

Bitki örneklerinden seçici gallik asit ayrılması için gallik asit baskılanmış polimerlerin hazırlanması

Tülden İNANAN*

Aksaray Üniversitesi, Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, Kimya Teknolojileri Programı, Aksaray

Geliş Tarihi (Received Date): 26.10.2020

Kabul Tarihi (Accepted Date): 20.11.2020

Öz

Bu çalışmada, yaygın olarak kullanılan doğal bir antioksidan olan gallik asidin (GA) moleküler baskılama yöntemi kullanılarak hazırlanan polimerlerle (MIP) bitki örneklerinden seçici ayrılması gerçekleştirilmiştir. Emülsiyon polimerizasyonu ile hazırlanan polimerler çeşitli yöntemlerle karakterize edilmiştir. GA adsorpsiyonunun optimizasyon çalışmaları, pH 3,5 ortamında 25°C'de 1,2 mg GA-MIP kullanılarak 60 dk sürenin GA adsorpsiyonu için en uygun koşullar olduğunu göstermiş ve GA adsorpsiyonu adsorpsiyon kinetikleri ve izotermeleri ile incelenmiştir. Çalışılan tüm derişimler için IF değerinin 1'den büyük olması GA-MIP'lerin baskılanmamış polimerlere (GA-NIP) kıyasla daha fazla GA adsorpladığını kanıtlamaktadır. Ayrıca, IF değerinin GA derişimiyle ters orantılı olarak azalması spesifik olmayan etkileşimlerden kaynaklanmaktadır. MIP'lerin seçiciliğini belirlemek amacıyla GA analogları kullanılarak yarışmalı adsorpsiyon çalışmaları yapılmış ve GA ve analoglarının miktarları yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile analiz edilmiştir. Tüm bağıl seçicilik katsayılarının 1'den büyük olması GA-MIP'lerin baskılanmamış polimerlere kıyasla GA'yı tüm analoglarından daha fazla adsorpladığını göstermektedir. Yeşil çay, siyah çay ve karanfil örnekleri ile yapılan gerçek örnek çalışmaları sonucunda en etkin GA adsorpsiyonu ve geri alımının karanfil örnekleriyle elde edildiği belirlenmiştir. HPLC kromatogramları incelendiğinde, GA'nın etkin ve seçici olarak MIP'lerden geri alındığı belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Moleküler baskılama, gallik asit, seçicilik, HPLC.

* Tülden İNANAN, tkalburcu@aksaray.edu.tr, <http://orcid.org/0000-0003-2833-4283>

Preparation of gallic acid imprinted polymers for selective gallic acid separation from plant samples

Abstract

In this study, gallic acid (GA) which is a commonly used natural antioxidant has been separated from plant samples with the polymers (MIP) prepared by using molecular imprinting technique. The polymers produced by emulsion polymerization has been characterized by several methods. Optimization studies for the adsorption of GA has been indicated that pH 3.5 medium at 25°C with using 1,2 mg GA-MIP for 60 min period are optimum conditions for GA adsorption and GA adsorption has been investigated by adsorption kinetics and isotherms. IF values being more than 1 for all working concentrations have demonstrated that GA-MIPs adsorbed more GA in regard to non-imprinted polymers (GA-NIPs). However, decreasing IF values inversely proportional with increasing concentration are due to the non-specific interactions. For the identification of MIPS' selectivity, competitive adsorption studies have been carried out with using GA analogues and amounts of GA and its analogues have been analyzed with high performance liquid chromatography (HPLC). All relative selectivity coefficients greater than 1 have showed that GA-MIPs adsorbed more GA than its analogues as regards to GA-NIPs. As a result of real sample studies with green tea, black tea and clove samples, most efficient GA adsorption and recovery has been achieved with clove samples. It is indicated by analyzing HPLC chromatograms, GA has been recovered effectively and selectively from MIPs.

Keywords: *Molecular imprinting, gallic acid, selectivity, HPLC.*

1. Giriş

Gallik asit (GA; 3,4,5-trihidroksibenzoik asit) farmasötik ve biyomedikal endüstrilerinde kullanılan temel doğal biyoaktif bileşenlerden biridir [1]. GA muz, mango, elma, çilek, yaban mersini, turunçgiller gibi meyve ve meyve tohumları; güvercin ağacı (*Hamamelis virginiana*), meşe kabuğu (*Quercus alba*) ve çay yaprakları (hem yeşil, hem siyah) gibi bitkilerde doğal olarak bulunan bir polifenoldür [2-4]. GA, çoklu biyolojik ve farmasötik özellikleri nedeniyle oldukça ilgi çekmekte [5] ve bu nedenle besinlerde, ilaçlarda ve kozmetik ürünlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır [6]. GA'nın insan sağlığı üzerine anti-bakteriyel [7], anti-viral [8], mutasyon-direnci sağlayıcı [9,10]; kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu, anti-inflamatuvar, anti-tümör, serbest radikal sönmüleyici [5, 10-12], anti-oksidan [13-16] ve anti-diyabetik [17-18] etkileri belirlenmiştir. *In vitro* ve *in vivo* çalışmalar GA'nın sağlıklı hücelere zarar vermeksizin meme, akciğer ve prostat kanserlerine karşı güçlü anti-kanser etki gösterdiğini kanıtlamıştır [10, 19-21]. GA'nın bir başka etkisi de astım, alerjik rinit, sinüzit gibi alerjik hastalıklara karşı anti-histaminik özellik göstermesidir [22-24].

Medikal etkilerine ek olarak GA, deri endüstrisinde ve cilt uygulamalarında şelatlayıcı ajan olarak kullanılmaktadır [25]. Ayrıca, anti-mikrobiyal bir ajan olan trimetopim sentezi için kullanılmakta ve serbest radikal sönmüleme gücü nedeniyle gıdalara ve içeceklerle koruyucu olarak eklenmektedir [26]. GA farmasötik ve endüstriyel önemi nedeniyle dünya genelinde yıllık 8000 tonluk talebe sahiptir. Geleneksel olarak, tannik

asidin hidrolizi ile GA üretilmekte fakat GA üretimi için yüksek miktarlarda kimyasal gerekmede ve çevresel tehlikelere neden olan toksik atıkların salınmasına neden olmaktadır [27]. GA doğal materyallerde bol miktarda bulunmakta ve birçok bitki ve meyveden ekstrakte edilebilmektedir. Buna rağmen, GA'nın seçici ekstraksiyonu sırasında doğal materyallerin kompleks doğası ve GA'nın yüksek polaritesi nedeniyle çeşitli girişimciler de GA ile birlikte elüe olmaktadır. Bu nedenle, doğal materyallerin sulu ortamlarından GA ayrılması ve belirlenmesi için seçici ve kullanışlı materyallerin geliştirilmesi gerekmektedir [13, 28]. Zhang vd, manyetik nanopartikülleri karboksil fonksiyonlandırarak etkin MIP'ler hazırlamışlar ve nar kabuğundan seçici GA ekstraksiyonu için kullanmışlardır [13]. Pardeshi vd, moleküler baskılanmış mikro- ve nano-partikülleri çöktürme polimerizasyonu ile hazırlamış ve *Embllica officinalis*'ten seçici GA ekstraksiyonu için kullanmışlardır [28]. Hu vd, GA'nın üzüm, elma, şeftali ve portakal gibi meyve sularından seçici GA ekstraksiyonu ve tayini için MIP'leri mezogözenekli manyetik silika üzerinde hazırlamışlardır [29]. Hao vd, manyetik karbon nanotüp temelli yüzey baskılanmış polimerler sentezlemiş ve nar kabuğundan GA'nın hızlı ayrılması ve dedeksiyonu için kullanmışlardır [30]. Zhu vd, non-kovalent baskılama yöntemiyle bir seri MIP hazırlamış ve MIP'lerin tanıma özelliklerini ve seçiciliklerini incelemişlerdir. MIP'ler *Cornus officinalis* ekstraktına uygulanmış ve gerçek örnekteki GA bağlama kapasiteleri ve seçicilikleri HPLC ile incelenmiştir [6]. Asfaram vd, magnetit nanopartiküller ve metal organik yapılarından oluşan kompoziti GA'nın yüzey baskılanması için destek materyali olarak kullanmış ve optimizasyon çalışmalarının ardından idrar, plazma ve su örneklerinden GA'nın ultrasonik destekli mikro-ekstraksiyonunu gerçekleştirmişlerdir [10]. Puoci vd, non-kovalent baskılama yöntemiyle hazırladıkları MIP'leri kullanarak zeytin özütü atık suyundan GA'nın çevre-dostu ayrımını sağlamışlardır [31]. Bhawani vd, çöktürme polimerizasyonu ile GA için MIP'ler sentezlemiş, GA standardı eklenmiş idrar örneklerinden GA ekstraksiyonunu yüksek oranda başarılı bir şekilde gerçekleştirmişlerdir [2].

MIP'ler, hedef moleküller için önceden tanımlanmış seçiciliğe sahip girintiler bulunduran fonksiyonel katı materyallerdir. Organik çözücüler, ısı, asit, baz ve diğer kimyasal ve fiziksel streslere dayanabilen, istenilen molekülün şeklini tamamlayıcı çapraz bağlı polimerlerdir [2]. MIP'lerin sentez ve kataliz [32], ilaç salınım sistemleri [33], sensörler [34] ve saflaştırma, uzaklaştırma [35] gibi farklı uygulama alanları bulunmaktadır. Bu nedenle, çevresel, biyomedikal ve gıda analizlerinde artan şekilde ilgi kazanmaktadır.

Bu çalışmada, GA baskılanmış polimerler (GA-MIP), AAm monomeri kullanılarak emülsiyon polimerizasyonu yöntemiyle hazırlanmış ve GA adsorpsiyonunun optimizasyonu çözücü, süre, başlangıç derişimi ve sıcaklık gibi parametrelerin incelenmesiyle gerçekleştirilmiştir. GA-MIP'lerin seçiciliğini belirlemek amacıyla, GA'nın analogları olan 4-hidroksibenzoik asit (HB), kafeik asit (KA) ve p-kumarik asit (4-hidroksisinnamik asit, PCA) kullanılarak HPLC analizleri gerçekleştirilmiştir. Son olarak, GA-MIP ile yeşil çay, siyah çay ve karanfil ekstraktlarından GA ayrımı çalışılmıştır.

2. Deneysel çalışmalar

2.1. Malzeme

GA, polivinilalkol (PVA), amonyum persülfat (APS) ve metanol (MeOH) merckten; HBA, PCA, AAm ve etilenglikol dimetakrilat (EGDMA) sigmadan; ve KA isolabtan

temin edilmiştir. Kullanılan diğer kimyasalların tümü analitik saflıktadır ve saflaştırmadan kullanılmıştır. Deneylerin tümünde kullanılan su Millipore S.A.S 67120 sistemiyle elde edilmiştir. HPLC analizlerinde kullanılan Zorbax SB-fenil kolon Agilenttan temin edilmiştir.

2.2. GA baskılanmış polimerlerin sentezi ve kalıp uzaklaştırma işlemi

GA-MIP'lerin emülsiyon polimerizasyonu yöntemiyle hazırlanmasından önce, kalıp molekül GA ile fonksiyonel monomer olan AAm arasında ön-kompleks oluşumu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, 3 mmol GA metanol içerisinde çözüldükten sonra 9 mmol AAm ile gece boyu karanlık ortamda karıştırılmıştır. GA ve AAm'nin ve hazırlanan ön-kompleksin UV-spektrofotometresi ile taramaları yapılmıştır. GA-MIP'lerin sentezi için 0,2275 g PVA 25 mL sıcak su içerisinde çözülmüş ve hazırlanan ön-kompleks bu stabilizasyon çözeltisinin içerisine eklenmiştir. Çapraz bağlayıcı ajan olarak 3 mmol EGDMA ve başlatıcı olarak 25 mg APS eklenerek son hacim 70 mL olacak şekilde polimerizasyon çözeltisi hazırlanmıştır. Polimerizasyon çözeltisi 15 dk ultrasonik banyoda sonike edilip ve homojen hale gelmesi için 5 dk karıştırıldıktan sonra çözülmüş oksijenin uzaklaştırılması için çözeltilerden 5 dk N₂ gazı geçirilmiştir. Polimerizasyon reaksiyonu 70°C'de 65 rpm hızda çalkalanarak 8 saatte gerçekleştirilmiştir. GA baskılanmamış polimerler (GA-NIP), polimerizasyon çözeltisine GA eklenmeksizin aynı yöntemle hazırlanmıştır.

Polimerizasyon sürecinin sonunda elde edilen GA-MIP ve GA-NIP'ler 30 dk ultrasonik banyoda sonike edilmiştir. Elde edilen polimerler 14.000 rpm'de 15 dk santrifüjlendikten sonra gerekli çözeltiler içerisinde tekrar süspansiyon edilerek yıkamaları yapılmıştır. Kalıbın uzaklaştırılması için GA-MIP'ler 80:20 (MeOH:HAc) ile 4 defa yıkanmıştır. Hem GA-MIP hem de GA-NIP'ler polimerizasyona katılmayan monomer ve çapraz bağlayıcının fazlasının, kalıp uzaklaştırma işleminde kullanılan HAc kalıntılarının uzaklaştırılması için sırayla MeOH ve saf suyla Uv-spektrofotometresinde ihmal edilebilir absorbans gözlenene kadar yıkanmıştır. Yıkamaları tamamlanan GA-MIP ve GA-NIP'ler başlangıç hacimlerinde su içerisinde süspansiyon edilmiş, süspansiyon haldeki polimerlerin ağırlıkları belirlenerek kullanılmıştır.

2.3. GA-MIP ve GA-NIP'lerin karakterizasyonu

GA ve AAm ile hazırlanan ön-kompleksin ve polimerizasyon sonucu elde edilen GA-MIP ve GA-NIP'lerin FTIR spektrumları Thermo Fisher Nicolet is50 FTIR cihazı ile kaydedilmiştir. GA-MIP ve GA-NIP'lerin parçacık boyut, boy dağılımı ve parçacık zeta potansiyeli analizleri Malvern Zetasizer Nano ZSP cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

2.4. GA adsorpsiyonunun optimizasyonu

GA adsorpsiyonunun optimizasyonu için çözücü, süre, polimer miktarı, başlangıç derişimi ve sıcaklık gibi çeşitli parametrelerin etkileri incelenmiştir. GA adsorpsiyonuna çözücü etkisi MeOH, MeOH:H₂O karışımı ve pH'sı NaOH ve HCl ile ayarlanan pH 3,5; 4,0; 4,5 ve 5,0 çözeltileri kullanılarak incelenmiştir. GA adsorpsiyonuna sürenin etkisi 10-90 dk, polimer miktarının etkisi 0,6-2,4 mg GA-MIP ve başlangıç derişiminin etkisi 100-1500 ppm GA çalışılarak belirlenmiştir. Sıcaklık adsorpsiyonu etkileyen önemli parametrelerden biri olduğundan, 5-45°C aralığında çalışılarak sıcaklığın etkisi belirlenmiştir.

Tüm deneyler sonunda adsorpsiyonu çözeltileri 14.000 rpm'de 15 dk santrifüjlendikten sonra üst fazları alınmış, başlangıç çözeltileri ile birlikte Uv-spektrofotometresinde 270

nm’de absorpsanları kaydedilmiştir. Standart gallik asit çözeltileri kullanılarak çizilen kalibrasyon denkleminde yararlanılarak gallik asit derişimleri ve buna bağı olarak adsorpsiyon kapasitesi aşığıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

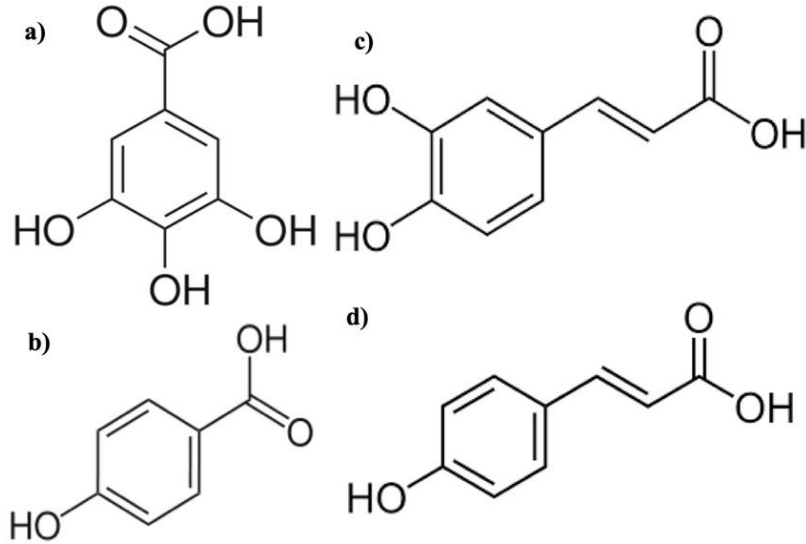
$$Q = (C_0 - C_d) \times V / m \quad (1)$$

Formülde gösterilen C_0 ve C_d sırayla başlangıç ve denge gallik asit derişimlerini (mg/L), V adsorpsiyon hacmini (L) ve m polimer miktarını (g) ifade etmektedir.

Denge süresini kontrol eden adsorpsiyon kinetiklerinden; yalancı-birinci ve yalancı-ikinci merteye kinetikleri, Elovich eşitliğı ve partikül içi difüzyon modeli GA adsorpsiyon hızının tanımlanması amacıyla uygulanmıştır. Adsorpsiyon izotermeleri, denge durumunda adsorban ile adsorplanan arasındaki etkileşimin belirlenmesi için kullanılmaktadır. Bu amaçla Langmuir, Freundlich, Temkin ve Dubinin-Redushkevich izotermeleri başlangıç derişimi etkisi verileri kullanılarak incelenmiştir.

2.6. Seçicilik çalışmaları

GA-MIP’lerin seçiciliğinin belirlenmesi için GA’nın analogları olan HB, KA ve PCA ile yarışmalı adsorpsiyonu çalışmaları yapılmıştır. GA ve analoglarının molekül yapıları Şekil 1’de verilmiştir.



Şekil 1. GA^a, HB^b, KA^c ve PCA^d yapılarının molekül şekilleri.

GA ve analoglarının nicel analizi için Hu vd’nin çalışmasındaki metot kullanılmıştır [29]. GA, HB, KA ve PCA’nın kromatografik analizleri Agilent 1260 infinity diode array dedektörü içeren Agilent 1290 infinity UHPLC sistemi ile sabit faz olarak Zorbax SB-fenil (150 mm, iç çap:4,6 mm, 5 µm partikül boyutlu, 80Å por çaplı gözenekli silika) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak H₂O içerisinde %0,4’lük HAC (A) ile MeOH içerisinde %0,4’lük HAC (B) karışımı şeklinde doğrusal aşamalı değışim elüsyonu ile kullanılmıştır. 0-30 dk arasında B %20-30 olacak şekilde 0,8 mL/dk akış hızında çalışılmıştır. GA ve HB için 260 nm’de, KA ve PCA için 312 nm’de spektrumlar alınmıştır. Bu koşullarda, GA, HB, KA ve PCA için sırayla Rt süreleri 3,2; 6,7; 9,4 ve 14,9 dk olarak belirlenmiştir.

GA-MIP'lerin seçiciliğini belirlemek amacıyla seçicilik katsayısı (K) ve bağıl seçicilik (K') değerleri GA, HB, KA ve PCA için dağılım katsayısı (K_d) değerleri kullanılarak hesaplanmıştır. Formüllerdeki, K_d (L/g), Q (mg/g) ve C_e (mg/L) birimlerindedir.

$$K_d = Q/C_e \quad (2)$$

$$K = K_d(GA)/K_d(GA \text{ analogları}) \quad (3)$$

$$K' = K(GA-MIP)/K(GA-NIP) \quad (4)$$

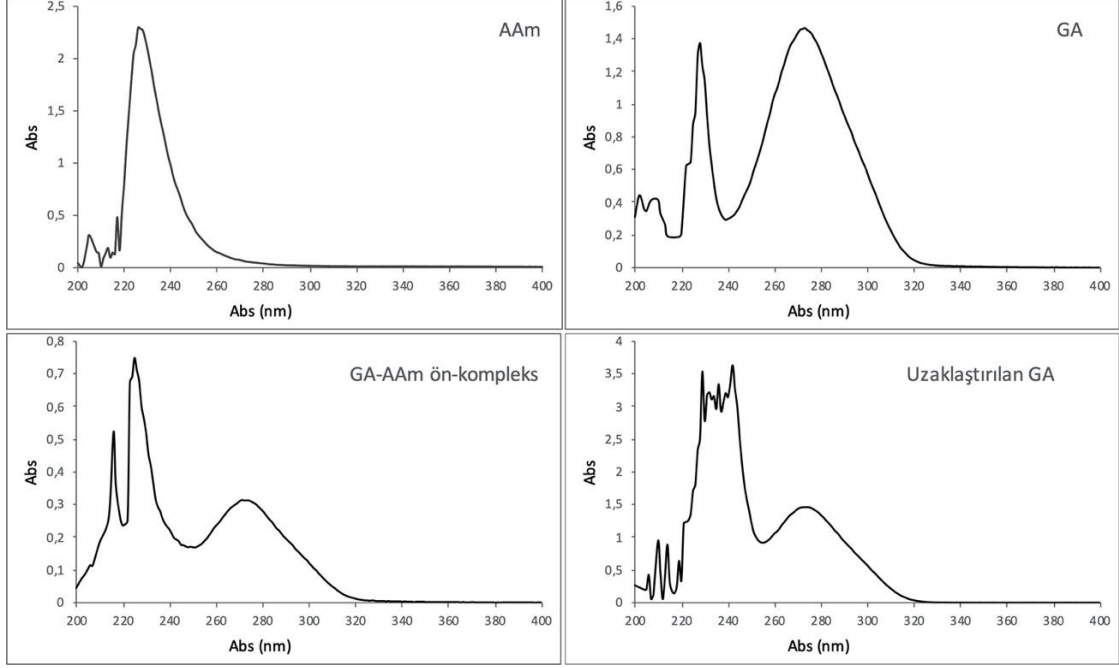
2.7. Gerçek örneklerden GA-MIP'ler ile GA uzaklaştırılması

GA meyve ve meyve suyunda, şarap, likör gibi alkollü içeceklerde, karnabahar, patlıcan, hindiba gibi sebzelerde, adaçayı, dağ kekiği, karanfil gibi bitkilerde, demleme çay, ham kestane ve sirke gibi ürünlerde değişen miktarlarda bulunmaktadır. Çalışmada kullanılmak üzere bu ürünlerden, yeşil ve siyah çay ve karanfil günlük hayatta bolca kullanılan ürünler oldukları ve GA içerikleri yüksek olduğu için tercih edilmiştir. Tüm ürünler ticari olarak yerel marketlerden satın alınmış ve çay örnekleri suda [36], karanfil örneği ise metanol içerisinde [37] ekstrakte edilmiştir. Yeşil ve siyah çay örnekleri 10 g tartılıp üzerlerine 100 mL kaynar su eklenmiştir. Örnekler, 5 dk demlendikten sonra süzülüp soğutulmuş ve adsorpsiyon deneylerinde kullanılmıştır. Karanfil tomurcukları 4 g tartılıp havanda öğütülmüş ve 40 mL metanol içerisine alınarak 1 saat kapalı kaptaki karıştırıldıktan sonra süzülerek adsorpsiyon deneylerinde kullanılmıştır. Adsorpsiyon deneyleri, optimizasyon deneylerindeki koşullarda gerçekleştirilmiş ve GA derişimleri HPLC'de tayin edilmiştir. GA-MIP'ler üzerine adsorplanan GA'nın geri alımı için santrifüjlenen GA-MIP'ler geri-süspanse edilmiş ve GA'nın geri alımı işlemi 2 kez 10 mL MeOH içerisinde hazırlanan 1 M NaCl kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3. Sonuçlar ve tartışma

3.1. GA-AAm ön-kompleksinin ve GA-MIP, GA-NIP'lerin karakterizasyonu

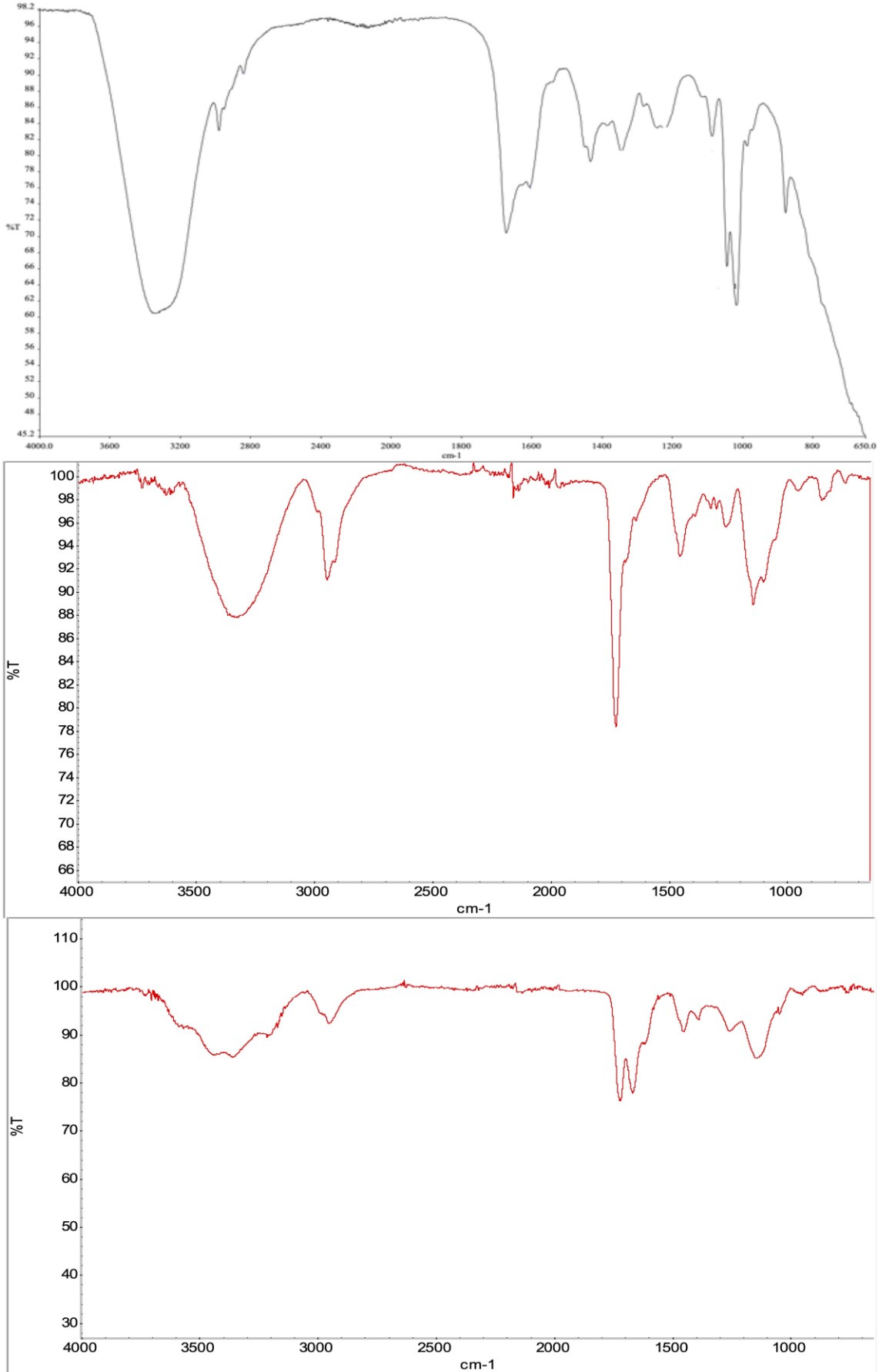
Kalıp molekül GA, monomer AAm, AAm'nin hazırlanan ön-kompleks ve kalıp uzaklaştırma çözeltisine ait UV spektrumları Şekil 2'de verilmiştir.



Şekil 2. GA, AAm, GA-AAm ön-kompleksi ve kalıp uzaklaştırma çözeltisine ait Uv-spektrumları.

Şekil 2'deki Uv-spektrumları incelendiğinde, maksimum absorpsiyonun AAm için 225 nm; GA için 230 ve 270 nm'lerde olduğu gözlenmektedir. GA-AAm ön-kompleksi için 216, 225 ve 270 nm'lerde gözlenen piklerin hem AAm hem GA yapılarına ait olduğu düşünülmekte, kompleks oluşumu nedeniyle 220-230 nm civarındaki piklerde küçük kaymalar olduğu gözlenmektedir. Kalıp uzaklaştırma çözeltisinin Uv spektrumunda 270 nm'de gözlenen pikin GA'ya ait olduğu ve kalıp molekülün başarılı şekilde uzaklaştırıldığı gözlenmektedir. Kalıp uzaklaştırma çözeltisinde metanol, asetik asit ve polimerizasyon çözeltisine katılmayan monomer ve çarpaz bağlayıcı bulunması nedeniyle farklı pikler de gözlenmektedir.

GA-AAm ön-kompleksi, GA-MIP ve GA-NIP için FTIR spektrumları kaydedilmiş ve Şekil 3'te verilmiştir.



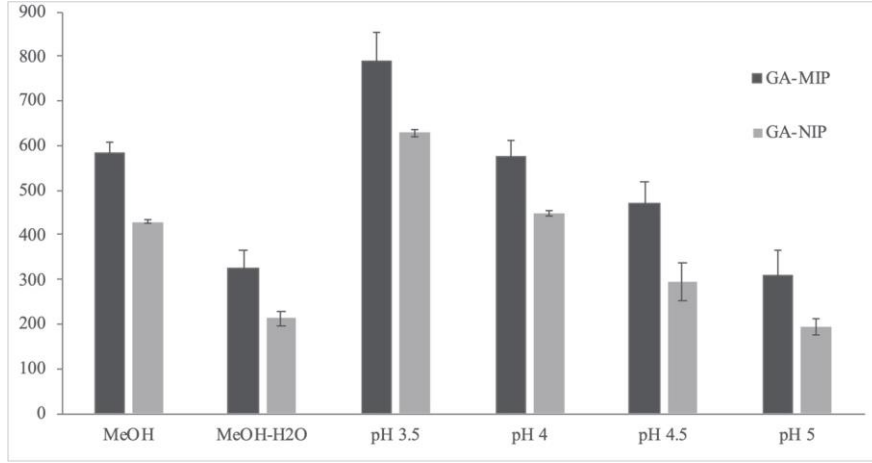
Şekil 3. GA-AAm ön-kompleksi^a, GA-MIP^b ve GA-NIP^c çin FTIR spektrumları.

GA-AAm ön-kompleksine ait spektrum incelediğinde, 3340 ve 2980 cm^{-1} 'de gözlenen bantların GA'nın H-bağı yapmış ve serbest -OH gruplarına, 1670 cm^{-1} 'de ve 1030 cm^{-1} civarı gözlenen ikili bandın sırayla GA'nın -C=O ve -C-O gerilmelerine ait olduğu düşünülmektedir. 1604 cm^{-1} 'de omuz şeklinde ve 1430 cm^{-1} 'de görülen bantların AA'min -C=C gerilmesine ve alifatik -C-H gerilmelerine ait olduğu düşünülmektedir. GA-MIP'e ait spektrum incelendiğinde, polimerizasyonda eklenen diğer bileşenlerin etkisiyle GA-AAm ön-kompleksine kıyasla -OH gruplarına ait bant şiddetinde azalma -C-H gerilme bantlarının şiddetinde artış ve polimerizasyon sonucunda -C=C gerilme bandının kaybolduğu gözlenmektedir. GA-NIP'e ait spektrum incelendiğinde, 3450 cm^{-1} civandaki ikili zayıf bandın primer amin gerilmesine ait olduğu görülmektedir. 1715, 1665 ve 1140 cm^{-1} 'lerdeki bantların sırayla -C=O gerilme, -N-H eğilme ve -C-N eğilme titreşimlerine ait olduğu öngörülmektedir. GA-NIP'nin spektrumunda C=O ve -N-H eğilme bantları benzer şiddetine sahipken, GA'nın GA-MIP yapısına katılmasıyla -C=O gerilme bant şiddetinin -N-H eğilme şiddetine göre arttığı gözlenmektedir. -N-H eğilme bant şiddetindeki azalma, AA'min NH_2 grubu üzerinden H-bağlarıyla ön-kompleks oluşturması ile açıklanabilir.

Parçacık boyutu ve boy dağılımı analizleri sonucunda GA-MIP'lerin parçacık boyutu 285 ± 7 nm, polidispersite indeksi (PdI) $0,22 \pm 0,02$; GA-NIP'lerin parçacık boyutu 337 ± 3 nm, PdI $0,03 \pm 0,01$ olarak ölçülmüştür. PdI değeri 0-1 aralığında değişmekte ve PdI $<0,1$ durumunda partikül dağılımındaki homojenitenin yüksek olduğunu göstermektedir. GA-NIP'ler için PdI $<0,1$ olarak belirlenmesi eş-boyutlu partikül dağılımını göstermektedir [38]. GA-MIP'ler için PdI $>0,1$ olması kalıp uzaklaştırma işlemleri sırasında GA-MIP'lerin çokça kez santrifüjlenip geri-süspansiyon edilmesi nedeniyle meydana gelen agregasyonlar ile açıklanabilir [39]. Zeta potansiyel değerleri GA-MIP'ler için $-4,09 \pm 0,13$ mV; GA-NIP'ler için $-3,29 \pm 0,26$ mV olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlar, hem GA-MIP hem GA-NIP'lerin yüzey yüklerinin (-) olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, zeta potansiyel değerlerinin 0-5 mV aralığında olması (- veya +) partiküllerin koagülasyon hızının yüksek olduğunu ve partikül stabilitesinin düşük olduğunu göstermektedir [40].

3.2. GA adsorpsiyonunun optimizasyonu

GA-MIP ve GA-NIP'ler üzerine GA adsorpsiyonuna çözücü etkisinin belirlenmesi için 1000 ppm GA çözeltisi ve 1,2 mg MIP veya NIP kullanılarak 90 dk süreyle incelenmiştir ve sonuçlar Şekil 4'te verilmiştir. Şekil 4 incelendiğinde, en yüksek adsorpsiyon kapasitesi pH 3,5'de belirlenmiştir. GA 4,40 pKa değerine sahiptir ve bu değer altındaki pH değerlerinde GA'nın fonksiyonel grupları protone olmuş haldedir. GA-MIP ve GA-NIP yapılarının yüzey yükleri de (-) olduğundan düşük pH değerinde adsorpsiyonu kapasitesinin yüksek olması iyonik etkileşimlerin artması ile açıklanabilir.



Şekil 4. GA-MIP ve GA-NIP yapıları üzerine GA adsorpsiyonuna çözücü etkisi.

GA adsorpsiyonu 10-90 dk aralığında 1000 ppm GA ve 1,2 mg MIP veya NIP kullanılarak 90 dk süreyle incelenmiştir ve sonuçlar Şekil 5a'da verilmiştir. Şekil 5a'da görüldüğü üzere, adsorpsiyonu kapasitesi zaman ile doğrusal olarak artmış, 60 dk'da denge değerine ulaşmıştır. Bu nedenle, sonraki tüm deneylerde etkileşim süresi 60 dk olarak çalışılmıştır. Elde edilen veriler yalancı-birinci ve yalancı-ikinci mertebe kinetikleri, Elovich eşitliği ve partikül içi difüzyon modeline uygulanmış, elde edilen regresyon katsayısı ve kinetik parametreleri Tablo 1'de verilmiştir. Tablo 1'de verilen adsorpsiyon izotermine ait regresyon katsayısı değerleri incelendiğinde, GA-MIP'ler üzerine GA adsorpsiyonunun yalancı-birinci mertebe kinetiğine ve partikül-içi difüzyon modeline uyduğu görülmektedir. Partikül-içi difüzyon modeli, difüzyon mekanizmasını açıklamada daha detaylı bilgi sağlamaktadır. Hesaplanan C_i değerinin büyük olması, daha büyük sınır katmanını ifade etmektedir.

Polimer miktarının etkisini incelemek amacıyla, 0,6-2,4 mg aralığında çalışılmış ve sonuçlar Şekil 5b'de verilmiştir. En yüksek GA adsorpsiyonu kapasitesi 1,2 mg GA-MIP değerlerinde belirlenmiş, artan polimer miktarlarında GA-MIP üzerine adsorplanan GA miktarı değişmediği için adsorpsiyonu kapasitesinde keskin bir düşüş belirlenmiştir.

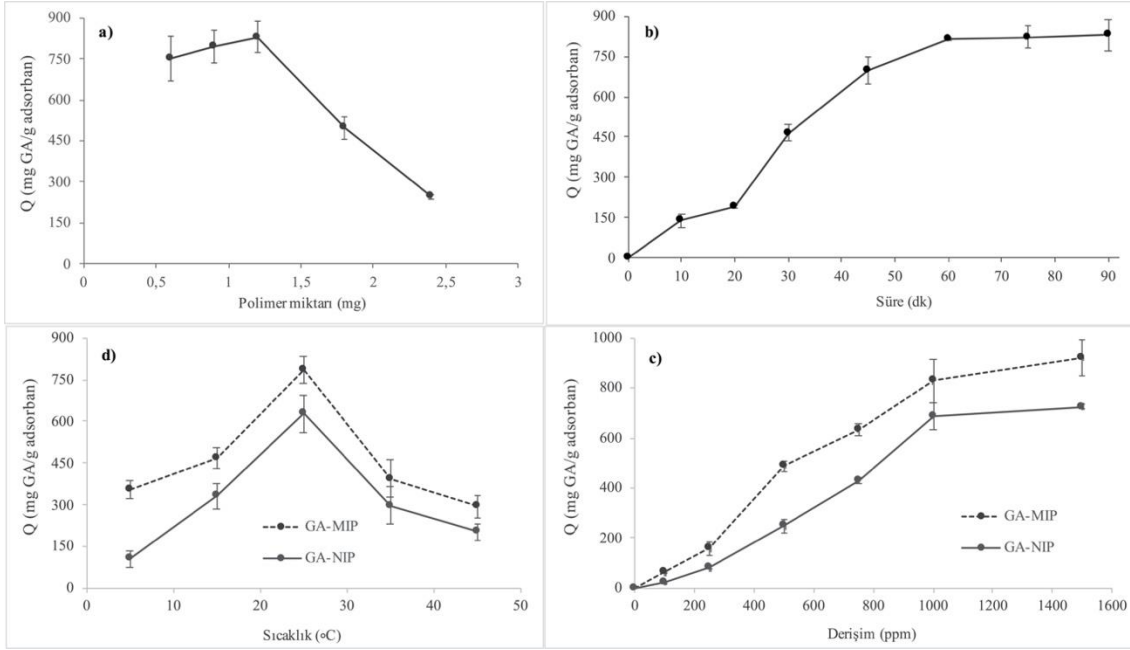
Başlangıç derişiminin etkisi 100-1500 ppm aralığında farklı derişimlerdeki GA çözeltileriyle 1,2 mg MIP veya NIP kullanılarak 60 dk sürede çalışılmış ve sonuçlar Şekil 5c'de görülmektedir. GA adsorpsiyonu, artan GA derişimiyle artmakta ve GA-MIP ve GA-NIP için maksimum adsorpsiyon kapasiteleri $921,2 \pm 72,1$ ve $725,0 \pm 8,9$ mg GA/g adsorban olarak belirlenmiştir. Elde edilen veriler Langmuir, Freundlich, Temkin ve Dubinin-Redushkevich izotermine uygulanmış ve izotermine ait parametreler ve regresyon katsayısı değerleri Tablo 1'de verilmiştir. Tablo 1'de verilen regresyon katsayısı değerleri incelendiğinde, GA-MIP'ler üzerine GA adsorpsiyonunun Freundlich izotermine uyduğu görülmektedir. Bu izoterm, heterojen yüzey adsorpsiyonunu ve $n_f > 1$ olması kooperatif adsorpsiyonu göstermektedir. Heterojen yüzey adsorpsiyonu, güçlü bağlanma bölgelerinin ilk önce dolduğunu ve sonrasında bağlanma gücünün azaldığını açıklamaktadır. Temkin izotermine ait regresyon katsayısının yüksek olması, GA adsorpsiyonunda GA-MIP ve GA arasındaki ilişkinin bu izoterm parametreleriyle açıklanabileceğini göstermektedir. Adsorpsiyon ısıyla ilgili olan Temkin sabiti (B) ve maksimum bağlanma enerjisine bağlı denge bağlanma sabiti (A) değerleri hesaplanmıştır.

Tablo 1. GA-MIP'lere GA adsorpsiyonu için adsorpsiyon kinetik ve izotermi.

ADSORPSİYON KİNETİK MODELLERİ				
Yalancı-Birinci Mertebe Kinetik Model				
$q_{e, \text{deneysel}} \text{ (mg/g)}$	$q_{e, \text{hesaplanan}} \text{ (mg/g)}$	$k_1 \text{ (1/h)}$	R^2	
821,7	1413,6	5,272	0,9265	
Yalancı-İkinci Mertebe Kinetik Model				
$q_{e, \text{hesaplanan}} \text{ (mg/g)}$	$k_2 \text{ (g/mg saat)}$	$t_{1/2} \text{ (dk)}$	$h_{0,2} \text{ (mg/g dk)}$	R^2
1428,6	$3,06 \times 10^{-4}$	137	10,42	0,2879
Elovich Eşitliği				
$1/\beta \ln(\alpha\beta) \text{ (mg/g)}$	$\alpha \text{ (mg/g saat)}$	$\beta \text{ (g/mg)}$	R^2	
425,6	2841,5	$2,3 \times 10^{-3}$	0,9130	
Partikül-içi Difüzyon Modeli				
$k_{pi} \text{ (mg/g h}^{1/2}\text{)}$	C_i		R^2	
161,6	429,7		0,9565	
ADSORPSİYON İZOTERM MODELLERİ				
Langmuir İzotermi				
$q_e \text{ (mg/g)}$	$L \text{ (L/mg)}$	$q_m \text{ (mg/g)}$	R_L	R^2
921,2	$2,5 \times 10^{-4}$	$3,33 \times 10^6$	0,8	0,5768
Freundlich İzotermi				
n_f	$K_f \text{ (mg/g)}$		R^2	
1,119	1166,5		0,9848	
Temkin İzotermi				
$A \text{ (L/g)}$	b_T	$B \text{ (J/mol)}$	R^2	
8,96	8,09	306,4	0,9877	
Dubinini-Redushkevich İzotermi				
$B \text{ (mol}^2\text{/J}^2\text{)}$	$X_m \text{ (mg/g)}$	$E \text{ (kJ/mol)}$	R^2	
6×10^{-8}	4452	2,89	0,9377	

MIP'ler için seçiciliği gösteren faktörlerden biri baskılama faktörü (IF), Q(MIP)'in Q(NIP)'ye oranı şeklinde ifade edilmektedir. Farklı derişimlerdeki IF değerleri hesaplanmış ve Tablo 2'de verilmiştir. Düşük derişimlerde GA-MIP'lerin GA-NIP'lere göre daha seçici olarak GA adsorpladığı belirlenmiş, artan GA derişimlerinde spesifik olmayan etkileşimler nedeniyle IF değerlerinde düşüş olduğu düşünülmektedir. Bu sebeple seçicilik çalışmaları 100 ppm GA ve 100 ppm GA analogu kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Sıcaklık, adsorpsiyonu etkileyen önemli parametrelerden biri olduğundan, 5-45°C aralığında çalışılarak sıcaklığın etkisi belirlenmiş ve Şekil 5d'de gösterilmiştir. GA adsorpsiyon kapasitesinin 5°C'den 25°C'ye artan sıcaklık ile 2,23 kat arttığı ve GA adsorpsiyonu için optimum sıcaklığın 25°C olduğu belirlenmiştir. Sıcaklık artışı ile GA adsorpsiyonundaki artış, moleküller arası zayıf etkileşimlerin artışıyla açıklanabilir. Buna karşılık, 25°C'den 45°C'ye artan sıcaklık ile adsorpsiyon kapasitesinde 2,67 katlık bir düşüş gözlenmiştir. Sıcaklık artışı ile moleküllerin kinetik enerjilerinin artışı sterik engellemelere ve etkileşimlerin azalmasına neden olabileceğinden GA adsorpsiyonunda azalma gözlenmiş olabilir.



Şekil 5. GA-MIP yapıları üzerine GA adsorpsiyonuna süre^a, polimer miktarı^b, başlangıç derişimi^c ve sıcaklık^d etkisi.

3.3. Seçicilik çalışmaları

GA'nın analogları olan HB, KA ve PCA ile yarışmalı adsorpsiyonu sonuçları ile her bileşen için K_d değerleri hesaplanmıştır. GA-MIP ve GA-NIP'ler için K değerleri ve buna bağlı olarak K' değerleri hesaplanmış ve Tablo 2'de verilmiştir. Tablo 2 incelendiğinde, K değerlerinin 1'den yüksek olması GA-MIP'lerin GA'yı HB ve KA analoglarına göre daha yüksek miktarda adsorpladığını göstermektedir. GA-MIP'lerin PCA'yı GA'ya göre daha yüksek miktarda adsorplaması spesifik olmayan etkileşimlerin fazla olması ile açıklanabilir. GA-NIP'ler için tüm K değerlerinin <1 olması GA analoglarını GA'ya göre daha yüksek miktarda adsorpladığını göstermektedir. Tüm bağıl seçicilik katsayılarının >1 olması GA-MIP'lerin GA-NIP'lere göre GA'yı tüm analoglarından daha fazla adsorpladığını göstermektedir.

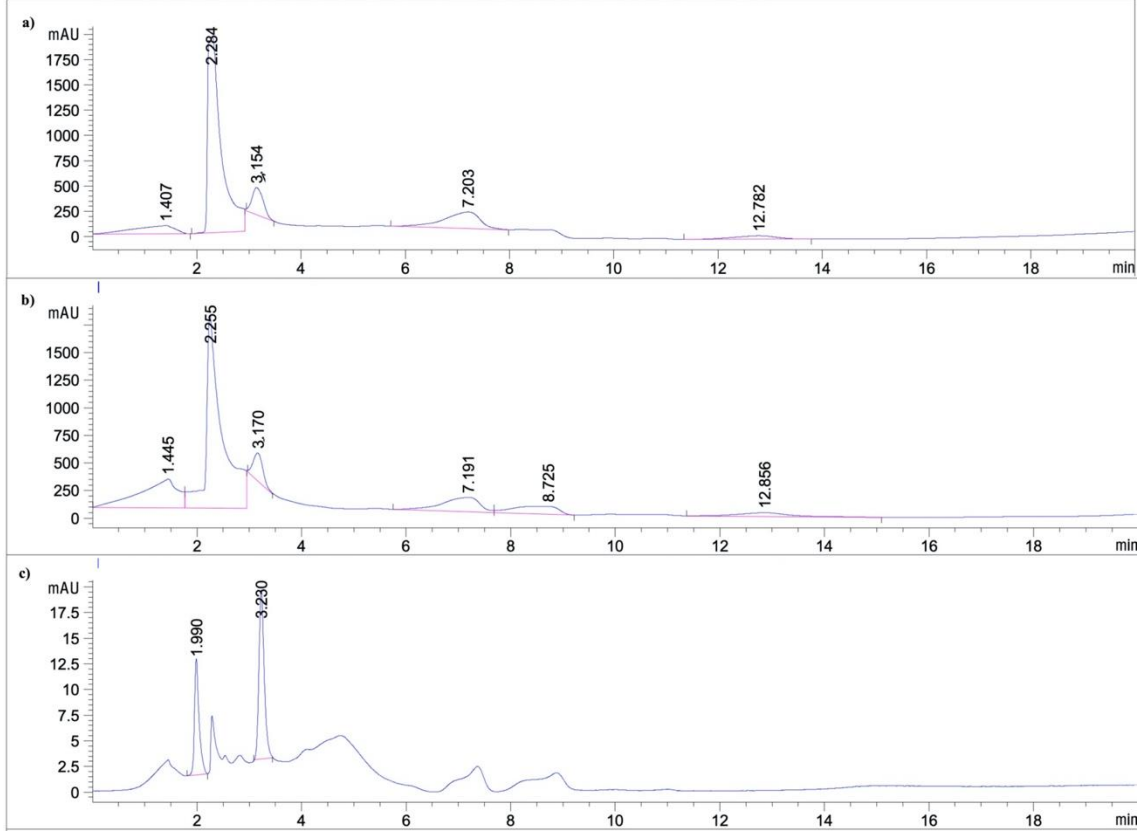
Tablo 2. Baskılama faktörü (IF), seçicilik katsayısı ve bağıl seçicilik değerleri.

IF değerleri	100 ppm	250 ppm	500 ppm	750 ppm	1000 ppm	1500 ppm
Q(MIP)/Q(NIP)	2,71	1,96	1,97	1,48	1,13	1,27
	K (MIP)		K (NIP)		K'	
GA-HB	1,63		0,43		3,80	
GA-KA	1,64		0,36		4,57	
GA-PCA	0,48		0,22		2,24	

3.4. Gerçek örneklerden GA-MIP'ler ile GA uzaklaştırılması

Yeşil çay, siyah çay ve karanfil örnekleri ile yapılan adsorpsiyon deneyleri sonucu elde edilen Q değerleri sırayla, 1,5; 27,0 ve 43,2 mg/g GA-MIP olarak hesaplanmıştır. Yeşil çay örneklerinden GA adsorpsiyonunun siyah çay örneklerine kıyasla düşük olması yeşil çay ve siyah çay örneklerinin ortam pH'larının farklı olmasıyla açıklanabilir. Yeşil çayın ortam pH'sı 7-10 aralığında değişirken, siyah çayın ortam pH'sı 4-5 civarındadır. Çözücü etkisi sonuçlarına göre, pH değeri arttıkça GA adsorpsiyonunun azaldığı

gözlenmekte, bu nedenle yeşil çay örneklerinden GA adsorpsiyonunun düşük olduğu düşünülmektedir. GA-MIP'lerden geri alım işlemi sonucunda % geri alım oranları %63,5; %60,7 ve %95,3 olarak belirlenmiştir. En etkin GA adsorpsiyon ve geri alım işleminin karanfil örneğiyle gerçekleştiği belirlenmiştir. Karanfil örneklerinin adsorpsiyon öncesi ve sonrasına, ve geri alma çözeltilisine ait HPLC kromatogramları Şekil 6'da görülmektedir. Şekil 6c incelendiğinde, geri alma çözeltilisinde GA'ya ait pik 3.2 dk'da görülmekte ve seçici şekilde GA'nın geri alındığı gözlenmektedir.



Şekil 6. Karanfil örneklerinin adsorpsiyon öncesi^a, adsorpsiyon sonrası^b ve geri alma çözeltililerine ait HPLC kromatogramları.

GA, farmasötik ve biyomedikal endüstrilerinde çok kullanılan doğal antioksidanlardan biridir. Anti-bakteriyel, anti-viral, kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu, anti-inflamatuar, anti-tümör, anti-oksidan gibi etkileri nedeniyle besinlerde, ilaçlarda ve kozmetik ürünlerinde yaygın olarak kullanılmakta ve bu nedenle, dünya genelindeki yıllık talebi oldukça yüksektir. GA üretimi için yüksek miktarlarda kimyasal gerekmede ve toksik atıklara neden olmaktadır. Meyve ve çeşitli bitkilerde bol miktarda bulunmasına rağmen, doğal materyallerin kompleks yapısı nedeniyle GA'nın seçici olarak ekstraksiyonu mümkün değildir. Bu nedenle, doğal kaynaklarından seçici olarak GA'nın ayrılması için MIP'ler gibi fonksiyonel materyaller kullanılması önem kazanmaktadır. Yapılan çalışmada, AAM monomeri kullanılarak emülsiyon polimerizasyonu yöntemiyle GA baskılanmış ve baskılanmamış polimerik yapılar hazırlanmış ve karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. GA adsorpsiyonunun optimizasyon deneylerinde, MIP'lerin seçiciliğini gösteren IF faktörünün tüm derişimlerde 1'de büyük olduğu belirlenmiş, bu durum MIP'lerin NIP'lere göre GA'yı daha seçici adsorpladığını göstermektedir. GA'nın analogları olan HB, KA ve PCA ile yarışmalı adsorpsiyonu çalışmaları sonucunda tüm analoglar için bağıl seçicilik değerlerinin 2-4

aralığında olması GA baskılama işleminin başarıyla gerçekleştirildiğini kanıtlamaktadır. GA içeriği bakımından zengin olan yeşil, siyah çay ve karanfil örnekleri kullanılarak gerçek örnek uygulamaları yapılmış, özellikle karanfil örneklerinde GA seçici adsorpsiyonunun ve geri alımının yüksek değerlere sahip olduğu belirlenmiştir. Geri alım çözeltisinin HPLC kromatogramında GA'ya ait pik dışında pik bulunmaması GA-MIP'lerin seçici adsorpsiyonunu kanıtlamaktadır. Kolay, hızlı bir yöntemle hazırlanan GA-MIP'lerden oldukça düşük miktarlarda kullanılarak seçici olarak GA'nın uzaklaştırılması/saflaştırılması, MIP'lerin endüstriyel amaçlı kullanımı için öncül niteliktedir.

Kaynaklar

- [1] Hsieh, S. C., Wu, C. C., Hsu, S. L. ve Yen, J. H., Molecular mechanisms of gallic acid-induced growth inhibition, apoptosis, and necrosis in hypertrophic scar fibroblasts, **Life Sciences**, 179, 130- 138, (2017).
- [2] Bhawani, S. A., Sen, T. S. ve Ibrahim, M. N. M., Synthesis of molecular imprinting polymers for extraction of gallic acid from urine, **Chemistry Central Journal**, 12,19-25, (2018).
- [3] Abdel-Hamid, R., Bakr, A., Newair, E. F. ve Garcia, F., Simultaneous voltammetric determination of gallic and protocatechuic acids in mango juice using a reduced graphene oxide-based electrochemical sensor, **Beverages**, 5, 17-28, (2019).
- [4] Badea, M., Modugno, F., Floroian, L., Tit, D. M., Restani, P., Bungau, S., Iovan, C., Badea, G. E. ve Aleya, L., Electrochemical strategies for gallic acid detection: Potential for application in clinical, food or environmental analyses, **Science of the Total Environment**, 672, 129-140, (2019).
- [5] Vissers, M. N., Zock, P. L. ve Katan, M. B., Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: a review, **European Journal of Clinical Nutrition**, 58, 955-965, (2004).
- [6] Zhu, X. F., Cao, Q. E., Yang, X. Q., Li, F., Wang, G. S. ve Ding, Z. T., Preparation and recognition mechanism of gallic acid imprinted polymers, **Helvetica**, 92(1), 78-87, (2009).
- [7] Dos Santos, J. F. S., Tintino, S. R., de Freitas, T. S., Campina, F. F., de Menezes, I. R., Siqueira- Júnior, J. P., Coutinho, H. D. M. ve Cunha, F. A. B., In vitro e in silico evaluation of the inhibition of *Staphylococcus aureus* efflux pumps by caffeic and gallic acid, **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, 57, 22–28, (2018).
- [8] You, H. L., Huang, C. C., Chen, C. J., Chang, C. C., Liao, P. L. ve Huang, S. T., Anti-pandemic influenza A (H1N1) virus potential of catechin and gallic acid, **Journal of the Chinese Medical Association**, 81, 458-468, (2018).
- [9] Abdel-Hamid, R. ve Newair, E. F., Adsorptive stripping voltammetric determination of gallic acid using an electrochemical sensor based on polyepinephrine/glassy carbon electrode and its determination in black tea sample, **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 704, 32-37, (2013).
- [10] Asfaram, A., Ghaedi, M. ve Dashtian, K., Rapid ultrasound-assisted magnetic microextraction of gallic acid from urine, plasma and water samples by HKUST-1-MOF-Fe₃O₄-GA-MIP-NPs: UV–vis detection and optimization study, **Ultrasonics Sonochemistry**, 34, 561-570, (2017).

- [11] Mudnic, I., Modun, D., Rastija, V., Vukovic, J., Brizic, I., Katalinic, V., Kozina, B., Medic-Saric, M. ve Boban, M., Antioxidant and vasodilatory effects of phenolic acids in wine, **Food Chemistry**, 119, 1205–1210, (2010).
- [12] Lim, K. S., Park, J. K., Jeong, M. H., Bae, I. H., Park, D. S., Shim, J. W., Kim, J. H., Kim, H. K., Kim, S. S., Sim, D. S., Hong, Y. J., Kim, J. H. ve Ahn, Y., Anti-inflammatory effect of gallic acid-eluting stent in a porcine coronary restenosis model, **Acta Cardiologica Sinica**, 34, 224-232, (2018).
- [13] Zhang, J., Li, B., Yue, H., Wang, J. ve Zheng, Y., Highly selective and efficient imprinted polymers based on carboxyl-functionalized magnetic nanoparticles for the extraction of gallic acid from pomegranate rind, **Journal of Separation science**, 41(2), 417-602, (2018).
- [14] Asnaashari, M., Farhoosh, R. ve Sharif, A., Antioxidant activity of gallic acid and methyl gallate in triacylglycerols of Kilka fish oil and its oil-in-water emulsion, **Food Chemistry**, 159, 439-444, (2014).
- [15] Hsu, S. S., Chou, C. T., Liao, W. C., Shieh, P., Kuo, D. H., Kuo, C. C., Jan, C. R. ve Liang, W. Z., The effect of gallic acid on cytotoxicity, Ca²⁺ homeostasis and ROS production in DBTRG-05MG human glioblastoma cells and CTX TNA2 rat astrocytes, **Chemico-Biological Interactions**, 252, 61-73, (2016).
- [16] Suwalsky, M., Colina, J., Gallardo, M. J., Jemiola-Rzeminska, M., Strzalka, K., Manrique-Moreno, M. ve Sepúlveda, B., Antioxidant capacity of gallic acid in vitro assayed on human erythrocytes, **The Journal of Membrane Biology**, 249, 769-779, (2016).
- [17] Huang, D. W., Chang, W. C., Wu, J. S., Shih, R. W. ve Shen, S. C., Gallic acid ameliorates hyperglycemia and improves hepatic carbohydrate metabolism in rats fed a high-fructose diet, **Nutrition Research**, 36, 150-160, (2016).
- [18] Kong, F., Su, Z., Guo, X., Zeng, F. ve Bi, Y., Antidiabetic and lipid-lowering effects of the polyphenol extracts from the leaves of *Clausena lansium* (Lour.) skeels on streptozotocin-induced type 2 diabetic rats, **Journal of Food Science**, 83, 212-220, (2018).
- [19] Civenni, G., Iodice, M. G., Nabavi, S. F., Habtemariam, S., Nabavi, S. M., Catapano, C. V. ve Daglia, M., Gallic acid and methyl-3-O- methyl gallate: a comparative study on their effects on prostate cancer stem cells, **RSC Advances**, 5, 63800-63806, (2015).
- [20] Chen, Y. J., Lee, Y. C., Huang, C. H. ve Chang, L. S., Gallic acid-capped gold nanoparticles inhibit EGF-induced MMP-9 expression through suppression of p300 stabilization and NFκB/c-Jun activation in breast cancer MDA-MB-231 cells, **Toxicology and Applied Pharmacology**, 310, 98-107, (2016).
- [21] Heidarian, E., Keloushadi, M., Ghatreh-Samani, K. ve Valipour, P., The reduction of IL-6 gene expression, pAKT, pERK1/2, pSTAT3 signaling pathways and invasion activity by gallic acid in prostate cancer PC3 cells, **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 84, 264-269, (2016).
- [22] Kim, S. H., Jun, C. D., Suk, K., Choi, B. J., Lim, H. J., Park, S., Lee, S. H., Shin, H. Y., Kim, D. K. ve Shin, T. Y., Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine production in mast cells, **Toxicological Sciences**, 91, 123-131, (2006).
- [23] Kim, Y. J., Antimelanogenic and antioxidant properties of gallic acid, **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 30, 1052-1055, (2007).
- [24] Jagan, S., Ramakrishnan, G., Anandakumar, P., Kamaraj, S. ve Devaki, T., Antiproliferative potential of gallic acid against diethylnitrosamine-induced rat

- hepatocellular carcinoma, **Molecular and Cellular Biochemistry**, 319, 51-59, (2008).
- [25] Costa, A. M., Souza, C. G. M., Brach, A., Kadowski, M. K., Souza, A. C. S., Oliveira, R. F. ve Peralta, R. M., Production of tannase and gallic acid by *Aspergillus tamarii* in submerged and solid state cultures, **African Journal of Biomedical Research**, 7, 197-202, (2013).
- [26] Bajpai, B. ve Patil, S., A new approach to microbial production of gallic acid, **Brazilian Journal of Microbiology**, 39, 708-711, (2008).
- [27] Lokeshwari, N. ve Reddy, S. Microbiological production of gallic acid by a mutant strain of *Aspergillus oryzae* using cashew husk, **Pharmacophore**, 1, 112-122, (2010).
- [28] Pardeshi, S., Dhodapkar, R. ve Kumar, A., Molecularly imprinted microspheres and nanoparticles prepared using precipitation polymerisation method for selective extraction of gallic acid from *Embllica officinalis*, **Food Chemistry**, 146, 385-393, (2014).
- [29] Hu, X., Xie, L. W., Guo, J. F., Li, H., Jiang, X. Y., Zhang, Y. P. ve Shi, S. Y., Hydrophilic gallic acid-imprinted polymers over magnetic mesoporous silica microspheres with excellent molecular recognition ability in aqueous fruit juices, **Food Chemistry**, 179, 206-212, (2015).
- [30] Hao, Y., Gao, R. X., Liu, D. C., Tang, Y. H. ve Guo, Z. J., Selective extraction of gallic acid in pomegranate rind using surface imprinting polymers over magnetic carbon nanotubes, **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 407, 7681-7690, (2015).
- [31] Puoci, F., Scoma, A., Cirillo, G., Bertin, L., Fava, F. ve Picci, N., Selective extraction and purification of gallic acid from actual site olive mill wastewaters by means of molecularly imprinted microparticles, **Chemical Engineering Journal**, 198-199, 529-535, (2012).
- [32] Schwarz, L. J., Danylec, B., Harris, S. J., Boysen, R. I. ve Hearn, M. T. W., Preparation of molecularly imprinted polymers for the selective recognition of the bioactive polyphenol, (E)-resveratrol, **Journal of Chromatography A**, 1218, 2189-2195, (2011).
- [33] Cirillo, G., Parisi, O. I., Curcio, M., Puoci, F., Iemma, F., Spizzirri, U. ve Picci, G. N., Molecularly imprinted polymers as drug delivery systems for the sustained release of glycyrrhizic acid, **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 62, 577-582, (2010).
- [34] Yücebaş, B. B., Yaman, Y. T., Bolat, G., Özgür, E., Uzun, L. ve Abaci, S., Molecular imprinted polymer based electrochemical sensor for selective T detection of paraben, **Sensors & Actuators: B. Chemical**, 305, 127368, (2020).
- [35] Inanan T., Tüzmen, N., Akgöl, S. ve Denizli, A., Selective cholesterol adsorption by molecular imprinted polymeric nanospheres and application to GIMS, **International Journal of Biological Macromolecules**, 92, 451-460, (2016).
- [36] Can Agca A., Batcıoğlu, K. ve Sarer, E., Evaluation of gallic acid, EGCG contents and antiradical activity of green tea and black tea extracts, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 44(1), 50-60, (2020).
- [37] Adaromola, B. ve Onigbinde, A., Effect of extraction solvent on the phenolic content, flavonoid content and antioxidant capacity of clove bud, **IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, 11(3), 33-38, (2016).

- [38] Gaumet, M., Vargas, A., Gurny, R. ve Delie, F., Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 69(1), 1-9, (2008).
- [39] Byun, H. S. ve Chun, D., Adsorption and separation properties of gallic acid imprinted polymers prepared using supercritical fluid technology, **The Journal of Supercritical Fluids**, 120, 2, 249-257, (2017).
- [40] Doostmohammadi, A., Monshi, A., Salehi, R., Fathi, M. H., Golniya, Z. ve Daniels, A. U., Bioactive glass nanoparticles with negative zeta potential, **Ceramics International**, 37, 2311-2316, (2011).