözelti içerisinde olmaları sebebiyle yüzeylerinde su tabakası oluşmasıdır. VTMS-MNP'lerin ortalama $\text{\AA}$ aplarının TEM görüntülerinden farklı olarak yaklaşık 38 nm (PDI = 0,203) olarak belirlenmesi, küçük bir molekül olan VTMS molekülünün düşük elektron geçirgenliğine sahip olmasından ve bu sebeple TEM ile görüntülenememesinden kaynaklanmaktadır. NIP ve MIP'lerin ise ortalama hidrodinamik $\text{\AA}$ apları sırasıyla 99 ve 91 nm olarak belirlenmiştir. Bu boyutların TEM ile ölçülen ortalama $\text{\AA}$ ap değerlerinden çok daha büyük olması, manyetik nanoparçacıkların yüzeylerinin polimer tabakası ile kaplandığını, bu polimer tabakanın ise suda şişme eğiliminde olduğunun göstergesidir. MNP, VTMS-MNP, NIP ve MIP türlerinin tamamı için sulu çözelti içerisinde yüksek homojeniteye sahip oldukları sonucu PDI değerlerinden açıkça anlaşılmaktadır [126].



Şekil 4.4. MNP, VTMS-MNP, NIP ve MIP nanoparçacıkların manyetizasyon eğrileri

MNP, VTMS-MNP, NIP ve MIP nanoparçacıklardan hiçbiri histerezis göstermemektedir ve süperparamanyetik özelliktedirler. MNP, VTMS-MNP, NIP ve MIP nanoparçacıkların doygunluk mıknatıslanma özellikleri ölçülmüş ve sırasıyla 63,7; 60,5; 50,2 ve 47,9 emu g^{-1} değerleri elde edilmiştir. Buradan anlaşıldığı üzere MNP'lerin VTMS ile modifiye edilmesi ile az da olsa mıknatıslanma değeri düşmüştür. Bu aynı zamanda modifikasyonun gerçekleştiğinin de göstergesidir. Ayrıca NIP ve MIP'lere ait mıknatıslanma değerlerinde ciddi derecede bir düşüş söz konusudur. Bu değerlerden nanoparçacıkların yüzeyinin başarılı bir şekilde polimer tabakası ile kaplandığı anlaşılmaktadır. NIP ve MIP arasındaki küçük fark ise MIP yüzeyinde oluşturulmuş olan karakteristik boşluklar sebebiyle olabilir.

Sonuç olarak, hazırlanan MIP'ler süperparamanyetik özelliktedir ve doygunluk mıknatıslanma değerleri oldukça yüksektir. Bu durum, MIP'lerin çözelti ortamından bir mıknatıs vasıtasıyla kolaylıkla ayrılabilceğini göstermektedir.

4.2. Geri Kazanım Verimine Başlangıç Aflatoksin M1 Derişimi Etkisi

Adsorpsiyon çalışmaları 5,0-50,0 ng/mL derişimlerinde AfM1 çözeltilerinde farklı hacimlerde yürütüldü. Baskılanmış manyetik nanoparçacıklar adsorpsiyon sonrasında 5,0 mL elüsyon çözeltisine alınarak elüsyon işlemleri gerçekleştirilerek % geri kazanım değerleri karşılaştırıldı. Elde edilen verilerle hesaplanan geri kazanım değerleri çizelgelerde gösterildi.

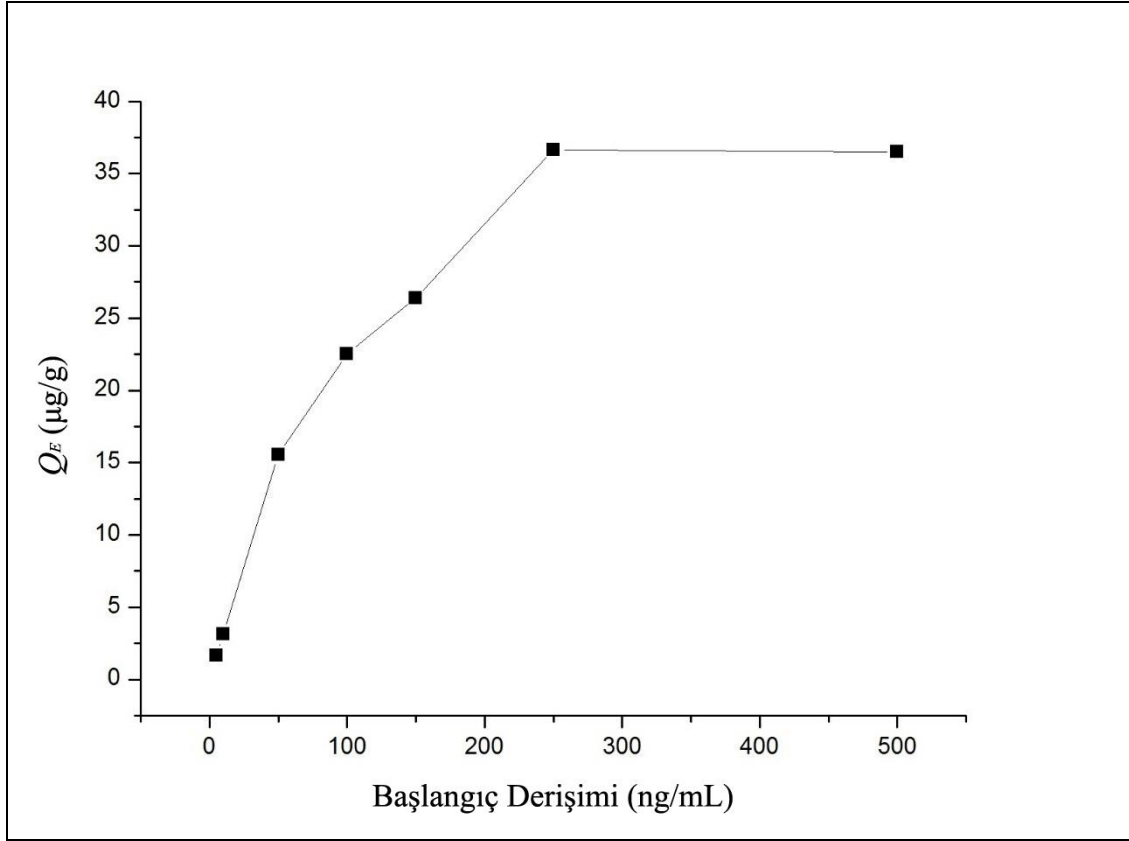
Çizelge 4.2. MIP manyetik nanoparçacıkların adsorpsiyon ve elüsyon sonrası % geri kazanımına başlangıç AfM1 derişimi etkisi

Başlangıç AfM1 Derişimi (ng/mL)	Geri Alma Çözeltisi Derişimi (ng/mL)	% Geri Kazanım Verimi
5 (100mL)	91,6	91,6
10 (50mL)	96,9	96,9
20 (25mL)	97,5	97,5
50 (50mL)	494,3	98,9
50 (5mL)	51,9	103,8

Çizelge 4.3. NIP manyetik nanoparçacıkların adsorpsiyonuna başlangıç AfM1 derişimi etkisi

Başlangıç AfM1 Derişimi (ng/mL)	Adsorpsiyon Sonrası Derişim (ng/mL)	% Adsorpsiyon
5 (100mL)	4,9	2,0
10 (50mL)	9,8	2,0
20 (25mL)	19,8	1,0
50 (50mL)	49,8	0,4
50 (5mL)	48,3	3,4

Belirtilen derişim ve hacimlerde, baskılanmış ve baskılanmamış manyetik nanoparçacıkların AfM1'e karşı adsorpsiyon çalışmaları yapıldı. Baskılanmış manyetik nanoparçacıklarda AfM1'e özgü boşlukların oluşmasından dolayı bu nanoparçacıkların AfM1 adsorpsiyonunun, karşılaştırma materyali olan NIP manyetik nanoparçacıklardan daha yüksek olduğu belirlendi.

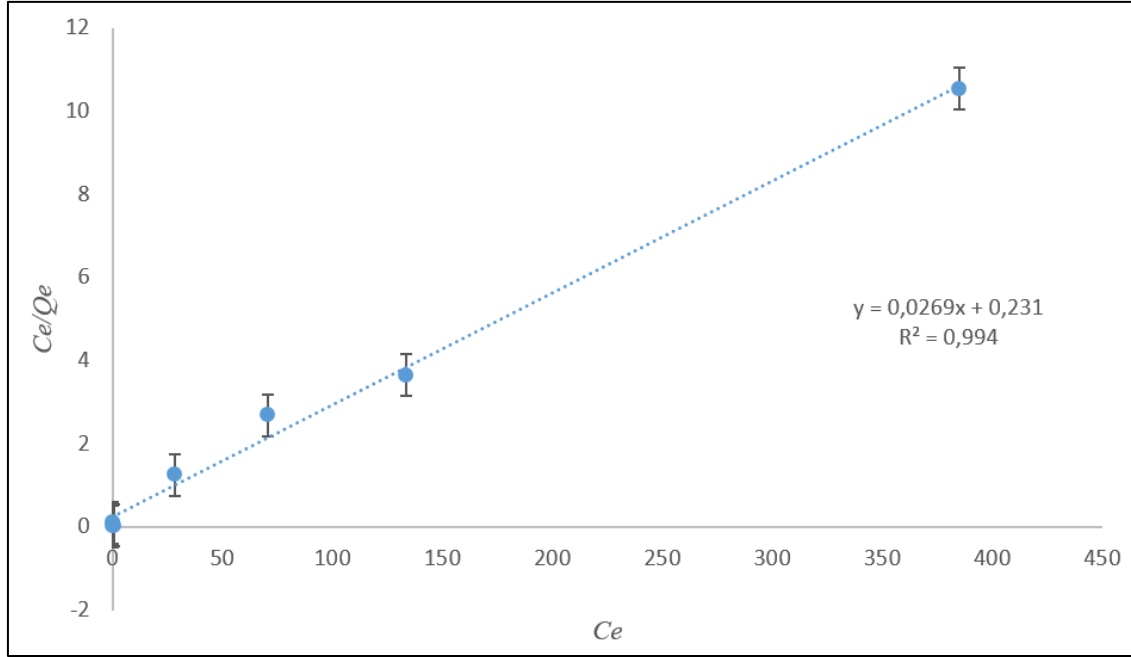


Şekil 4.5. AfM1 başlangıç derişimine karşı Q_E grafiğı

MIP manyetik nanoparçacıkların adsorpsiyon kapasitesinin düşük derişimlerde hızla artmış olduğı gözlenmiş ve derişim $250,0 \text{ ng mL}^{-1}$ olduğunda plato bölgesinin başladığı gözlenmiştir. Bu noktada, adsorpsiyon kapasitesinin (Q_E) $36,66 \text{ µg AfM1/ g MIP-MNP}$ değerine ulaştığı gözlenmiştir. NIP-MNP için de adsorpsiyon kapasitesi değeri ise $0,07 \text{ ng AfM1/ g NIP-MNP}$ olarak belirlenmiştir.

4.3. Adsorpsiyon İzotermi ve Adsorpsiyon Kapasitesi

Adsorpsiyon kapasitesi çalışmaları için $5,0$; $10,0$; $50,0$; $100,0$; $150,0$; $250,0$; $500,0 \text{ ng/mL}$ AfM1 içeren $15,0$ 'er mL örnek çözeltileri içerisine $0,05 \text{ g}$ MIP ilave edilmiş ve elde edilen veriler ile doğrusallaştırılmış Langmuir grafikleri çizilmiştir.



Şekil 4.6. Doğrusallaştırılmış Langmuir eşitliğinin grafiği

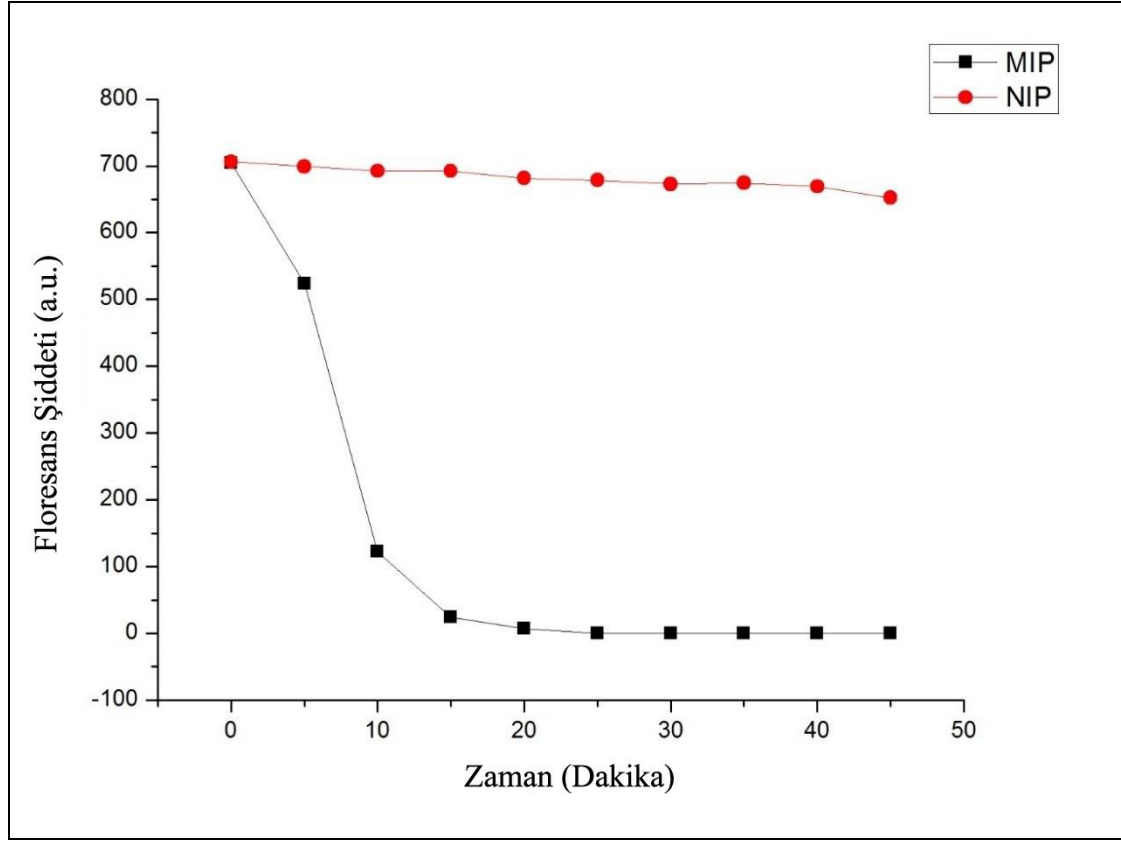
$$Q_0 = 37,2 \mu\text{g/g}$$

$$b = 0,1146 \text{ g/L}$$

Şekil 4.6’da verilen Doğrusallaştırılmış Langmuir grafiğinin eğim ve kesim noktasından yararlanılarak ve Madde 3.3.6’da verilen formül kullanılarak Q_0 ve b Langmuir sabitleri hesaplandı. AfM1’in adsorpsiyon kapasitesine karşılık gelen Q_0 değeri $37,2 \mu\text{g/g}$ olarak hesaplandı. Şekil 4.6 incelendiğinde korelasyon katsayısının 1’e yakın olduğu görülmektedir. Bu durum adsorpsiyonun tek tabakalı olduğunu göstermektedir [130].

4.4. Adsorpsiyon Süresinin Belirlenmesi

Adsorpsiyon süresi çalışmaları $50,0 \text{ ng/mL}$ başlangıç AfM1 derişimi ile 0’dan 45 dakikaya değişen farklı çalkalama zamanlarında gerçekleştirildi ve elde edilen adsorpsiyon süresi eğrileri Şekil 4.7’de gösterildi.

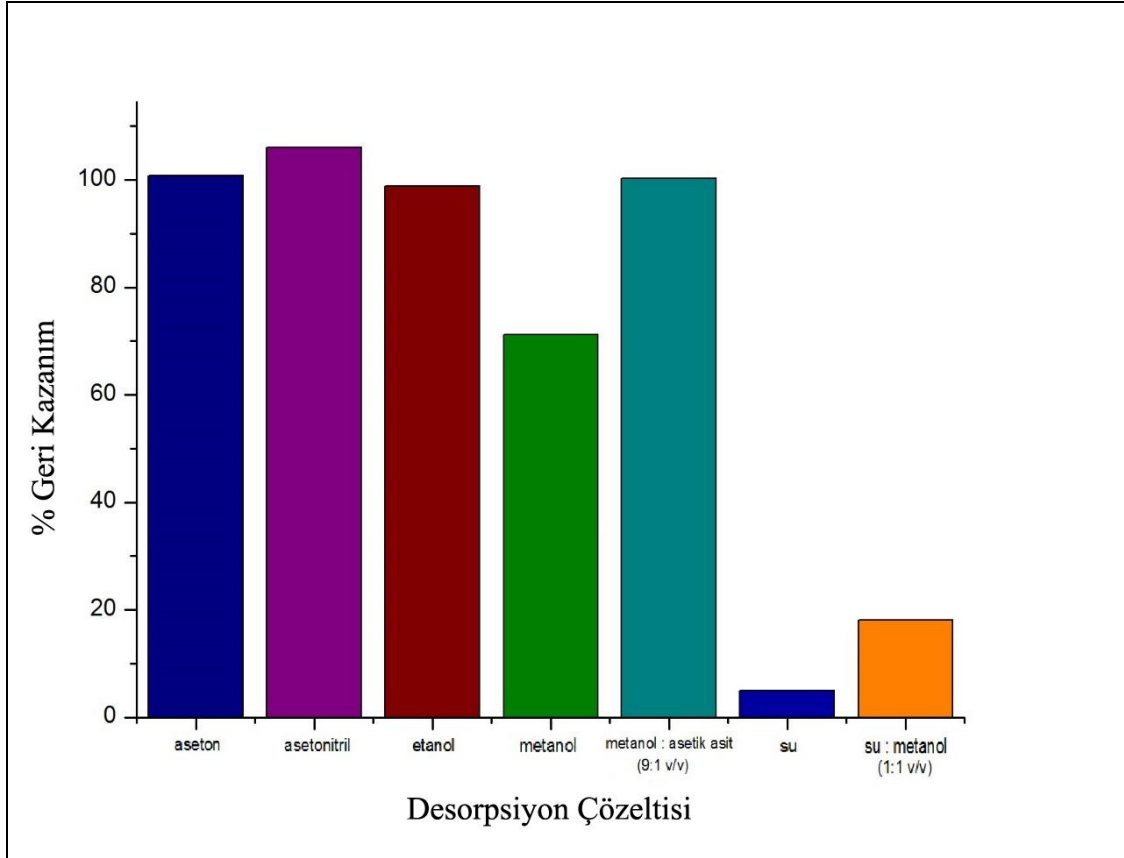


Şekil 4.7. MIP ve NIP manyetik nanoparçacıkların adsorpsiyon süresi

MIP ve NIP manyetik nanoparçacıklara AfM1 adsorpsiyonu yaklaşık 15 dakikada en yüksek seviyelere çıkmıştır. Manyetik nanoparçacıklara ait adsorpsiyon eğrisine bakılarak ilk 15 dakikada baskılanmış manyetik nanoparçacıklara AfM1 adsorpsiyonunun zamanla doğrusal olarak arttığı ve 15. dakikadan itibaren plato bölgesinin başladığı belirlenmiştir. Sonuç olarak, baskılanmış manyetik nanoparçacıkların ilk 15 dakika içerisinde maksimum doygunluk seviyesine ulaştığı görülmektedir. MIP'lerin 15 dakika gibi kısa bir sürede adsorpsiyonu tamamlaması pratik uygulamalarda kullanılabilirliğini göstermektedir.

4.5. Desorpsiyon Çözeltilisinin Belirlenmesi

Adsorpsiyon işlemlerinde kullanılmış olan MIP-MNP kurutulduktan sonra her 15,0 mg MIP-MNP ayrı ayrı 5,0'er mL aseton, asetonitril, mutlak etanol, metanol, metanol:asetik asit (9:1, v/v), su, su:metanol (1:1, v/v) içersine alınarak 120 dakika boyunca oda sıcaklığında çalkalandıktan sonra çözeltiler ayrılarak floresans spektrofotometresi ile derişimleri tayin edildi. Elde edilen geri kazanım verimleri Şekil 4.8'de verildi.

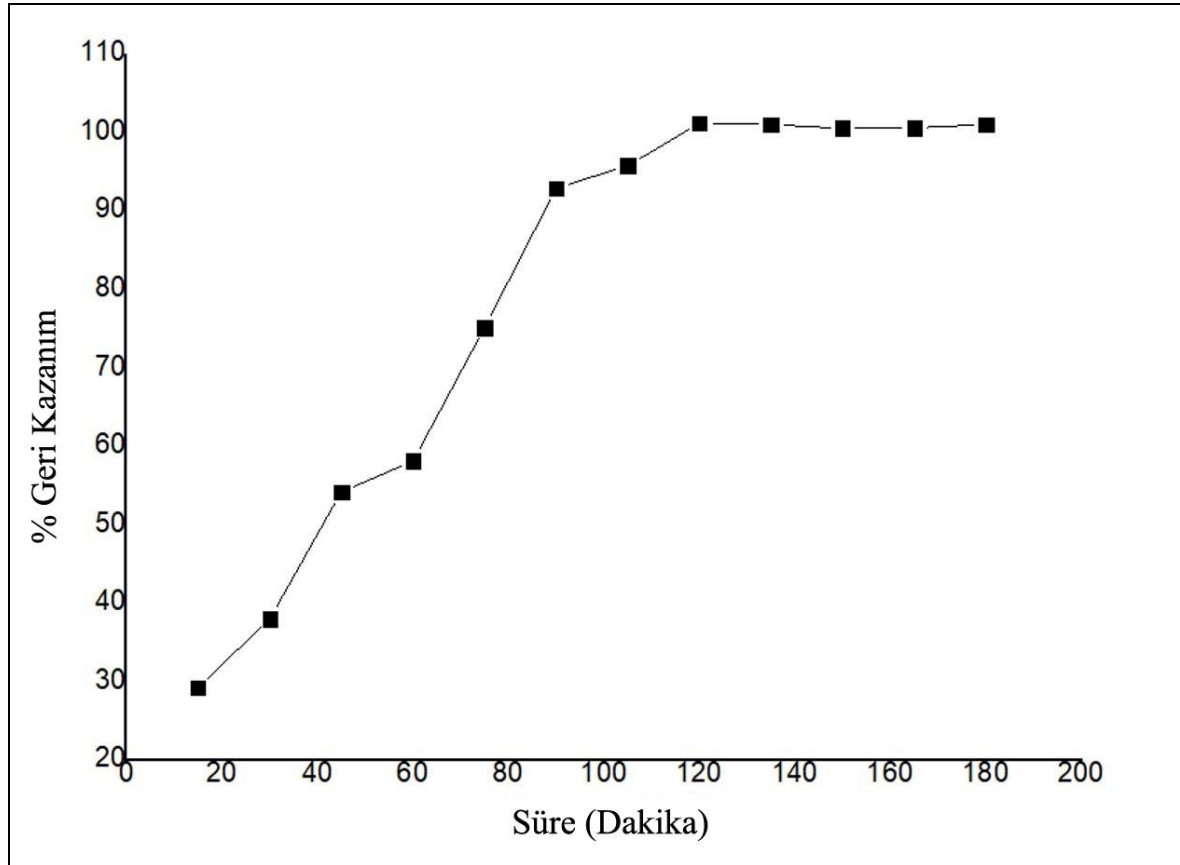


Şekil 4.8. Kullanılan desorpsiyon çözeltisine karşı % geri kazanım verimleri

Şekil 4.8 göz önüne alındığında aseton, asetonitril, etanol ve methanol:asetik asit (9:1) çözeltilerinin desorpsiyon işlemi için yüksek verim sağladığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak maliyet, temin etmede kolaylık ve hazırlık basamağı gibi faktörler göz önünde bulundurularak desorpsiyon işlemlerinde kullanılacak olan çözelti aseton olarak belirlenmiştir.

4.6. Desorpsiyon Süresinin Belirlenmesi

Adsorpsiyon işlemlerinde kullanılmış olan MIP-MNP kurutulduktan sonra 15,0 mg MIP-MNP 5,0 mL aseton içerisine alınarak 180 dakika boyunca oda sıcaklığında çalkalanarak her 15 dakikada bir çözeltinin derişimi tayin edildi. Elde edilen geri kazanım verimleri Şekil 4.9'da verildi.



Şekil 4.9. Aseton çözeltisi ile yapılan desorpsiyon işlemi için desorpsiyon süresine karşı % geri kazanım verimleri

5,0 mL aseton ile yapılan 180 dakikalık desorpsiyon işlemi süresince elde edilen ve Şekil 4.9’da verilen veriler sonucunda % geri kazanımın zamanla doğru orantılı olarak arttığı gözlenmiştir. 120 dakikada en yüksek geri kazanım elde edilmiş ve 120 dakikadan itibaren plato bölgesi gözlenmiştir. Bu veriler ışığında desorpsiyon süresi 120 dakika olarak belirlenmiş ve yapılan diğer çalışmalarda desorpsiyon işlemi için bu süre uygulanmıştır.

4.7. Aflatoksin M1 Moleküllerinin Seçicilik Çalışması

AfB1 molekülleri kullanılarak, AfM1 baskılanan manyetik nanoparçacıkların hedef molecule karşı seçiciliği incelendi. Seçicilik çalışmaları, oda koşullarında, 15 dakika boyunca MIP ve NIP manyetik nanoparçacıklar için 50 ng mL^{-1} başlangıç derişimindeki 50 mL AfM1 ve AfB1 çözeltileri ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar kullanılarak hesaplanan Q_e değerlerinin karşılaştırılması Çizelge 4.4’de gösterildi.

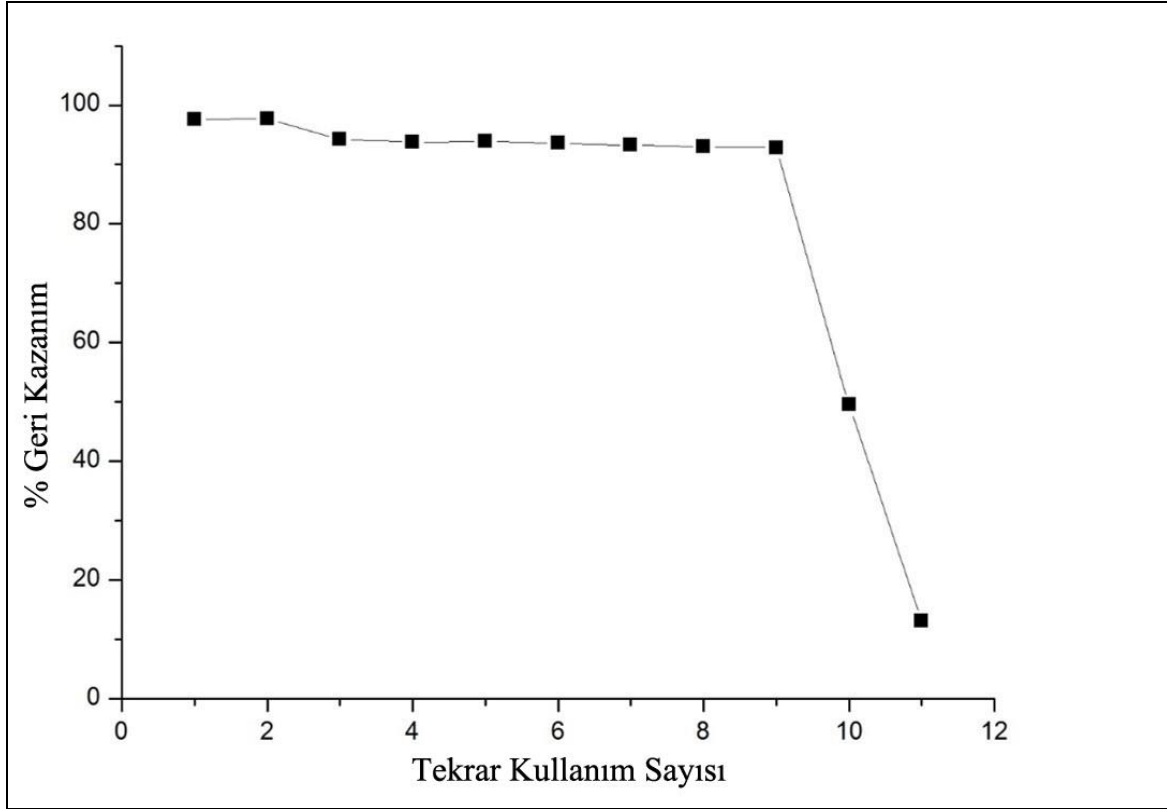
Çizelge 4.4. MIP ve NIP manyetik nanoparçacıkların hedef moleküle seçiciliği

	MIP				NIP	
Tür / Ortam	M1 / Süt	M1 / Su	B1 / Süt	B1 / Su	M1 / Su	B1 / Su
Q_e ($\mu\text{g/g}$)	13,4	16,2	0,7	1,0	0,1	0,4

Baskılanmış manyetik nanoparçacıkların AfM1 için adsorpsiyon kapasitesi süt örneğinde $13,4 \mu\text{g g}^{-1}$ ve sulu çözeltide $16,2 \mu\text{g g}^{-1}$ iken, baskılanmamış manyetik nanoparçacıkların adsorpsiyon kapasitesi sulu çözeltide $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. AfB1 için ise adsorpsiyon kapasitesi süt örneğinde $0,7 \mu\text{g g}^{-1}$ ve sulu çözeltide $1,0 \mu\text{g g}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar baskılanmış manyetik nanoparçacıkların AfM1 için yüksek adsorpsiyon kapasitesine ve seçiciliğe sahip olduğunu göstermektedir. Diğer yandan, baskılanmamış manyetik nanoparçacıklarda elde edilen sonuçlar incelendiğinde aflatoksin türlerinin adsorpsiyonunun tamamiyle seçici olmayan adsorpsiyon olduğu düşünülebilir. Bu seçici olmayan adsorpsiyon durumu baskılanmış manyetik nanoparçacıkların adsorplamış olduğu düşük miktardaki AfB1 molekülleri için de söylenebilir. NIP manyetik nanoparçacıklar baskılama molekülü olan AfM1'e özgü boşluklar içermemesi sebebiyle çok düşük miktarlarda AfM1 molekülü adsorbe ederek doygunluğa ulaşmıştır. Sonuç olarak, baskılanmış manyetik nanoparçacıkların AfM1 moleküllerine özgü boşluklara sahip olduğu ve AfM1 moleküllerinin spesifik olarak bu boşluklara seçici bir şekilde adsorplandığını söylemek mümkündür.

4.8. Baskılanmış Manyetik Nanoparçacıkların Tekrar Kullanılabilirliği

Baskılanmış manyetik nanoparçacıkların tekrar kullanılabilirliği hedeflenen molekülün karmaşık matrislerden spesifik olarak tanınması ve ayrılması için çok önemli bir özelliktir. Bu nedenle, baskılanmış manyetik nanoparçacıklar 11 kez adsorpsiyon/desorpsiyon döngüsüne maruz bırakılarak tekrar kullanılabilirlikleri gözlemlendi ve sonuçlar Şekil 4.10'da verildi.



Şekil 4.10. MIP manyetik nanoparçacıkların tekrar kullanılabilirliği

Baskılanmış manyetik nanoparçacıkların 9. adsorpsiyon/desorpsiyon döngüsüne kadar adsorpsiyon kapasitesinde ciddi bir azalma olmadığı, ancak 10. döngüden itibaren adsorpsiyon kapasitesinin düştüğü gözlenmektedir. Bundan dolayı 9 kez kullanım imkanı olduğu ve bu süre zarfında kararlılığını koruduğu anlaşılmaktadır. 10. döngüden itibaren adsorpsiyon kapasitesinde düşüş yaşanmasının, AfM1'e özgü tanıma boşluklarının deforme olması sebebiyle olduğu düşünülmektedir.

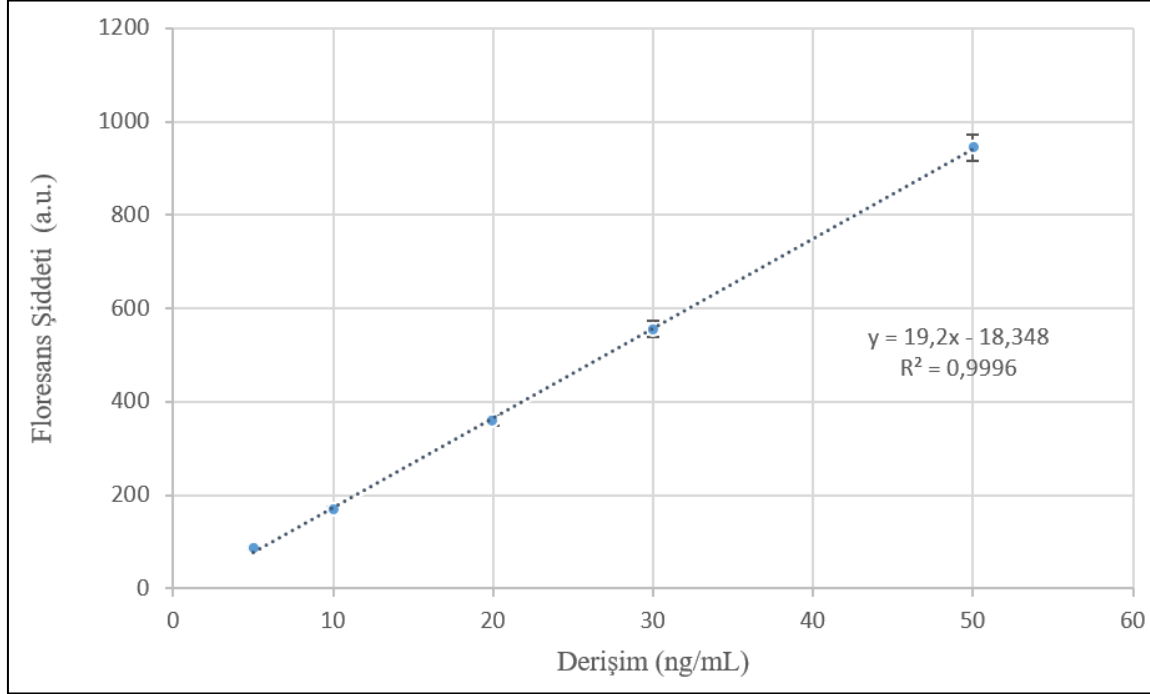
Sonuç olarak, hazırlanan baskılanmış manyetik nanoparçacıkların, 9 adsorpsiyon/desorpsiyon döngüsü boyunca tekrar kullanılabildiği ve bu süre boyunca yüksek kararlılık gösterdiği gözlemlenmiştir.

4.9. Aflatoksin M1'in Doğrusal Çalışma Aralığı ve LOD-LOQ Değerleri

Baskılanmış manyetik nanoparçacıkların doğrusal çalışma aralığı ve LOD-LOQ değerleri 5,0-50,0 ng mL⁻¹ AfM1 derişim aralığındaki çözeltilerin kullanılmasıyla elde edilen floresans sinyalleri ile çizilen kalibrasyon grafiği kullanılarak belirlendi (Şekil 4.11).

Uyarma Dalgaboyu : 356,00 nm

Floresans Dalgaboyu : 440,00 nm



Şekil 4.11. AfM1 için floresans ölçümlerinden elde edilen kalibrasyon grafiği

LOD = 3,3xs/m

LOQ = 10xs/m

AfM1'in floresans spektrofotometresinde doğrusal çalışma aralığı 5,0-50,0 ng mL⁻¹ derişim aralığı olarak belirlenmiştir. LOD değeri 0,05 ng mL⁻¹ iken, LOQ değeri 0,15 ng mL⁻¹ olarak tespit edilmiştir.

4.10. Baskılanmış Manyetik Nanoparçacıkların Süt Numunlerindeki Uygulanabilirliği

Önerilen yöntemin doğruluğunu ve güvenilirliğini kanıtlamak için, 50,0 mL'lik süt numunelerine 50,0 ng mL⁻¹ derişiminde olacak şekilde AfM1 ve AfB1 ilave edilerek Madde 3.3.5'e göre MIP ve NIP manyetik nanoparçacıklar ile bu çözeltilerden AfM1 ve AfB1 geri kazanımı belirlendi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5'de özetlendi.

Çizelge 4.5. AfM1 ve AfB1 içeren süt örneklerinden MIP ve NIP manyetik nanoparçacıklar kullanılarak geri kazanımı ($n = 5$)

MIP/NIP	Aflatoksin Türü	50,0 mL süt örneğine yapılan katkı (ng/mL)	Geri kazanım çözeltisinin derişimi* (ng/mL) $\bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}}$	Geri kazanım (%) $\bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}}$	R.S.D. (%)
MIP	Aflatoksin M1 (AfM1)	50,0	409 ± 25	82 ± 5	6,1
NIP	Aflatoksin M1 (AfM1)	50,0	$2,1 \pm 0,1$	$0,40 \pm 0,02$	4,8
MIP	Aflatoksin B1 (AfB1)	50,0	21 ± 1	$4,1 \pm 0,2$	4,8
NIP	Aflatoksin B1 (AfB1)	50,0	$12,1 \pm 0,7$	$2,4 \pm 0,1$	5,8

* % 95 güven seviyesinde 5 ölçüm sonucunun ortalamasıdır.

AfM1 içeren süt örneklerinde yapılan 5 seri deney sonucunda MIP manyetik nanoparçacıklar ile ortalama geri kazanım %82 olarak bulunmuştur. Aynı şartlarda NIP manyetik nanoparçacıklar ile yapılan çalışmalar sonucunda ise ortalama geri kazanım %0,40 olarak belirlenmiştir. Ayrıca AfB1 içeren süt örneklerinde yapılan çalışmalar sonucunda ise MIP manyetik nanoparçacıklar ile ortalama %4,1, NIP manyetik nanoparçacıklar ile ortalama %2,4 geri kazanım sonucuna ulaşılmıştır. Elde edilen bu verilere göre, AfM1 baskılanan MIP manyetik nanoparçacıklar hedef moleküle karşı yüksek derecede ilgi, seçicilik ve adsorpsiyon kapasitesi göstermiş ve gerçek numunelerden AfM1 ekstraksiyonu için kullanılabilir olduğunu kanıtlamıştır. Ayrıca, hazırlanan bu MIP manyetik nanoparçacıklar optimize edilerek rutin AfM1 analizi işlemleri esnasında kullanılan immünoafinite kolonlara alternatif haline de getirilebilir.

Ayrıca önerilen yöntemin süt ve su örneklerindeki uygulamalarının farkının belirlenmesi amacıyla, 0,0; 25,0; 50,0 ve 100,0 ng mL⁻¹ derişiminde olacak şekilde AfM1 ilavesi ile hazırlanan süt ve su örnekleri hazırlanarak MIP manyetik nanoparçacıklar ile bu çözeltilerden AfM1 geri kazanımı belirlendi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.6’da özetlendi.

Çizelge 4.6. AfM1 içeren süt ve su örneklerinden MIP manyetik nanoparçacıklar kullanılarak geri kazanımı ($n = 5$).

Örnek	50,0 mL örneğe yapılan katkı (ng/mL)	Geri kazanım çözeltisinin derişimi* (ng/mL) $\bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}}$	Geri kazanım (%) $\bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}}$	R.S.D. (%)
Süt	-	11,9 ± 0,5	-	4,2
	25,0	206 ± 12	82 ± 5	5,8
	50,0	409 ± 25	82 ± 5	6,1
	100,0	749 ± 51	75 ± 5	6,8
Su	-	12,7 ± 0,5	-	3,9
	25,0	233 ± 13	93 ± 5	5,6
	50,0	494 ± 29	99 ± 6	5,9
	100,0	950 ± 50	95 ± 5	5,3

* % 95 güven seviyesinde 5 ölçüm sonucunun ortalamasıdır.

AfM1 içeren süt örneklerinde yapılan 5 seri deney sonucunda MIP manyetik nanoparçacıklar ile ortalama geri kazanım %75-82 aralığındadır. Aynı şartlarda su örneklerinde MIP manyetik nanoparçacıklar ile yapılan çalışmalar sonucunda ise ortalama geri kazanım %93-99 aralığındadır. Bu sonuçlar, AfM1 içeren süt ve su örneklerinden MIP manyetik nanoparçacıklar kullanılarak AfM1 moleküllerinin yüksek verimle ayrılabilceğini göstermektedir. Süt örneklerinde daha düşük geri kazanım değerlerinin elde edilmesinin, ön ayırma işlemi yapılmasına rağmen süt matrisinde kalan diğer türlerin girişim etkisi sebebiyle olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, katkı içermeyen su ve süt örneklerinde de desorpsiyon sonucunda çok küçük AfM1 miktarları tespit edilmiştir. Bunun sebebi ise baskılama işlemi sonrasında AfM1 molekülleri polimer yapıdan uzaklaştırılırken tamamiyle uzaklaştırılamamış ve çok az da olsa bir kirlilik kalmış olmasıdır.

5. SONUÇ

Tüm sonuçlar incelendiğinde MIP-MNP'lerin su ve süt ortamında aflatoksin M1 (AfM1) moleküllerine karşı seçici bir ilgisi olduğu görülmektedir. Bununla birlikte MNP'lerin basit ve hızlı yollarla sentezlenebilmesi, modifiye edilebilir olması ve kolay uygulanabilir olması nedeniyle ayırma yöntemlerinde kullanımının tercih edilebileceği açıktır. MNP'ler sensörlerde, çiplerde kullanılan altın, silisyum ve cam gibi yüzeylere iyi bir alternatif olabilecek biyouyumlu malzemelerdir. Bu sebeptir ki MIP ve MNP'ler canlı vücudu ve gıda ürünleri de dahil birçok alanda başarıyla uygulanabilir. Bu çalışmanın sonucunda da moleküler baskılama tekniği ile hem düşük maliyetli, hem de yüksek ilgiye sahip seçici bir adsorban materyal elde edilmiştir.

Özet olarak, AfM1 moleküllerine özgü, manyetik nanoparçacıkların yüzeyinde PHEMA temelli polimer kullanımı ile yeni bir adsorban material sentezlenmiştir. Manyetik nanoparçacıklar bu amaç için VTMS ile modifiye edilmiş, HEMA monomeri kullanılarak ortam sıcaklığında polimerizasyon gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan AfM1 baskılanmış MNP'lerin spesifik bağlanma noktaları yüksek adsorpsiyon kapasitesi, hassas seçicilik ve yeniden kullanılabilirlik gibi özellikler sağlamıştır. Bu bağlanma noktaları baskılanan molekülün fiziksel şekline uygun karakteristik boşluklardır.

MIP-MNP'ler AfM1 moleküllerini su ve süt içerisinde 15 dakika gibi kısa bir süre içerisinde adsorplamıştır. Adsorpsiyon işleminden sonra MIP-MNP'ler harici bir manyetik alan uygulanarak (mıknatıs) hızlı ve kolayca çözelti ortamından ayrılmıştır. Bu sayede son derece basit şekilde uygulanarak ardından adsorbanın kolaylıkla ortamdan uzaklaştırılması mümkün kılınmıştır. Hazırlanan MIP-MNP'lerin yüksek adsorpsiyon, yüksek geri kazanım ve yüksek seçicilik özellikleri sayesinde gerçek numunelerde immünoafinite kolonlara alternative olarak analiz öncesi ayırma işlemlerinde ve diğer zenginleştirme işlemlerinde uygulanabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak; maliyetli ve zaman alan diğer yöntemlerden daha avantajlı olan bu yöntem, AfM1 ekstraksiyonu için iyi bir alternatif olabilir.

KAYNAKLAR

1. Marin, S., Ramos, A. J., Cano-Sancho, G., and Sanchis, V. (2013). Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 60, 218-237.
2. U.S.F.a.D.A., (FDA), (2000). *Guidance for Industry: Action Levels for Poisonous or Deleterious Substances in Human Food and Animal Feed*.
3. Kaushik, G., (2015). Effect of Processing on Mycotoxin Content in Grains. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(12), 1672-1683.
4. Neme, K. and Mohammed, A. (2017). Mycotoxin occurrence in grains and the role of postharvest management as a mitigation strategies. A review. *Food Control*, 78, 412-425.
5. Rawal, S., Kim, J. E. and Coulombe, R. (2010). Aflatoxin B1 in poultry: Toxicology, metabolism and prevention. *Research in Veterinary Science*, 89(3), 325-331.
6. Abdel-Wahhab, M. A., Ahmed, H. H. and Hagazi, M. M. (2006). Prevention of aflatoxin B1-initiated hepatotoxicity in rat by marine algae extracts. *Journal of Applied Toxicology*, 26(3), 229-238.
7. Rushing, B. R. and Selim, M. I. (2019). Aflatoxin B1: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods. *Food and Chemical Toxicology*, 124, 81-100.
8. Soni, K. B., Lahiri, M., Chackradeo, P., Bhide, S. V., and Kuttan, R. (1997). Protective effect of food additives on aflatoxin-induced mutagenicity and hepatocarcinogenicity. *Cancer Letters*, 115(2), 129-133.
9. Bognanno, M., La Fauci, L., Ritieni, A., Tafuri, A., De Lorenzo, A., Micari, P., and Galvano, F. (2006). Survey of the occurrence of Aflatoxin M1 in ovine milk by HPLC and its confirmation by MS. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50(3), 300-305.
10. Loprieno, N., (1975). Letter: International Agency for Research on Cancer (IARC) monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man: "Relevance of data on mutagenicity". *Mutation Research*, 31(3), 210.
11. Santini, A., (2013). Aflatoxin M1 in raw, UHT milk and dairy products in Sicily (Italy) Part B Surveillance. *Food Additives & Contaminants*, 6(3), 181-186.
12. Gürbay, A., Aydın, S., Girgin, G., Engin, A. B., and Şahin, G. (2006). Assessment of aflatoxin M1 levels in milk in Ankara, Turkey. *Food Control*, 17(1), 1-4.
13. Mayes, A. G. and Whitcombe, M. J. (2005). Synthetic strategies for the generation of molecularly imprinted organic polymers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(12), 1742-1778.

14. Porter Jr, L. A., Ji, D., Westcott, S. L., Graupe, M., Czernuszewicz, R. S., Halas, N. J., and Lee, T. R. (1998). Gold and silver nanoparticles functionalized by the adsorption of dialkyl disulfides. *Langmuir*, 14(26), 7378-7386.
15. Harrison, R. J., Dunin-Borkowski, R. E. and Putnis, A. (2002). Direct imaging of nanoscale magnetic interactions in minerals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(26), 16556-16561.
16. Ayaz, A., ve Yurttagül, M. (2012). *Besinlerdeki toksik öğeler-II*. Ankara: Ankara Sağlık Bakanlığı Yayınları, 727.
17. Rahimi, E., Shakerian, A., Jafariyan, M., Ebrahimi, M., and Riahi, M. (2009). Occurrence of aflatoxin M 1 in raw, pasteurized and UHT milk commercialized in Esfahan and Shahr-e Kord, Iran. *Food Security*, 1(3), 317-320.
18. Kamkar, A., Fallah, A. A., and Mozaffari Nejad, A. S. (2014). The review of aflatoxin M1 contamination in milk and dairy products produced in Iran. *Toxin Reviews*, 33(4), 160-168.
19. Bilandžić, N., Božić, Đ., Đokić, M., Sedak, M., Kolanović, B. S., Varenina, I., and Cvetnić, Ž. (2014). Seasonal effect on aflatoxin M1 contamination in raw and UHT milk from Croatia. *Food control*, 40, 260-264.
20. İnternet: European Food Safety Authority (EFSA), (2007). *Aflatoxins in food*. URL: <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/aflatoxins-food>. Son Erişim Tarihi: 05.06.2021.
21. Behfar, A., Khorasgani, Z. N., Alemzadeh, Z., Goudarzi, M., Ebrahimi, R., and Tarhani, N. (2012). Determination of Aflatoxin M1 levels in produced pasteurized milk in Ahvaz City by using HPLC. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 7(2), 80-84.
22. Kamkar, A. A. F. (2008). Detection of aflatoxin M1 in UHT milk samples by Elisa. *Journal of Veterinary Research*, 63(2), 7-12.
23. Nogaim, Q. A., Al-Dalali, S., Al-Badany, A., and Farh, M. (2014). Scientia Research Library. *Journal of Applied Chemistry*, 2(4), 13-18.
24. Picinin, L. C. A., Cerqueira, M. M. O. P., Vargas, E. A., Lana, Â. M. Q., Toaldo, I. M., and Bordignon-Luiz, M. T. (2013). Influence of climate conditions on aflatoxin M1 contamination in raw milk from Minas Gerais State, Brazil. *Food Control*, 31(2), 419-424.
25. Mulunda, M., Ngoma, L., Nyirenda, M., Motsei, L., and Bakunzi, F. (2013). A Decade of Aflatoxin M1 Surveillance in Milk and Dairy Products in Developing Countries (2001-2011): A Review. *Mycotoxin and Food Safety in Developing Countries*, 39-60.
26. Kanungo, L., and Bhand, S. (2014). A survey of Aflatoxin M1 in some commercial milk samples and infant formula milk samples in Goa, India. *Food and Agricultural Immunology*, 25(4), 467-476.

27. Sibanda, L., De Saeger, S., and Van Peteghem, C. (1999). Development of a portable field immunoassay for the detection of aflatoxin M1 in milk. *International Journal of Food Microbiology*, 48(3), 203-209.
28. Matsuda, Y., Wakai, T., Kubota, M., Osawa, M., Sanpei, A., and Fujimaki, S. (2013). Mycotoxins are conventional and novel risk biomarkers for hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 19(17), 2587-2590.
29. Prandini, A., Tansini, G., Sigolo, S., Filippi, L., Laporta, M., and Piva, G. (2009). On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food and Chemical Toxicology*, 47(5), 984-991.
30. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. (2011). *Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği*. Ankara: Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı.
31. Škrbić, B., Živančev, J., Antić, I., and Godula, M. (2014). Levels of aflatoxin M1 in different types of milk collected in Serbia: Assessment of human and animal exposure. *Food Control*, 40, 113-119.
32. Kafle, P., Sedai, D., Rai, K. P., and Pokharel, B. B. (2012). Study on the level of aflatoxin M1 contamination in raw and processed milk marketed in Kathmandu Valley. *Journal of Food Science and Technology Nepal*, 7, 52-56.
33. Lopez, C. E., Ramos, L. L., Ramadan, S. S., and Bulacio, L. C. (2003). Presence of aflatoxin M1 in milk for human consumption in Argentina. *Food control*, 14(1), 31-34.
34. Van Egmond, H., Svensson, U. and Fremy, J. (1997). *Mycotoxins. In: Residues and contaminants in milk and milk products*. Brussels: International Dairy Federation, 17-88.
35. Didwania, N., and Joshi, M. (2013). Mycotoxins: A critical review on occurrence and significance. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(3), 1014-1019.
36. Iqbal, S. Z., Asi, M. R. and Ariño, A. (2013). Aflatoxins. S. Maloy & K. Hughes (Ed.). *Brenner's Encyclopedia of Genetics*. USA: Institute of Molecular Sciences. 43-47.
37. Bennett, J. W. (2010). *An overview of the genus Aspergillus*. Portland: Caiser Academic Press, 1-17.
38. Pitt, J. I., (2014). Mycotoxins: Aflatoxins, Y. Motarjemi (Ed.). *Encyclopedia of Food Safety*, Waltham: Academic Press, 289-294.
39. Kalantari, H., Kalantari, G. H. and Nazari Khorasgani, Z. (2011). Evaluation Of Aflatoxins Contamination In Baby Food Supplements (Mamana & Ghoncheh). *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 6(1), 42-50.
40. Kamkar, A., Jahed Khaniki, G. R. and Alavi, S. A. (2011). Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk produced in Ardebil of Iran. *Iranian Journal Of Environmental Health Science and Engineering (Ijehse)*, 8(2), 123-128.

41. Tavakoli, H., Kamkar, A., Riazipour, M., Mozaffari Nejad, A. S., and Rafati, H. (2013). Assessment of aflatoxin M1 levels by enzyme-linked immunosorbent assay in yoghurt consumed in Tehran, Iran. *Asian Journal of Chemistry*, 25(5), 2836-2838.
42. Cavaliere, C., Foglia, P., Guarino, C., Marzioni, F., Nazzari, M., Samperi, R., and Laganà, A. (2006). Aflatoxin M1 determination in cheese by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1135(2), 135-141.
43. Creppy, E. E. (2002). Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*, 127(1-3), 19-28.
44. Madalı, B., and Ayaz, A. (2017). Aflatoxin M1 in Dairy Products: Exposure and Health Risks. *Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi*, 4(1), 1-14.
45. Bbosa, G. S., Kitya, D., Lubega, A., Ogwal-Okeng, J., Anokbonggo, W. W., and Kyegombe, D. B. (2013). Review of the biological and health effects of aflatoxins on body organs and body systems. *Aflatoxins-Recent Advances and Future Prospects*, 12, 239-265.
46. Lewis, L., Onsongo, M., Njapau, H., Schurz-Rogers, H., Lubber, G., Kieszak, S., and Kenya Aflatoxicosis Investigation Group. (2005). Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in eastern and central Kenya. *Environmental Health Perspectives*, 113(12), 1763-1767.
47. Yu, J. (2012). Current understanding on aflatoxin biosynthesis and future perspective in reducing aflatoxin contamination. *Toxins*, 4(11), 1024-1057.
48. Madalı, B., (2016). *Farklı süt türlerinin aflatoksin M1 düzeyi açısından değerlendirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 7-37.
49. Herrman, J. L., and Walker, R. (1999). Risk analysis of mycotoxins by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). *Food Nutrition and Agriculture*, 17-24.
50. Wu, W., Wu, Z., Yu, T., Jiang, C., and Kim, W. S. (2015). Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Science and Technology of Advanced Materials*, 16(2), 023501.
51. Bulte, J. W., Hoekstra, Y., Kamman, R. L., Magin, R. L., Webb, A. G., Briggs, R. W., and De Leij, L. (1992). Specific MR imaging of human lymphocytes by monoclonal antibody-guided dextran-magnetite particles. *Magnetic Resonance in Medicine*, 25(1), 148-157.
52. Champion, J. A., Katere, Y. K., and Mitragotri, S. (2007). Making polymeric micro- and nanoparticles of complex shapes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(29), 11901-11904.
53. Sivapalan, S. T., DeVetter, B. M., Yang, T. K., Schulmerich, M. V., Bhargava, R., and Murphy, C. J. (2013). Surface-enhanced Raman spectroscopy of polyelectrolyte-wrapped gold nanoparticles in colloidal suspension. *The Journal of Physical Chemistry C*, 117(20), 10677-10682.

54. Sun, C., Lee, J. S., and Zhang, M. (2008). Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(11), 1252-1265.
55. Hsu, C. Y., Huang, J. W., and Lin, K. J. (2011). High sensitivity and selectivity of human antibody attachment at the interstices between substrate-bound gold nanoparticles. *Chemical Communications*, 47(3), 872-874.
56. Tang, D., Yuan, R., and Chai, Y. (2006). Magnetic core–shell Fe₃O₄@ Ag nanoparticles coated carbon paste interface for studies of carcinoembryonic antigen in clinical immunoassay. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(24), 11640-11646.
57. Chou, P. H., Chen, S. H., Liao, H. K., Lin, P. C., Her, G. R., Lai, A. C. Y., and Chen, Y. J. (2005). Nanoprobe-based affinity mass spectrometry for selected protein profiling in human plasma. *Analytical chemistry*, 77(18), 5990-5997.
58. Wang, G., Huang, H., Zhang, G., Zhang, X., and Wang, L. (2011). Dual functional electrochemical sensor based on Au–polydopamine–Fe₃O₄ nanocomposites. *Analytical Methods*, 3(11), 2475-2477.
59. Sahin, F., Turan, E., Tumturk, H., and Demirel, G. (2012). Core–shell magnetic nanoparticles: a comparative study based on silica and polydopamine coating for magnetic bio-separation platforms. *Analyst*, 137(23), 5654-5658.
60. Wang, G., Huang, H., Zhang, G., Zhang, X., and Wang, L. (2011). Dual functional electrochemical sensor based on Au–polydopamine–Fe₃O₄ nanocomposites. *Analytical Methods*, 3(11), 2475-2477.
61. Shin, K., Choi, J. W., Ko, G., Baik, S., Kim, D., Park, O. K., and Hyeon, T. (2017). Multifunctional nanoparticles as a tissue adhesive and an injectable marker for image-guided procedures. *Nature Communications*, 8(1), 1-12.
62. Rodzinski, A., Guduru, R., Liang, P., Hadjikhani, A., Stewart, T., Stimphil, E., and Khizroev, S. (2016). Targeted and controlled anticancer drug delivery and release with magnetoelectric nanoparticles. *Scientific Reports*, 6(1), 1-14.
63. Xue, X., Huang, Y., Bo, R., Jia, B., Wu, H., Yuan, Y., and Li, Y. (2018). Trojan Horse nanotheranostics with dual transformability and multifunctionality for highly effective cancer treatment. *Nature Communications*, 9(1), 1-15.
64. Dang, F., Enomoto, N., Hojo, J., and Enpuku, K. (2010). Sonochemical coating of magnetite nanoparticles with silica. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17(1), 193-199.
65. Rockenberger, J., Scher, E. C., and Alivisatos, A. P. (1999). A new nonhydrolytic single-precursor approach to surfactant-capped nanocrystals of transition metal oxides. *Journal of the American Chemical Society*, 121(49), 11595-11596.
66. Hu, P., Chang, T., Chen, W. J., Deng, J., Li, S. L., Zuo, Y. G., and Volinsky, A. A. (2019). Temperature effects on magnetic properties of Fe₃O₄ nanoparticles synthesized by the sol-gel explosion-assisted method. *Journal of Alloys and Compounds*, 773, 605-611.

67. Bocanegra-Diaz, A., Mohallem, N. D., and Sinisterra, R. D. (2003). Preparation of a ferrofluid using cyclodextrin and magnetite. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 14(6), 936-941.
68. Murray, C., Norris, D. J., and Bawendi, M. G. (1993). Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E= sulfur, selenium, tellurium) semiconductor nanocrystallites. *Journal of the American Chemical Society*, 115(19), 8706-8715.
69. Peng, X., Wickham, J., and Alivisatos, A. P. (1998). Kinetics of II-VI and III-V colloidal semiconductor nanocrystal growth: "focusing" of size distributions. *Journal of the American Chemical Society*, 120(21), 5343-5344.
70. O'Brien, S., Brus, L., and Murray, C. B. (2001). Synthesis of monodisperse nanoparticles of barium titanate: toward a generalized strategy of oxide nanoparticle synthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 123(48), 12085-12086.
71. Lu, P., Zhang, J. L., Liu, Y. L., Sun, D. H., Liu, G. X., Hong, G. Y., and Ni, J. Z. (2010). Synthesis and characteristic of the Fe₃O₄@ SiO₂@ Eu (DBM) 3· 2H₂O/SiO₂ luminomagnetic microspheres with core-shell structure. *Talanta*, 82(2), 450-457.
72. Lu, A. H., Schmidt, W., Matoussevitch, N., Bönnemann, H., Spliethoff, B., Tesche, B., and Schüth, F. (2004). Nanoengineering of a magnetically separable hydrogenation catalyst. *Angewandte Chemie*, 116(33), 4403-4406.
73. Tsang, S. C., Caps, V., Paraskevas, I., Chadwick, D., and Thompsett, D. (2004). Magnetically separable, carbon-supported nanocatalysts for the manufacture of fine chemicals. *Angewandte Chemie*, 116(42), 5763-5767.
74. Jiles, D. C. (2003). Recent advances and future directions in magnetic materials. *Acta materialia*, 51(19), 5907-5939.
75. Chowdhury, S. R., and Yanful, E. K. (2010). Arsenic and chromium removal by mixed magnetite-maghemite nanoparticles and the effect of phosphate on removal. *Journal of Environmental Management*, 91(11), 2238-2247.
76. Gallios, G. P., and Vaclavikova, M. (2008). Removal of chromium (VI) from water streams: a thermodynamic study. *Environmental Chemistry Letters*, 6(4), 235-240.
77. Mohan, D., and Pittman Jr, C. U. (2006). Activated carbons and low cost adsorbents for remediation of tri-and hexavalent chromium from water. *Journal of Hazardous Materials*, 137(2), 762-811.
78. Richard, F. C., and Bourg, A. C. (1991). Aqueous geochemistry of chromium: A review. *Water Research*, 25(7), 807-816.
79. Sedlazeck, K. P., Höllen, D., Müller, P., Mischitz, R., and Gieré, R. (2017). Mineralogical and geochemical characterization of a chromium contamination in an aquifer-A combined analytical and modeling approach. *Applied Geochemistry*, 87, 44-56.

80. Abboud, M., Turner, M., Duguet, E., and Fontanille, M. (1997). PMMA-based composite materials with reactive ceramic fillers. Part 1.—Chemical modification and characterisation of ceramic particles. *Journal of Materials Chemistry*, 7(8), 1527-1532.
81. Novakova, A. A., Lanchinskaya, V. Y., Volkov, A. V., Gendler, T. S., Kiseleva, T. Y., Moskvina, M. A., and Zezin, S. B. (2003). Magnetic properties of polymer nanocomposites containing iron oxide nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 258, 354-357.
82. Kang, Y. S., Risbud, S., Rabolt, J. F., and Stroeve, P. (1996). Synthesis and characterization of nanometer-size Fe_3O_4 and $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ particles. *Chemistry of Materials*, 8(9), 2209-2211.
83. Deng, J., Ding, X., Zhang, W., Peng, Y., Wang, J., Long, X., and Chan, A. S. (2002). Magnetic and conducting Fe_3O_4 -cross-linked polyaniline nanoparticles with core-shell structure. *Polymer*, 43(8), 2179-2184.
84. Thünemann, A. F., Schütt, D., Kaufner, L., Pison, U., and Möhwald, H. (2006). Maghemite nanoparticles protectively coated with poly (ethylene imine) and poly (ethylene oxide)-b lock-poly (glutamic acid). *Langmuir*, 22(5), 2351-2357.
85. Marutani, E., Yamamoto, S., Ninjbadgar, T., Tsujii, Y., Fukuda, T., and Takano, M. (2004). Surface-initiated atom transfer radical polymerization of methyl methacrylate on magnetite nanoparticles. *Polymer*, 45(7), 2231-2235.
86. He, H. W., Liu, H. J., Zhou, K. C., Wang, W., and Rong, P. F. (2006). Characteristics of magnetic Fe_3O_4 nanoparticles encapsulated with human serum albumin. *Journal of Central South University of Technology*, 13(1), 6-11.
87. Mikhaylova, M., Kim, D. K., Berry, C. C., Zagorodni, A., Toprak, M., Curtis, A. S., and Muhammed, M. (2004). BSA immobilization on amine-functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Chemistry of Materials*, 16(12), 2344-2354.
88. Euliss, L. E., Grancharov, S. G., O'Brien, S., Deming, T. J., Stucky, G. D., Murray, C. B., and Held, G. A. (2003). Cooperative assembly of magnetic nanoparticles and block copolypeptides in aqueous media. *Nano Letters*, 3(11), 1489-1493.
89. Liu, X., Guan, Y., Ma, Z., and Liu, H. (2004). Surface modification and characterization of magnetic polymer nanospheres prepared by miniemulsion polymerization. *Langmuir*, 20(23), 10278-10282.
90. Ulman, A. (1996). Formation and structure of self-assembled monolayers. *Chemical Reviews*, 96(4), 1533-1554.
91. Lu, Y., Yin, Y., Mayers, B. T., and Xia, Y. (2002). Modifying the surface properties of superparamagnetic iron oxide nanoparticles through a sol-gel approach. *Nano Letters*, 2(3), 183-186.
92. Piletska, E. V., Piletsky, S. A., Subrahmanyam, S., Karim, K., and Turner, A. P. F. (2001). A new reactive polymer suitable for covalent immobilisation and monitoring of primary amines. *Polymer*, 42(8), 3603-3608.

93. Gao, R., Mu, X., Hao, Y., Zhang, L., Zhang, J., and Tang, Y. (2014). Combination of surface imprinting and immobilized template techniques for preparation of core-shell molecularly imprinted polymers based on directly amino-modified Fe₃O₄ nanoparticles for specific recognition of bovine hemoglobin. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(12), 1733-1741.
94. Zhang, M., Zhang, X., He, X., Chen, L., and Zhang, Y. (2012). A self-assembled polydopamine film on the surface of magnetic nanoparticles for specific capture of protein. *Nanoscale*, 4(10), 3141-3147.
95. Irshad, M., Iqbal, N., Mujahid, A., Afzal, A., Hussain, T., Sharif, A., and Athar, M. M. (2013). Molecularly imprinted nanomaterials for sensor applications. *Nanomaterials*, 3(4), 615-637.
96. Dirion, B., Cobb, Z., Schillinger, E., Andersson, L. I., and Sellergren, B. (2003). Water-compatible molecularly imprinted polymers obtained via high-throughput synthesis and experimental design. *Journal of the American Chemical Society*, 125(49), 15101-15109.
97. Andersson, H. S., and Nicholls, I. A. (1997). Spectroscopic evaluation of molecular imprinting polymerization systems. *Bioorganic Chemistry*, 25(3), 203-211.
98. Lu, Y., Li, C., Zhang, H., and Liu, X. (2003). Study on the mechanism of chiral recognition with molecularly imprinted polymers. *Analytica Chimica Acta*, 489(1), 33-43.
99. Gürleyik, S., (2020). *Antikor Baskılanmış Manyetik Nanotaneciklerin Hazırlanması ve Kullanılabilirliği*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1-44.
100. Belder, G. F., Ten Brinke, G., and Hadziioannou, G. (1997). Influence of anchor block size on the thickness of adsorbed block copolymer layers. *Langmuir*, 13(15), 4102-4105.
101. Piletsky, S. A., Alcock, S., and Turner, A. P. (2001). Molecular imprinting: at the edge of the third millennium. *Trends in Biotechnology*, 19(1), 9-12.
102. Wulff, G., and Vietmeier, J. (1989). Enzyme-analogue built polymers, 26. Enantioselective synthesis of amino acids using polymers possessing chiral cavities obtained by an imprinting procedure with template molecules. *Die Makromolekulare Chemie: Macromolecular Chemistry and Physics*, 190(7), 1727-1735.
103. Sallacan, N., Zayats, M., Bourenko, T., Kharitonov, A. B., and Willner, I. (2002). Imprinting of nucleotide and monosaccharide recognition sites in acrylamidephenylboronic acid-acrylamide copolymer membranes associated with electronic transducers. *Analytical Chemistry*, 74(3), 702-712.
104. Wulff, G., Best, W., and Akelah, A. (1984). Enzyme-analogue built polymers, 17. Investigations on the racemic resolution of amino acids. *Reactive Polymers, Ion Exchangers, Sorbents*, 2(3), 167-174.

105. Wulff, G. (1972). The use of polymers with enzyme-analogous structures for the resolution of racemates. *Angewandte Chemie International Edition*, 11(4), 341-346.
106. Dickey, F. H. (1949). The preparation of specific adsorbents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 35(5), 227-229.
107. Ikegami, T., Mukawa, T., Nariai, H., and Takeuchi, T. (2004). Bisphenol A-recognition polymers prepared by covalent molecular imprinting. *Analytica Chimica Acta*, 504(1), 131-135.
108. Andersson, L. I., and Mosbach, K. (1990). Enantiomeric resolution on molecularly imprinted polymers prepared with only non-covalent and non-ionic interactions. *Journal of Chromatography A*, 516(2), 313-322.
109. O'Mahony, J., Molinelli, A., Nolan, K., Smyth, M. R., and Mizaikoff, B. (2006). Anatomy of a successful imprint: Analysing the recognition mechanisms of a molecularly imprinted polymer for quercetin. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(7), 1383-1392.
110. Shea, K. J., and Dougherty, T. K. (1986). Molecular recognition on synthetic amorphous surfaces. The influence of functional group positioning on the effectiveness of molecular recognition. *Journal of the American Chemical Society*, 108(5), 1091-1093.
111. Zhang, H., Ye, L., and Mosbach, K. (2006). Non-covalent molecular imprinting with emphasis on its application in separation and drug development. *Journal of Molecular Recognition: An Interdisciplinary Journal*, 19(4), 248-259.
112. Gao, J., Gu, H., and Xu, B. (2009). Multifunctional magnetic nanoparticles: design, synthesis, and biomedical applications. *Accounts of Chemical Research*, 42(8), 1097-1107.
113. Enpuku, K., Tanaka, T., Matsuda, T., Dang, F., Enomoto, N., Hojo, J., and Schilling, M. (2007). Properties of magnetic nanoparticles in the Brownian relaxation range for liquid phase immunoassays. *Journal of Applied Physics*, 102(5), 054901.
114. Akbarzadeh, A., Samiei, M., and Davaran, S. (2012). Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine. *Nanoscale Research Letters*, 7(1), 1-13.
115. Lu, A. H., Salabas, E. E., and Schüth, F. (2007). Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(8), 1222-1244.
116. Martin, P. D., Jones, G. R., Stringer, F., and Wilson, I. D. (2003). Comparison of normal and reversed-phase solid phase extraction methods for extraction of β -blockers from plasma using molecularly imprinted polymers. *Analyst*, 128(4), 345-350.
117. Molinelli, A., Weiss, R., and Mizaikoff, B. (2002). Advanced solid phase extraction using molecularly imprinted polymers for the determination of quercetin in red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(7), 1804-1808.

118. Ansell, R. J. (2005). Molecularly imprinted polymers for the enantioseparation of chiral drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(12), 1809-1835.
119. Lin, J. M., Nakagama, T., Wu, X. Z., Uchiyama, K., and Hobo, T. (1997). Capillary electrochromatographic separation of amino acid enantiomers with molecularly imprinted polymers as chiral recognition agents. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 357(1), 130-132.
120. Kempe, M., and Mosbach, K. (1991). Binding studies on substrate-and enantio-selective molecularly imprinted polymers. *Analytical Letters*, 24(7), 1137-1145.
121. Caro, E., Marcé, R. M., Cormack, P. A., Sherrington, D. C., and Borrull, F. (2004). A new molecularly imprinted polymer for the selective extraction of naproxen from urine samples by solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B*, 813(1-2), 137-143.
122. Theodoridis, G., Lasáková, M., Škeříková, V., Tegou, A., Giantsiou, N., and Jandera, P. (2006). Molecular imprinting of natural flavonoid antioxidants: Application in solid-phase extraction for the sample pretreatment of natural products prior to HPLC analysis. *Journal of Separation Science*, 29(15), 2310-2321.
123. Saraji, M., and Yousefi, H. (2009). Selective solid-phase extraction of Ni (II) by an ion-imprinted polymer from water samples. *Journal of Hazardous Materials*, 167(1-3), 1152-1157.
124. Peng, H., Liang, C., Zhou, A., Zhang, Y., Xie, Q., and Yao, S. (2000). Development of a new atropine sulfate bulk acoustic wave sensor based on a molecularly imprinted electrosynthesized copolymer of aniline with o-phenylenediamine. *Analytica Chimica Acta*, 423(2), 221-228.
125. Tan, Y., Zhou, Z., Wang, P., Nie, L., and Yao, S. (2001). A study of a bio-mimetic recognition material for the BAW sensor by molecular imprinting and its application for the determination of paracetamol in the human serum and urine. *Talanta*, 55(2), 337-347.
126. Turan, E., and Şahin, F. (2016). Molecularly imprinted biocompatible magnetic nanoparticles for specific recognition of Ochratoxin A. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 227, 668-676.
127. Abou-Hany, R. A., Urraca, J. L., Descalzo, A. B., Gómez-Arribas, L. N., Moreno-Bondi, M. C., and Orellana, G. (2015). Tailoring molecularly imprinted polymer beads for alternariol recognition and analysis by a screening with mycotoxin surrogates. *Journal of Chromatography A*, 1425, 231-239.
128. Mei, X. Q., He, X. P., and Wang, J. T. (2016). Molecularly imprinted polymer as efficient sorbent of solid-phase extraction for determination of gonyautoxin 1, 4 in seawater followed by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(21), 5737-5743.
129. Díaz-Bao, M., Regal, P., Barreiro, R., Fente, C. A., and Cepeda, A. (2016). A facile method for the fabrication of magnetic molecularly imprinted stir-bars: A practical example with aflatoxins in baby foods. *Journal of Chromatography A*, 1471, 51-59.

130. Sarıkaya, Y., (2006). *Fizikokimya*. Ankara: Gazi Kitabevi, 640-642.



GAZİ GELECEKTİR...