

**Amoksisilin Baskılanmış Yüzey Plazmon Rezonans
Nanosensörler**

**Amoxicillin Imprinted Surface Plasmon Resonance
Nanosensors**

SONA FAALNOURİ

PROF. DR. ADİL DENİZLİ

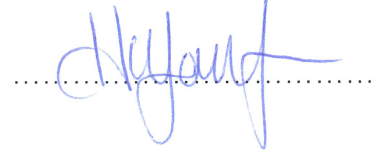
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyomühendislik Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

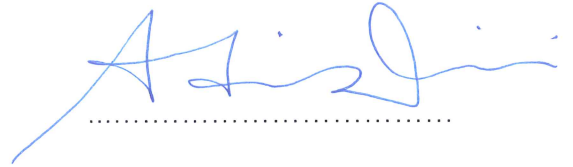
2018

SONA FAALNOURI'nin hazırladığı "Amoksisilin Baskılanmış Yüzey Plazmon Rezonans Nanosensörler" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Biyomühendislik ANABİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

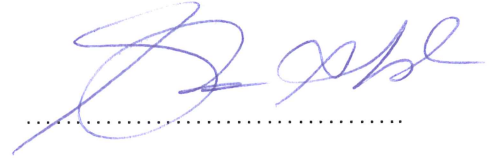
Prof. Dr. Handan YAVUZ ALAGÖZ
Başkan



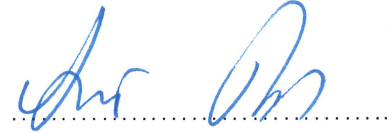
Prof. Dr. Adil DENİZLİ
Danışman



Prof. Dr. Sinan AKGÖL
Üye



Doç. Dr. Deniz TÜRKMEN
Üye



Yrd. Doç. Dr. Eda ÇELİK AKDUR
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

- Tezimin/Raporumun 08/01/2021 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

- Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**

- Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

08 / 01 / 2018

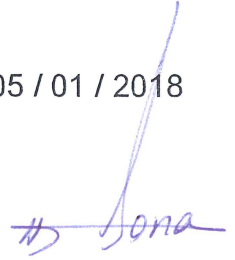

Sona Faalhour

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı beyan ederim.

05 / 01 / 2018



SONA FAALNOURİ

ÖZET

AMOKSİSİLİN BASKILANMIŞ YÜZEY PLAZMON REZONANS NANOSENSÖRLER

Sona FAALNOURİ

Yükseklisans, Biyomühendislik Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Adil DENİZLİ

Ocak 2018, 132 sayfa

Antibiyotikler, bakteriyal enfeksiyonları tedavi etmek ve önlemek amacıyla kullanılan antimikrobiyal ilaçlardır. Bu ilaçlar bakteriyi öldürmekte ya da büyümesini durdurmaktadırlar. Amoksisilin (AMOX) birçok bakteri enfeksiyonunu tedavi etmek için kullanılan antibiyotiktir. Ancak antibiyotik direnci toplum sağlığını kontrol eden organizasyonlar tarafından paylaşılan ciddi bir halk sağlığı meselesidir. Bu nedenle, FDA ve Amerikan Veteriner Hekimler Birliği, antibiyotiklerin hayvansal gıda üretiminde kullanımının azaltılmasını sağlamaktadır.

Bu çalışma kalıntı analizinde geniş antibiyotik kalıntı yelpazesine sahip, çiftlik ve pastörize sütlerinde doğrudan ölçüm yapabilen, kesin ve güvenilir sonuç veren, bir tekniğin araştırılmasını hedeflemiştir.

Biyolojik cevabı elektriksel sinyallere dönüştüren cihazlara "Biyosensör" denir. Biyosensörler bünyesinde biyolojik tanıma elemanı bulunduran ve fizikokimyasal dönüştürücü içeren analitik cihazlardır. Biyosensör alanındaki büyük gelişmelerle birlikte moleküler baskılanmış polimerler (MIP) dönüştürücülerle birleştirilmiş ve tayin edilecek analitle MIP arasındaki etkileşim işlenilebilir bir sinyale dönüştürülmüştür. Bu anlamda yüzey plazmon rezonans (SPR) temelli optik cihazlar büyük bir potansiyele sahiptirler. Bu çalışmada, amoksisilin tayinine yönelik moleküler baskılama tekniği kullanarak, SPR temelli nanosensör hazırlanması amaçlanmıştır. İlk aşamada AMOX ile etkileşerek boşluklar oluşturabilecek fonksiyonel N-metakriloil-(L)-glutamik asidin (MAGA) monomeri sentezlenmiştir. Optimum kalıp molekül belirlemek için, MAGA monomeri ve AMOX oranı, AMOX'in farklı oranlarda MAGA monomeri ile etkileştirilip, UV-görünür bölge spektrofotometre cihazıyla tespit edilmiştir ve optimize edilen bu orana göre nanosensör hazırlama çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Nanosensör hazırlama çalışmaları sırasıyla Mikro-temas yöntemi ile AMOX baskılanmış PHEMAGA (MIP) ve baskılanmamış PHEMAGA (NIP) ince filmi modifiye edilmiş

nanosensörlerin hazırlanması, ayrıca AMOX baskılanmış PHEMAGA (MIP) ve baskılanmamış PHEMAGA (NIP) nanopartiküller modifiye edilmiş nanosensörlerin hazırlanmasıyla iki farklı şekilde gerçekleştirilmiştir.

Hedeflenen derişim aralığına inmek amacıyla çalışmanın ikinci kısmında AMOX baskılanmış PHEMAGA (MIP) nanopartiküller iki fazlı miniemülsiyon polimerizasyon yöntemiyle sentezlenmiştir. Yağ fazı, faz I'e yavaşça eklenmiştir. Karışım, 25.000 rpm de homojenizatörde homojenize edildikten sonra faz II ile karıştırılmıştır. Sodyum bisüfit ve amonyum persülfat başlatıcısının eklenmesinden sonra polimerizasyon işlemi 40°C de 24 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Kontrol deneyleri için AMOX baskılanmadan nanopartiküller aynı koşullarda sentezlenmiştir.

Sentezlenen nanopartiküller, zeta boyut analizi ile karakterize edilmiştir. AMOX baskılanmış PHEMAGA (MIP) ve baskılanmamış PHEMAGA (NIP) nanofilm ve nanopartikül ile hazırlanan SPR nanosensörlerin karakterizasyon çalışmaları FTIR-ATR, Atomik kuvvet mikroskobu (AFM), Temas açısı (CA) ve Elipsometre ölçümleri ile gerçekleştirilmiştir.

AMOX baskılanmış PHEMAGA (MIP) nanofilm ve nanopartikül tutturulmuş SPR nanosensör ile AMOX arasındaki etkileşimlerinin kinetik ve adsorpsiyon modelini belirlemek amacıyla dört farklı izoterm modeli uygulanmıştır: Scatchard, Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich (LF) modelleri.

Bu çalışmanın AMOX tayinine yönelik, mikro-temas yöntemiyle nanofilm tutturularak hazırlanan nanosensörün ve nanopartikül tutturularak hazırlanan nanosensörün avantajlarının karşılaştırılması bakımından, literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Yüzey plazmon rezonans (SPR), Moleküler baskılanmış polimer (MIP), Mikro-temas, Nanopartikül, Amoksisilin.

ABSTRACT

AMOXICILIN IMPRINTED SURFACE PLASMON RESONANCE NANOSENSORS

Sona FAALNOURI

Master of Science, Department of Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Adil DENIZLI

January 2018, 132 pages

Antibiotics are a type of antimicrobial drug used in the treatment and prevention of bacterial infections. They may either kill or inhibit the growth of bacteria. AMOXicillin (AMOX) is also an antibiotic for the treatment of a number of bacterial infections, but antibiotic resistance is a serious public health concern shared by the animal health community. That's why the FDA and American Veterinary Medical Association to ensure the responsible use of antibiotics in animals that produce food.

This study aims to investigate a technique for the antibiotic residue analysis that can detect a wide range of antibiotic residues directly in drinking milk by producing reliable and definitive results.

Devices which convert the biological response to electrical signals are defined as "Biosensors". Biosensor containing biological elements and physicochemical transducers is a type of analytical device. Molecularly imprinted polymers were unified with the transducers through major developments in the field of biosensors and interactions between analyte and MIP can be converted into a processed signal. In this sense, surface plasmon resonance (SPR) based optical devices have a great potential.

In this study, SPR based nanosensors are intended to prepare for the detection of AMOXicillin in milk by using molecular imprinting technique. For this purpose, first N-methacryloyl-(L)-glutamic acid (MAGA) monomer was synthesized, then to define the optimum ratio between template AMOX molecule and MAGA monomer, template molecules and MAGA monomer were mixed in different ratios and the optimum ratio was determined by using UV-visible region spectrophotometry. Nanosensor preparation studies were realized according to the optimized ratio conditions. Nanosensors are prepared in two stages with a micro-contact method by AMOX imprinted nanofilm and by attaching AMOX imprinted nanoparticles to

the gold surface of the chip. For this specified purpose in the first stage, AMOX imprinted PHEMAGA (MIP) nanofilm was attached onto the allyl mercaptan modified gold chip surface by micro-contact method.

In the second part of the study, to work in a targeted concentration range PHEMAGA (MIP) nanoparticles were synthesized by a two-phase mini-emulsion polymerization method. Then the prepared oil phase was slowly added to the first aqueous phase. In order to obtain mini-emulsion, the mixture was homogenized at 25 000 rpm by a homogenizer. After homogenization, the mixture was added to the PHASE II. Then, initiators, sodium bisulfite, and ammonium persulfate were added to the solution. Polymerization was continued for 24 h at 40°C. Besides this, for a control experiment, the non-imprinted PHEMAGA (NIP) nanoparticles were synthesized by applying same procedure with imprinted nanoparticles except the addition of template AMOX molecules.

Size distribution of the prepared nanoparticles was characterized by zeta size measurements. SPR biosensors prepared by AMOX imprinted PHEMAGA (MIP) and non-imprinted PHEMAGA (NIP) nanofilms and nanoparticles then, characterized by FTIR-ATR, Atomic force microscope (AFM), Contact angle (CA), Ellipsometer measurements.

To determine the kinetic and adsorption models of interactions between [PEDMALM-HSA] (MIP) nanofilm and nanoparticles attached to SPR nanosensor and AMOX solution, four different adsorption models named Scatchard, Langmuir, Freundlich, and Langmuir-Freundlich (LF) were employed.

This study will contribute to the literature by comparing the advantages of the nanofilm attached nanosensor prepared by micro-contact method and nanoparticles attached nanosensor.

Keywords: Surface plasmon resonance (SPR), Molecular imprinted polymer (MIP), Micro-contact, Nanoparticle, Amoxicillin.

TEŞEKKÜRLER

Bütün emeğimle hazırladığım ve Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmamda;

*Engin bilgi birikimi ve tecrübesiyle çalışmalarımın titizlikle yürütülmesini ve sonuçlandırılmasını sağlayan, değerli Hocam **Prof. Dr. Adil DENİZLİ**'ye, bu süreçte hep yanımda olduğu ve sağladığı olanaklar için sonsuz sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.*

*Tez çalışmalarımın yürütülmesi için gerekli tüm desteği bana sağlayan, beni yetiştiren, her zaman örnek alacağım sevgili ve çok değerli hocalarım **Doç. Dr. Nilay BERELİ, Dr. Duygu ÇİMEN, Dr. Mitra JALİLZADEH, Dr. Sevgi ASLIYÜCE** bu zor ve yoğun dönemde desteğini benden esirgemediği için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.*

Sevgili BİOREG ailesine ve tüm diğer değerli laboratuvar arkadaşlarıma teşekkürlerimi borç bilirim.

*Beni her zaman destekleyen, kendi ayaklarım üzerinde durmayı öğreten, canım babam **Fazlollah FAALNOURİ**'ye, sadece annem değil hayattaki en yakın arkadaşım olan **Shahnaz JALİLİ**'ye, değerli ablam **Neda FAALNOURİ** ve kısaca **FAALNOURİ** ailesine en içten sevgi ve teşekkürlerimi sunarım...*

Sona FAALNOURİ

2018

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER	xi
ÇİZELGELER.....	xv
SİMGELER VE KISATMALAR	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Antibiyotikler	5
2.1.1. Antibiyotiklerin Medikal Kullanımı	5
2.1.2. Antibiyotiklerin Sınıflandırılması	6
2.1.3. Antibiyotiklerin Üretilmesi	8
2.1.4. Antibiyotik Direnç Gelişimi	8
2.1.5. Antibiyotiklerin Kötüye Kullanımı	9
2.1.6. Amoksisilin	10
2.1.6.1. Amoksisilin Ortaya Çıkışı	11
2.1.6.2. Amoksisilin Yan Etkileri.....	13
2.1.6.3. Amoksisilin Kötüye Kullanımı.....	15
2.1.6.4. Amoksisilin Tayin Metotları	15
2.2. Biyosensörler.....	16
2.2.1. Biyosensörlerin Türleri.....	20

2.2.1.1. Biyolojik Algılama Elementine Göre Türleri	20
2.2.1.1.1. Enzimler	20
2.2.1.1.2. Antikorlar	21
2.2.1.1.3. Nükleik Asitler.....	21
2.2.1.2. Sinyal Dönüştürücüye Göre Türleri	22
2.2.1.2.1. Elektrokimyasal Dönüştürücüler	22
2.2.1.2.2. Optik Dönüştürücüler.....	23
2.2.1.2.3. Piezoelektrik Dönüştürücüler.....	24
2.2.1.2.4. Kalorimetrik (Termal) Dönüştürücüler.....	25
2.2.2. Biyoalgılama Elemanlarının Sensör Yüzeyine Sabitlenmesi	25
2.2.3. Biyosensörlerdeki Son Gelişmeler.....	27
2.2.3.1. Mikrobiyosensörler	27
2.2.3.2. Nanoteknolojik Yenilikler	28
2.2.3. Biyosensörlerin Uygulama Alanları.....	28
2.2.3.1. Klinik Muayene	28
2.2.3.2. Gıda Kontrolü	29
2.2.3.3. Çevresel İzleme.....	29
2.3. Yüzey Plazmon Rezonans (SPR).....	30
2.3.1. Yüzey Plazmon Rezonans Teorisi.....	33
2.3.2. SPR Biyosensörler	36
2.3.3. SPR Biyosensörlerin Uygulama Alanları	37
2.4. Moleküler Baskılama Teknolojisi	39
2.4.1. Moleküler Baskılamanın Esasları	42

2.4.2. Moleküler Baskılama Teknolojisinde Kullanılan Malzemeler	43
2.4.2.1. Hedef Moleküle Özgü Kalıp Molekül.....	44
2.4.2.2. Fonksiyonel Monomerler	45
2.4.2.3. Çapraz Bağlayıcılar	47
2.4.2.4. Çözücüler	49
2.4.2.5. Polimerizasyon Başlatıcıları	49
2.4.3. Moleküler Baskılama Yöntemi	50
2.4.3.1. Kovalent Baskılama Yöntemi.....	50
2.4.3.2. Kovalent Olmayan Baskılama Yöntemi	51
2.4.4. Moleküler Baskılama Hazırlanışı ve Kontrolü	52
2.4.4.1 MIP'lerin Karakterizasyonu.....	52
2.4.5. MIP Sensörler ve Avantajları	53
2.4.6. MIP'lerin Kullanım Alanları	54
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	56
3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	56
3.2. AMOX Baskılanmış ve Baskılanmamış Phemaga Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) Nanosensörlerin Hazırlanması.....	56
3.2.1. Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) Çip Altın Yüzeylerinin Allil Merkaptan ile Yüzey Modifikasyonu.....	56
3.2.2. MAGA:AMOX Ön Kompleksin Hazırlanması	56
3.2.3. Amoksisilin (AMOX) Baskılanmış ve Baskılanmamış [PHEMAGA] İncefilm ve Nanopartiküllerin Hazırlanması	57
3.2.4. Kalıp Molekül AMOX'nin Uzaklaştırılması.....	58
3.3. İncefilm ve Nanopartikül SPR Nanosensörlerin Karakterizasyonu	58
3.3.1. Zeta Boyut Analizi	58
3.3.2. FTIR-ATR Spektrofotometre Analizi	58

3.3.3. Elipsometre Ölçümleri	59
3.3.4. Temas Açısı Ölçümleri	59
3.3.5. Atomik Kuvvet Mikroskopisi (AFM).....	59
3.4. AMOX Baskılanmış SPR Nanosensörler ile Kinetik Analizler.....	60
3.5. Seçicilik Çalışmaları	60
3.6. Süt Örneklerinden AMOX Eldesi	61
3.7. Tekrar Kullanılabilirliğinin incelenmesi.....	61
4. Bulgular ve Tartışma	62
4.1. AMOX Baskılanmış ve Baskılanmamış incefilm SPR Nanosensörler	62
4.1.1. AMOX Baskılanmış [PHEMAGA-AMOX] ve Baskılanmamış [PHEMAGA] incefilm SPR Nanosensörlerin Karakterizasyonları.....	62
4.1.1.1. FTIR-ATR Analizi.....	62
4.1.1.2. Elipsometre ve Temas Açısı Ölçümleri.....	64
4.1.1.3. Atomik Kuvvet Mikroskop Analizi.....	67
4.1.2. AMOX Baskılanmış Phemaga SPR Nanosensörlerin Hazırlanması ve Kinetik Analizleri	69
4.1.2.1. MAGA:AMOX Ön-Kompleks Oranının Optimize Edilmesi	69
4.1.2.2. PH'nın Etkisi	70
4.1.2.3. Kinetik Analizler.....	70
4.1.2.4. Bağlanma Kinetik Analizi ve Denge İzoterm Modelleri	73
4.1.2.5. Yarışmalı Kinetik Analizler ve Baskılama Seçiciliğinin Belirlenmesi	78
4.1.2.6. AMOX Baskılanmış SPR Nanosensör ile Gıdalardan AMOX Tayini	82
4.1.2.7. SPR Nanosensörlerin Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi	83
4.2. AMOX Baskılanmış ve Baskılanmamış Nanopartikül SPR Nanosensörler....	85
4.2.1. AMOX Baskılanmış [PHEMAGA-AMOX] ve Baskılanmamış [PHEMAGA] Nanopartikül SPR Nanosensörlerin Karakterizasyonları.....	85
4.2.1.1. Zeta Boyut Analizi	85
4.2.1.2. Elipsometre Analizi	87

4.2.1.3. Temas Açısı Ölçümleri ve Atomik Kuvvet Mikroskobu Analizi	89
4.2.2. Kinetik Analizler	91
4.2.2.1. Bağlanma Kinetik Analizi ve Denge İzoterm Modelleri	93
4.2.2.2. Yarışmalı Kinetik Analizler ve Baskılama Seçiciliğinin Belirlenmesi	97
4.2.3. AMOX Baskılanmış SPR Nanosensör ile Gıdalardan Amoksisilin Tayini ...	99
4.2.4. AMOX Baskılanmış Pphemaga SPR Nanosensörün Tekrar Kullanılabilirliğinin incelenmesi.....	102
5. SONUÇ VE YORUM	104
5.1. AMOX Baskılanmış (MIP) ve Baskılanmamış PHEMAGA (NIP) İncefilm SPR Nanosensörlerin Hazırlanması	104
5.2. AMOX Baskılanmış (MIP) ve Baskılanmamış PHEMAGA (NIP) Nanopartiküllerin Sentezlenmesiyle Hazırlanan SPR Nanosensörler	107
KAYNAKLAR.....	111
ÖZGEÇMİŞ	131

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2. 1. Antibiyotiklerin Sınıflandırma Şematiği	7
Şekil 2. 2. Amoksisilinin (AMOX) Kimyasal Yapısı	11
Şekil 2. 3. Penisilinin Temel Kimyasal Yapısı.....	12
Şekil 2. 4. Biyomoleküllerin Sensör Yüzeyine Sabitleme Yöntemleri: 1) Adsorpsiyon, 2) Kovalent Bağlama, 3) Matriks Kalıplama, 4) Çapraz Bağlama 5) Kapsülleme.....	27
Şekil 2. 5. Altın Yüzeyinde Bulunan Reseptörlere Hedef Moleküllerin Bağlanması Sonucu Rezonans Açısının Kayması.....	31
Şekil 2. 6. Wood'un Gözlemlediği Alışılmadık Siyah Ve Beyaz Dalga Boyları.....	33
Şekil 2. 7. Prizma Ara Yüzeyinde Toplam İç Yansıma. η_1 Ve η_2 Prizmanın Ve Çıkış Ortamının Kırılma Endeksidir. Kritik Açıda Kırılmış Işık Kırmızı Renk ile Gösterilmiştir	34
Şekil 2. 8. Prizma Yüzeyi Metal Film Kaplandığında SPR Gerçekleşmektedir	35
Şekil 2. 9. Moleküler Baskılama Teknolojisinin Aşamaları.....	43
Şekil 2.10. Yaygın Olarak Kullanılan Fonksiyonel Monomerlerin Kimyasal Yapıları	47
Şekil 2. 11. Yaygın Olarak Kullanılan Çapraz Bağlayıcıların Kimyasal Yapıları ...	48
Şekil 2. 12. Yaygın Olarak Kullanılan Peroksit ve Azo Başlatıcıların Kimyasal Yapıları	50
Şekil 4.1.N-Metakriloil-(L)-Glutamik Asidin (MAGA) Monomerinin Molekül Şekli..	62
Şekil 4.2. N-Metakriloil-(L)-Glutamik Asidin (MAGA) Monomerinin FTIR Spektrumu	63
Şekil 4.3. MAGA, HEMA, PHEMAGA, AMOX ve AMOX baskılanmış PHEMAGA SPR nanosensöre ait FTIR-ATR spektrumu	63

Şekil 4.4. Allil Merkaptan ile Modifiye Edilmemiş (A), AMOX Baskılanmış (B) ve Baskılanmamış PHEMAGA (C) SPR Nanosensörlerin Elipsometrik Ölçümde Alınan 3 Boyutlu Görüntüleri.....	65
Şekil 4.5. Modifiye Edilmemiş SPR Altın Yüzey (A), AMOX Baskılanmış (B) ve Baskılanmamış (C) PHEMAGA SPR Çiplerin Yüzey Temas Açısı Fotoğrafları	66
Şekil 4.6. Modifiye Edilmemiş SPR Nanosensör (A), Allil Merkaptan ile Modifiye Edilmiş SPR Nanosensör (B), AMOX Baskılanmış PHEMAGA SPR Nanosensör (C) ve Baskılanmamış PHEMAGA SPR Nanosensörlerin (D) Yarı Temas Modunda Alınan AFM 3B Görüntüsü ($2 \times 2 \mu\text{m}^2$)	68
Şekil 4.7. Farklı Mol Oranlarında MAGA:AMOX ile Hazırlanan AMOX Baskılanmış Ve Baskılanmamış PHEMAGA SPR Nanosensör için Baskılama Faktörü Değerler	69
Şekil 4.8. AMOX Baskılanmış PHEMAGA Nanosensörlerde Ph'nın Etkisi.....	70
Şekil 4.9. Farklı Derişimlerde Hazırlanan AMOX Çözeltisi ile PHEMAGA İncefilm SPR Nanosensör Arasındaki Etkileşimlere ait Sensorgramlar.....	71
Şekil 4.10. AMOX Derişimi ile SPR Nanosensör ($\% \Delta R$) Arasındaki ilişki (A) ve 0.25-50 ng/mL Aralığında AMOX Derişimi ile SPR Nanosensör Kalibrasyon Grafiği (B)	72
Şekil 4.11. Kinetik Hız Sabitlerinin Belirlenmesi (A) Denge Analiz Yaklaşımı (Scatchard), (B) Bağlanma Kinetik Yaklaşımı	75
Şekil 4.12. Adsorpsiyon Modelleri; (A) Langmuir, (B) Freundlich, (C) Langmuir-Freundlich	77
Şekil 4.13. Yarışmalı Adsorpsiyon Çalışmaları için Kullanılan Amoksisilin (AMOX), Ampisillin (AMP), Sefaleksine (CEP) Ve Kolesterol (KOL) Biyomoleküllerinin Molekül Şekilleri.....	79
Şekil 4.14. Amoksisilin (AMOX), Ampisillin (AMP), Sefaleksine (CEP) ve Kolesterol (KOL) Çözeltileri ile AMOX Baskılanmış SPR Nanosensör Arasındaki Etkileşimlere ait % Kırılma-Zaman Grafikleri.....	80

Şekil 4.15. Amoksisilin (AMOX), Ampicillin (AMP), Sefaleksin (CEP) ve Kolesterol (KOL) Çözeltileri ile AMOX Baskılanmamış SPR Nanosensör Arasındaki Etkileşimlere ait % Kırılma-Zaman Grafikleri.....	81
Şekil 4.16. AMOX Baskılanmış SPR Nanosensörün Çiftlik ve Pastorize Sütün İçindeki AMOX Miktarının Belirlenmesi	83
Şekil 4.17. AMOX Baskılanmış SPR Nanosensörün Aynı Gün İçindeki Tekrar Kullanılabilirliğin Gösterildiği % Kırılma-Zaman Grafiği.....	84
Şekil 4.18. AMOX Baskılanmış PHEMAGA SPR Nanosensörlerin Farklı Günlerde Tekrar Kullanılabilirliği	85
Şekil 4.19. AMOX Baskılanmış (A) AMOX Baskılanmamış (B) PHEMAGA Nanopartiküllerin Zeta Boyut Analizleri	86
Şekil 4.20. Modifiye Edilmemiş (A), AMOX Baskılanmış (B) ve Baskılanmamış PHEMAGA SPR Nanosensörlerin (C) Elipsometrik Ölçümde Alınan 3 Boyutlu Görüntüleri	88
Şekil 4.21. Su ile Temas Açısı Ölçümleri, Modifiye Edilmemiş (A), AMOX Baskılanmış (B) ve Baskılanmamış PHEMAGA Nanopartikül SPR Nanosensör Yüzeyleri.....	90
Şekil 4.22. AMOX Baskılanmış PHEMAGA Nanopartikül SPR Nanosensörlerin Alınan AFM 3B Görüntüleri (5 X 5 μm^2).....	91
Şekil 4.23. AMOX Çözeltisi ile PHEMAGA Nanopartikül ile Hazırlanmış SPR Nanosensör Arasındaki Etkileşimlere ait Sensorgramlar	92
Şekil 4.24. AMOX Derişimi ile SPR Nanosensör ($\% \Delta R$) Arasındaki ilişki (A) ve 0.1-100 ng/mL Aralığında AMOX Derişimi ile SPR Nanosensör Kalibrasyon Grafiği (B)	92
Şekil 4.25. Kinetik Hız Sabitlerinin Belirlenmesi, Denge Analiz Yaklaşımı (Scatchard) (A), Bağlanma Kinetik Yaklaşımı (B)	94
Şekil 4.26. Adsorpsiyon Modelleri: Langmuir (A), Freundlich (B), Langmuir-Freundlich (C).....	95

Şekil 4.27. Amoksisilin (AMOX), Ampisilin (AMP), Sefaleksim (CEP) ve Kolesterol (KOL) Çözeltileri ile AMOX Baskılanmış SPR Nanosensör Arasındaki Etkileşimlere ait % Kırılma-Zaman Grafikleri.....	97
Şekil 4.28. Amoksisilin (AMOX), Ampicillin (AMP), Sefaleksim (CEP) ve Kolesterol (KOL) Çözeltileri ile AMOX Baskılanmamış SPR Nanosensör Arasındaki Etkileşimlere ait % Kırılma-Zaman Grafiklerin Çakıştırılması.....	98
Şekil 4.29. AMOX Baskılanmış PHEMAGA SPR Nanosensörün Çiftlik ve Pastörize Süt içindeki AMOX Miktarının Belirlenmesi.....	100
Şekil 4.30. AMOX Baskılanmış PHEMAGA SPR Nanosensörün Aynı Gün içindeki Tekrar Kullanılabilirliğin Gösterildiği % Kırılma-Zaman Grafiği.....	103
Şekil 4.31. AMOX Baskılanmış PHEMAGA SPR Nanosensörlerin Farklı Günlerde Tekrar Kullanılabilirliliği	103

CİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2. 1. Amoksisilinin Yan Etkileri ve Görülme Sıklıkları.....	14
Çizelge 2. 2. Enzimlerin İşlevsel Görevlerine Göre Sınıflandırılması.....	21
Çizelge 2. 3. Yaygın Olarak Kullanılan Kalıp Molekül ve İyonlar	45
Çizelge 2. 4 MIP'lerin Yaygın Kullanılan Karakterizasyon Yöntemleri	53
Çizelge 4.1. Modifiye Edilmemiş, AMOX Baskılanmış ve Baskılanmamış İncefilm SPR Nanosensörlerin Yüzey Temas Açılırları	66
Çizelge 4.2. Kinetik Hız Sabitleri (İnce Film).....	75
Çizelge 4.3. Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich Parametreleri.....	78
Çizelge 4.4. Seçicilik ve Bağlı Seçicilik Katsayıları.....	82
Çizelge 4.5. Modifiye Edilmemiş, AMOX Baskılanmış ve AMOX Baskılanmamış PHEMAGA Nanopartikül SPR Nanosensörlerin Yüzey Temas Açılırları	89
Çizelge 4.6. Kinetik Hız Sabitleri (Nanopartikül).....	94
Çizelge 4.7. Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich Parametreleri.....	96
Çizelge 4.8. AMOX'e Göre Ampicillin (AMP), Sefaleksim (CEP) ve Kolesterol (KOL) için Seçicilik ve Bağlı Seçicilik Katsayıları.....	99
Çizelge 4.9. AMOX Baskılanmış SPR Nanosensörler ile Belirlenen Gıda Örneğinde Bulunan AMOX Analiz Sonuçları (N=3).....	100
Çizelge 4.10. Literatürde Gıda Örneğinde AMOX Tayinine Yönelik Kullanılan Tekniklerin Karşılaştırılması.....	101

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

C	Analit derişimi (μM)
ka	Bağlanma hız sabiti ($\mu\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1}$)
KA	Bağlanma sabiti (μM^{-1})
kd	Ayrılma hız sabiti (s^{-1})
KD	Ayrılmaz sabiti (μM)

KISALTMALAR

AMOX	Amoksisilin
AMP	Ampicilin
CEP	Sefaleksin
KOL	Kolesterol
MAGA	N-metakriloil-(L)-glutamik asit
AIBN	Azoizobutironitril
APS	Amonyum Persülfat
HEMA	Hidroksietilmetakrilat
PHEMAGA	Poli(HEMA-MAGA)
EDMA	Etilen Glikol Dimetakrilat
DMF	Dimetilformamid
FTIR-ATR	Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektroskopisi-Azaltılmış Toplam Reflektans
NaHCO_3	Sodyum Bikarbonat
NaHSO_3	Sodyum Bisülfat
MIP	Moleküler Baskılanmış Polimer
NIP	Baskılanmamış Polimer
PVA	Polivinil Alkol
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
NPS	Nanopartiküller
SPR	Yüzey Plazmon Rezonans
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu

1. GİRİŞ

Antibiyotikler, bakterileri öldürmek ya da büyümesini önlemek için kullanılan antimikrobiyal ilaçlardır. Bu ilaçlar yanlış ya da uygunsuz kullanıldığı zaman vücudun bu ilaçlara karşı direnç kazanmasına neden olabilir [1,2]. Antibiyotikler, 20'nci yüzyılda verem gibi çok sayıda ölümcül hastalığı yok etme özelliğiyle tıp alanında devrim yapmıştır. Gerhard Domagk 1933 yılında ilk sistematik antibakteriyal ilacı bulmuştur ve bu çalışma için 1939 yılında Nobel Ödülü almıştır. Antibiyotik tedavisinin maliyetini ve toksisitesini düşürmek için sorumlu patojen bulmak gereklidir [3]. Antibiyotikler vücuda; ağız yoluyla, enjeksiyon, damla ya da topikal gibi farklı şekillerde alınabilmektedir [4]. Antibiyotikler genel bir şekilde bakteri hücre duvarını hedef alan (penisilinler ve sefalosporinler), hücre zarını hedef alan (polimiksinler) ya da bakteriler için hayati önem taşıyan enzimler ile etkileşime giren (rifamisinler, lipiarmisinler, kinolonlar ve sülfanamitler) olarak sınıflandırılmıştır. Antibiyotik tedavisi sırasında antibiyotiklere karşı direnç oluşabilir. Bu direnç yüksek dozda antibiyotik kullanımına karşı fizyolojik ve genetik direnç gelişimi, ya da ilaçların biodegradasyonu sebebiyle olabilir [5,6]. Tedaviye cevap vermeyen bakteri türleri yaygın antibiyotik kullanımı nedeniyle üretilmiştir. Antibiyotiklerin hayvan tedavisinde kullanımı nedeniyle süt, yumurta ve et gibi hayvan kökenli çeşitli gıda ürünlerinde antibiyotik kalıntıları bulunmaktadır. Sonuç olarak insanların bu antibiyotiğe maruz kalmasına ve bakteriyal direnç gelişimine neden olabilir. Düşük seviyede antibiyotik içeren sütün günlük tüketimi bile uzun vadede kanserojen, östrojenik ve nörotoksik etkilere neden olabilir [1,7]. Antimikrobiyal direnç ile mücadele etmek için Amerika Birleşik Devletleri, Fransa ve birden fazla devlet kurumları antibiyotik kullanımını kontrol etmek için bir çok kampanya başlatmışlardır.

Amoksisilin (AMOX) birçok bakteri enfeksiyonunu tedavi etmek için kullanılan yarı-sentetik bir antibiyotiktir. AMOX mikroorganizmaları öldürmek, büyümesini engellemek, orta kulak enfeksiyonları, boğaz ağrısı, deri enfeksiyonları ve idrar yolu enfeksiyonları tedavisi için kullanılmaktadır [8,9]. Amoksisilin aynı zamanda, insanlar ve hayvanlarda daha yüksek emilim özeliğine sahip bir antibiyotik olarak tanımlanmıştır [10]. Amoksisilin 1960 yıllarında İngiltere'de Beecham tarafından geliştirilen 6-aminopenisilianik asit (6-APA) türevi

semisentetik bir antibiyotiktir. AMOX 1972 yılında piyasaya sürülmüştür ve piyasaya sürülen ikinci aminopenisilindir [11]. 1981 yılında Smith Kline Beecham amoksisilin veya amoksisilin/kluvanat potasyum tabletlerinin patentini alarak 1998 yılında antibiyotiği amoksisilin, amoksil ve trimoks ticari adlarıyla piyasa sürmüştür [12]. Amoksisiline karşı hafif alerji semptomlarında kaşınma, ileri derecede alerji semptomlarında ise deri döküntüsüyle beraber şiddetli kaşınma, bazen de ateş yükselmesi, mide bulantısı ve kusmaya sebep olabilir [13,14]. Antibiyotiklerin uygunsuz kullanımı gıda maddelerinde kalıntılara yol açmaktadır. Bu nedenle, gıda maddeleri ve biyolojik sıvılardaki kalıntıları tespit etmek önemlidir. Antibiyotik kalıntılarının hem su ortamında (su ürünleri yetiştiriciliğinde kullanılması nedeniyle) hem de et, süt, yumurta gibi günlük tüketim ürünlerinde (hayvan yemlerine ilave edildiği nedeniyle) izlenmesi çok büyük önem taşımaktadır [15]. AMOX miktarını belirlemek için, spektroskopi [16,17], kromatografi [18,19], yüzey plazmon rezonans (SPR) [20] ve elektrokimyasal yöntemler [21,22] gibi analitik yöntemler kullanılmıştır. Antibiyotik tayini için kullanılan yöntemlerin bazıları çok duyarlı, doğru ve hassas olmalarına rağmen rutin kontrol prosedürlerinde zaman alıcı olmak gibi dezavantajları da vardır. Bu yüzden, gıda örneklerinde amoksisilin tayini hassas ve spesifik olması için kolay ve hızlı bir metot bulmak önemlidir.

Biyosensörler, biyolojik aktif elementler için uygun fiziksel dönüştürücü ile kimyasal açıdan derişimler ile doğru orantılı, ölçülebilen sinyal dönüştüren bir analitik cihazdır [23-27]. Biyosensörler iki şekilde sınıflandırılmaktadır. Birincisi biyolojik elementine göre (nükleik asitler, antikor, enzimler) ikicisi ise fiziksel detektöre göre (optik, piezoelektrik, elektrokimyasal ve termal). İlk biyosensörler 1962'de Clark ve Lyons tarafından glikoz konsantrasyonunu ölçmek için kullanılmıştır. Biyosensörler halk sağlığı, çevresel faaliyetler ve gıda güvenliği gibi farklı alanlarda kullanılmaktadır [27-31]. Biyosensörler hızlı ve gerçek zamanlı ölçümler, yüksek seçicilik, kalibrasyon için kullanılan çok az analit miktarı, hızlı tepki vermeleri ve ayrıca apolar molekülleri ölçebilmeleri nedeniyle adeta bilim dünyasında çığır açmışlardır [32]. Başarılı bir biyosensör analizi için seçilen biokatalizör, yüksek seçiciliğe sahip olmalı, uygun saklama şartları altında kararlı olmalı, birden fazla analiz arasında çok az farklılık göstermeli, pH ve sıcaklık gibi fiziksel parametrelerden bağımsız olmalıdır [33].

Yüzey plazmon rezonans (SPR) tabanlı biyosensörler analit çözeltisi ve SPR yüzeyine sabitlenmiş biyolojik eleman arasındaki etkileşimi özel elektromanyetik dalgaları kullanarak izlemektedir [34].

Molekül baskılama (MIP) yöntemi fonksiyonel monomer ve çapraz-bağlayıcı olarak görev yapan bir molekülü çözücünün içinde kalıp molekülün etrafını sararak polimerizasyon yapmaktadır [35]. Molekül baskılama (MIP) tekniğinin amacı, polimerde hedef moleküle özgü bölgeler oluşturmak ve bu nedenle molekülün seçiciliğini artırmaktır. Şablonlar ikili etkileşimlere dayanarak oluşturulur ve bu şablona göre de akıllı polimerler geliştirilir [36].

MIP yöntemi bu üstün özelliklerden dolayı başta sensöre dayalı olmak üzere, ayırma, ilaç ve kimyasal tayini, kataliz gibi birçok farklı alanda yaygın olarak kullanılmaktadır [37]. Moleküler baskılanmış polimerlerden üretilen sensörler, seçicilik ve özgüllük nedeniyle son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır [38].

Bu çalışmada amoksisillin (AMOX) tayini için SPR temelli nanosensörler hazırlanmıştır. Bu nedenle AMOX tanıma bölgelerine sahip nanopartiküller MIP yöntemiyle hazırlanmış, analizler fotopolimerizasyon ve nanopartikül damlatma yöntemi ile algılayıcı yüzeyine immobilize olarak tutturulmuş SPR sensör cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla:

İlk olarak AMOX ile etkileşmek ve şablon bölgeler oluşturmak için N-metakriloil-(L)-glutamik asit (MAGA) monomeri sentezlenmiş ve karakterizasyonu için FTIR spektrumu çekilmiştir. Optimum MAGA-AMOX kompleksi belirlemek için, farklı oranlarda MAGA ve AMOX etkileştirilmiş, UV-görünür bölge spektrofotometre cihazıyla tespit edilmiştir. Ayrıca SPR çipin yüzeyi temizlenmiş ve sonra altın yüzey allil merkaptan ile modifiye edilmiştir. AMOX baskılanmış ve baskılanmamış nanopartiküllerin radikali polimerizasyon yöntemiyle sentezlenmiştir. Daha sonra nanopartiküller SPR sensörün üzerine damlatılarak ince film oluşturulmuştur. Şablon bölgeler oluşturmak için NaCl çözeltisi kullanılarak AMOX moleküllü uzaklaştırılmıştır. Nanopartiküllerin boyutu zeta-sizer cihazıyla ölçülmüştür. SPR nanosensörü karakterizasyonu için FTIR-ATR spektrofotometri analizi yapılmıştır. Ayrıca elipsometre ölçümleri, temas açısı ölçümleri, AFM analizi gerçekleştirilmiştir. Optimum pH değeri belirlemek için (pH 4.0-8.0) aralığında ölçümler yapılmış

ve maksimum AMOX bağlanması pH 7.0 de gözlenmiştir. Kırılma noktası değerlerinin derişimle bağılı olması göstermek için analizler 0.25-150 ng/mL derişim aralığında yapılmıştır. Kinetik analizi yapmak için bağlama kinetik analizi ve Scatchard izotermleri uygulanmıştır. AMOX ile AMOX baskılanmış SPR çipin arasındaki etkileşimi incelemek için Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich izotermleri deneysel verilere uygulanmıştır. AMOX baskılanmış nanosensörlerin seçiciliğini belirlemek için adsorpsiyon çalışmaları Amoksisilin (AMOX), Ampisilin (AMP), Sefaleksine (CEP) ve kolesterol çözeltileriyle yapılmıştır. Ayrıca yarışmalı adsorpsiyon çalışmaları Amoksisilin-kolesterol, Amoksisilin-Ampisilin, Amoksisilin-Sefaliksine ve Amoksisilin-Kolesterol-Ampisilin çözeltileriyle yapılmıştır. AMOX baskılanmış SPR sensörün baskılama seçiciliğini belirlemek için baskılanmamış SPR çipiyle analiz yapılmıştır. AMOX baskılanmış SPR nanosensörün tekrar kullanılabilirliğini belirlemek için analiz aynı günde 5 kere ard arda yapılmıştır. AMOX baskılanmış SPR nanosensör ile çiftlik sütü, pastörize süt amoksisilin tayini yapılmıştır.

1. GENEL BİLGİLER

2.1. Antibiyotikler

Antibiyotikler, bakteriyal enfeksiyonları tedavi etmek ve önlemek amacıyla kullanılan antimikrobiyal ilaçlardır [1]. Bu ilaçlar bakteriyi öldürmekte ya da büyümesini durdurmaktadır. Antibiyotikler soğuk algınlığı ya da grip virüslerine karşı etkili değildir, ayrıca uygunsuz kullanımları dirençli organizmaların gelişmesine neden olmaktadır. Penisilin antibiyotiği ilk kez Alexander Fleming tarafından 1928 yılında bulunmuştur. Fleming, hastalığa neden olan bakteri kültürü üzerine çalışırken kaplardan birinde yeşil küçük küfleri (*Penisilin chrysogenum*) görmüş ve bu küflerin bakterileri öldürdüğünü ya da büyümesini engellediğini fark etmiştir [2]. Antibakteriyal tedavi döneminin başlangıcı arsfenamin'in bulunmasıyla başlamıştır. İlk olarak 1907'de Alfred Bertheim ve Paul Ehrlich tarafından sifiliz tedavisi için kullanılmıştır [3]. İlk sistematik antibakteriyal ilaç olan protosil 1933 yılında Gerhard Domagk tarafından bulunmuştur [39]. Bu çalışması ile Gerhard Domagk 1939 yılında Nobel Ödülü almıştır.

Antibiyotikler 20'inci Yüzyılda tıp alanında devrim yapmış, aşılama ile beraber gelişmiş dünyada verem gibi hastalıkları neredeyse tamamen yok etmiştir. Bu ilaçların kolay ulaşılabilir ve etkili olmaları nedeniyle özellikle hayvan yetiştiriciliğinde aşırı dozda kullanımına yol açmıştır [40], bu da antibiyotik direncinin gelişmesine neden olmuştur.

2.1.1. Antibiyotiklerin medikal kullanımı

Antibiyotikler, bakteriyal enfeksiyonları tedavi etmek/önlemek için kullanılmakla birlikte bazen protozoa enfeksiyonlarını tedavi etmek için de kullanılırlar (Metronidazol birçok parazit kaynaklı hastalıklara karşı etkilidir). Bir hastalığın nedenin enfeksiyon olduğu ortaya çıktığında fakat sorumlu patojen bulunamadığında ampirik tedavi uygulanmaktadır [4]. Hastalığın tanıları ve belirtilerine göre geniş çaplı antibiyotik tedavisini içermektedir. Sorumlu patojen mikroorganizma bilindiğinde ise kesin tedavi uygulanmaktadır. Kesin tedavi uygulaması daha dar çaplı antibiyotik kullanımını içermektedir. Patojenin bulunması çok önemlidir, çünkü antibiyotik maliyetini ve toksisitesini düşürülebileceği gibi olası muhtemel antibiyotik direnç oluşumunu da

engellemek mümkün olur. Apandisit tedavisinde ameliyattan kaçınmak için de antibiyotik uygulanmış ve olumlu sonuçlar gözlenmiştir [41].

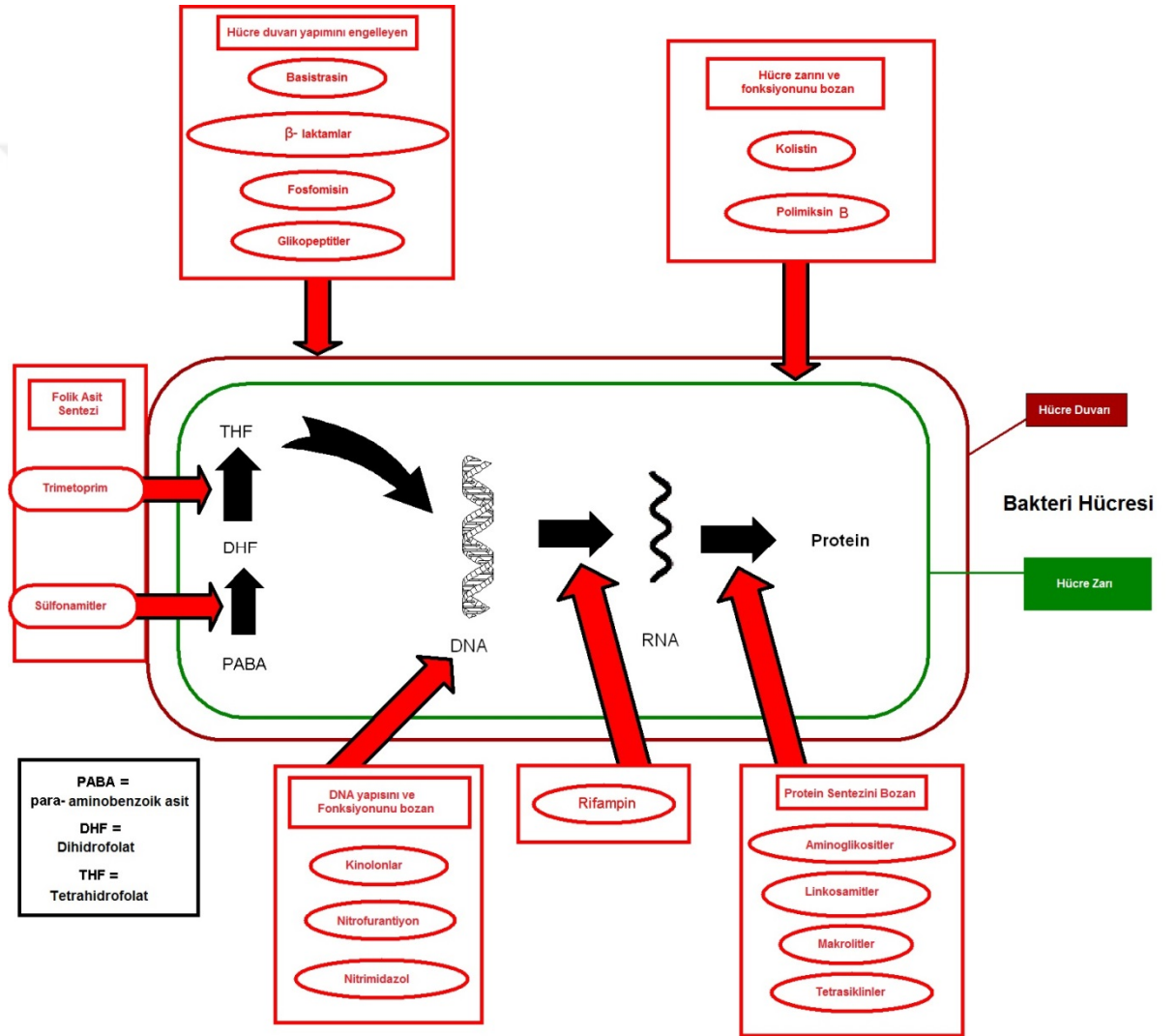
Antibiyotikler önlem alma amacıyla da (profilaktik) kullanılabilir. Zayıf bağışıklık sistemi olanlara (HIV taşıyan hastalar gibi), bağışıklık sistemini zayıflatan ilaç kullananlara, kanser tedavisi gören hastalara ve ameliyat geçirmiş hastalara verilmektedir. Antimikrobiyallerin ayrıca ameliyat sırasında insizyon yerine bağlı enfeksiyonları önlemek için kullanılır. Dental antibiyotikler profilaksi sırasında bakteriyemi ve enfektif endokarditi önlemek için kullanılmaktadır. Bunun dışında antibiyotikler kanserle alakalı nötropeni (nötrofillerin olması gereken miktardan az olması) tedavisinde de kullanılmaktadır [42].

Antibiyotikler vücuda farklı şekillerde alınabilmektedir. Genellikle ağız yoluyla alınmakla birlikte bazı durumlarda, özellikle derin sistematik enfeksiyonlarda intravenöz şekilde enjekte edilmektedir [4]. Enfeksiyonlar yeri kolay ulaşılır olduğu durumlarda ise göz ya da kulak gibi, damla şeklinde uygulanmaktadır. Topikal kullanım ise sivilce ve selülit gibi deri hastalıkları için uygundur [43]. Topikal kullanım şeklinin avantajı enfeksiyon yerinde yüksek konsantrasyonda kullanımı mümkün olmasıdır; bu sebeple sistematik emilme ve toksisite riskini ve kullanılan toplam antibiyotik hacmi azaltılmaktadır. Dolayısıyla antibiyotiklerin fazladan kullanımı engellemektedir. Ancak, bazen sistematik emilme durumu olabilmektedir, uygulanan antibiyotik miktarını hassas bir şekilde ayarlamak zordur ve cilde temas halinde aşırı duyarlılık oluşabilmektedir [44].

2.1.2. Antibiyotiklerin sınıflandırılması

Antibiyotikler genel olarak etki mekanizmalarına, kimyasal yapılarına ya da aktivite alanlarına göre sınıflandırılmaktadır. Genel hedef, bakteriyal hareketlilik veya büyüme prosesidir. Antibiyotikler, bakteri hücre duvarını hedef alan (penisilinler ve sefalosporinler), hücre zarını hedef alan (polimiksinler) ya da bakteriler için hayati önem taşıyan enzimler ile etkileşime girerek (rifamisinler, lipiarmisinler, kinolonlar ve sülfonamidler) bakteriler üzerinde öldürücü etkiye sahiptir. Protein sentezini hedef alan (makrolidler, linkozamitler ve tetrasiklinler) antibiyotiklere bakteriyostatik antibiyotikler adı verilir [45]. Daha farklı bir sınıflandırma ise hedefin özgüllüğüne göre yapılmaktadır. “Dar

etki alanlı” antibiyotikler sadece bazı gram-negatif veya gram-pozitif bakteriler gibi spesifik bakterileri hedef alırken, “geniş etki alanlı” olanlar ise birçok bakteriye etki etmektedir. Yeni antibakteriyel bileşiklerin keşfinin 40 yıllık duraklama sonrası 2000 yılların sonuna doğru ve 2010 yılının başında siklik lipopeptitler (daptomisin gibi), glikosiklinler (tigesiklin gibi), oksazolidinonlar (linezolit gibi) ve lipiarmisinler (fidaksomisin gibi) 4 yeni antibiyotik sınıfı klinik kullanıma sunulmuştur. Şekil 2.1’de antibiyotiklerin etki alanı ve etki mekanizmasına göre sınıflandırılması detaylı olarak verilmiştir [46].



Şekil 2.1. Antibiyotiklerin sınıflandırma şematığı [46].

2.1.3. Antibiyotiklerin üretilmesi

Medikal kimyanın gelişmesiyle beraber, modern antibiyotiklerin çoğu çeşitli doğal bileşiklerin yarı sentetik halini almıştır [46]. Buna örnek olarak beta-laktam antibiyotikleri olan penisilinler, sefalosporinler ve karbapenemler gibi antibiyotikler verilebilir. Aminoglikositler hala canlılardan elde edilen antibiyotiklerdir, bunun aksine sülfonamidler, kinolonlar ve oksazolidinonlar gibi antibiyotikler ise tamamen kimyasal sentez ile üretilmektedir. Birçok antibiyotiğin molekül ağırlığı 1000 daltonun altındadır [47]. Florey ve Chain'in 1939 yılında bu konuya önderlik etmelerinden bu yana, antibiyotiklerin ve antibakteriyellerin tıp açısından önemi nedeniyle büyük miktarlarda üretilmesi ciddi araştırma konusu olmuştur. Antibakteriyellerin geniş alanda birçok bakteriye etki ettiği anlaşıldıktan sonra aktif bileşiklerin üretimi özellikle aerobik şartlarda fermantasyon ile yapılmaktadır [48].

2.1.4. Antibiyotik direnç gelişimi

Antibiyotik tedavisi sırasında direnç gelişmesinin evrimin bir yansıması olduğu düşünülmektedir. Yüksek dozda antibiyotik kullanımına karşı fizyolojik ya da genetik direnç geliştiren bakteriye karşı farklı antibiyotik tedavisi seçilebilir. Belirli şartlar altında antibiyotiğe dirençli bakteri gelişmiş ve bu sırada şüpheli bakterinin büyümesini durdurmuş olabilir [5]. Antibiyotiğe direnç geliştirmiş genlere karşı antibiyotik seçimini 1943 yılında Luria ve Delbrück bir deneyde incelemişlerdir [49]. Penisilin ve eritromisin gibi birçok bakteri sınıfına etkili olan antibiyotiklere karşı bakteriyel direnç gelişimi sebebiyle bu antibiyotiklerin etkisi azalmış durumdadır.

Direnç gelişimi, ilaçların biodegradasyonu sebebiyle de olabilmektedir. Örneğin ilaçlanmış domuz dışkılarındaki sülfametazin sebebiyle toprak bakterilerinde sülfametazin direnç gelişimi algılanmıştır [50]. Bakterinin hayatta kalma sebebi bazen de kalıtsal direnç olabilir [6], fakat antibakteriyel direnç yatay gen transferi ile de olabilmektedir. Yatay transfer, sık antibiyotik kullanılan yerlerde görülmektedir. Antibakteriyel direnç biyolojik maliyet çıkarabilir, örneğin antibiyotik bileşik eksikliğinde dirençli bakteri sağlığı azalmaktadır, bu da antibakteriyel dirençli bakteri yayılmasını önleyebilir.

Bakteri sağlığını ek mutasyonlar ile geri kazanabilir, aynı zamanda bakterinin hayatta kalmasını sağlamaktadır [51].

Paleontolojik bilgilere göre antibiyotik ve antibiyotik direnç gelişimi eski bileşiklerdir ve eski mekanizmadır [52]. Bakteri gelişimini ve büyümesini olumsuz etkileyen mutasyonları oluşturacak antibiyotikler kullanılmalıdır. Antibakteriyel direnç gelişmesinin birkaç moleküler mekanizması vardır. İten antibakteriyel direnç gelişimi bakteri türlerinin genetik değişimin parçasıdır [53]. Örneğin, antibakteriyel hedef bakteri genomundan eksik olabilir. Direnç gelişmesine neden bakteriyel kromozomdaki mutasyon ya da ekstra kromozumlu DNA oluşmasıdır [54].

2.1.5. Antibiyotiklerin kötüye kullanımı

Antibiyotik kullanımının birinci ve ikinci kuralı şudur; mümkünse antibiyotik kullanma ve kullanırsan da az miktarda kullan. Antibiyotiklerin uygunsuz ve aşırı kullanımı antibiyotiğe dirençli bakteri gelişmesine neden olmuştur [54]. Antibiyotik tedavisine cevap vermeyen hastalıkların semptomlarına veya antibiyotik kullanımını gerektirmeyen hastalıklarda sıkça antibiyotik tedavisi uygulanmaktadır. Belirli bakteriyel enfeksiyonlara karşı çok fazla yanlış antibiyotik tedavisinin uygulandığı belirtilmiştir. Penisilin ve eritromisin gibi antibiyotiklerin fazla kullanımı 1950'li yıllardan beri süre gelen bir direnç gelişimine neden olmuştur [55]. Hastanelerde yaygın antibiyotik kullanımı nedeniyle, genel olarak kullanılan antibiyotik tedavilerine cevap vermeyen bakteri türleri artmıştır.

Antibiyotiklerin klinik uygulamalarda sık kullanımı, süt, yumurta ve et de dahil birçok hayvan kökenli çeşitli gıda ürünlerinde antibiyotik kalıntılarına neden olmaktadır. İnsanların bu besinleri tüketmesi sonucunda antibiyotiğe maruz kalarak bakteriyel direnç gelişimi gerçekleşmektedir. Sütteki antibiyotik kirliliğinin en önemli nedeni antibiyotiklerin mastit (%92), meme içi infüzyon (%6) ve çeşitli enfeksiyonların (%2) tedavisinde kullanılmasından kaynaklanmaktadır [7]. Tam olarak bilinmemesine rağmen, genel olarak düşük seviyede antibiyotik içeren sütün günlük tüketimi uzun vadede kanserojen, estrojenik ve nörotoksik etkilere neden olabilir [1]. Ayrıca hayvansal gıdalarda antibiyotik kalıntılarının olması insanda potansiyel zehirlenme riski (kanser,

alerji vs) oluşturmaktadır. Düşük seviyede antibiyotik kalıntısı ise mikroflora değişimine ve antibiyotiklerin klinikte kullanımını etkisiz hale getiren muhtemel direnç gelişimine yol açmaktadır [56,57].

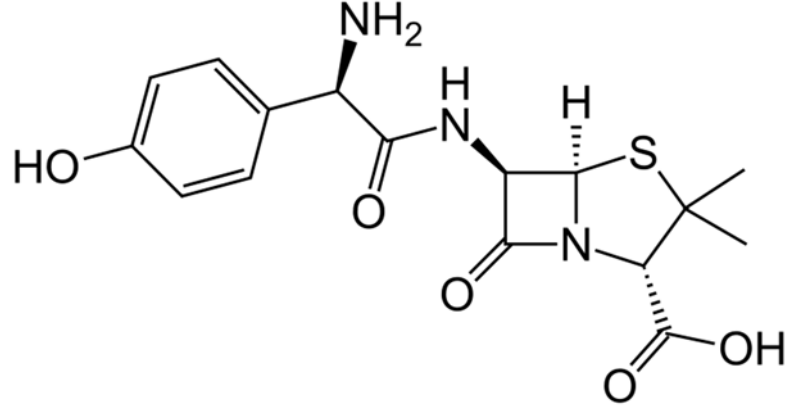
Antimikrobiyel direnç gelişimi bazı örgütleri fazla miktarda antibiyotik kullanımını ortadan kaldırmak için harekete geçirmiştir [55]. Antibiyotiklerin kötüye kullanımı ve fazla miktarda tüketimi sorunu antimikrobiyel direnç ile mücadele etmek için Amerika Birleşik Devletleri Kurumlararası Görev Gücü'nü kurmuştur. Bu organizasyon antibakteriyel direnç ile mücadele etmek için kurulmuş olup, aynı zamanda ABD Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi, İlaç ve Gıda Yönetimi (FDA) ve Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH) ile iş birliği yapmaktadır. Fransa'da devlet 2002 yılında bir kampanya başlatarak fazla miktarda antibiyotik kullanımını özellikle çocuklarda ciddi ölçüde azaltmıştır [58]. Antibiyotik direncinin yayılması sonrası onların Birleşik Devletlerinde (UK) 1970 yılında ve Avrupa Birliğinde (AB) 2003 yılından bu yana büyümeyi teşvik etmek amacıyla kullanımı yasaklanmıştır. Bunun yanı sıra bazı komiteler (Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Ulusal Bilimler Akademisi ve FDA) antibiyotiklerin hayvansal gıda üretiminde kullanımının azaltılmasını sağlamıştır.

2.1.6. Amoksisilin

Amoksisilin (AMOX) birçok bakteri enfeksiyonunu tedavi etmek için kullanılan antibiyotiktir. AMOX, ((2S, 5R, 6R)-6-[(R)-(-)-2-amino-2-(p-hidroksifenil)asetamido]-3,3-dimetil-7-okso-4-tiyo-1-azabisiklo [3.2.0] heptanlar-2-karboksilik asit trihidrat), tiyazolidizin halkası β -laktam halkasına bağlı olan penisilin grubuna ait β -laktam antibiyotığıdır (Şekil 2.2) [59]. Bu antibiyotik yarı-sentetik olup, ampisisilin para-hidroksi homologudur. AMOX veteriner hekimlikte Gram (-) ve Gram (+) mikroorganizmaları öldüren veya büyümesini inhibe eden madde olarak kullanılır [20,60]. Amoksisilin aynı zamanda, insanlarda ve hayvanlarda, diğer β -laktam antibiyotiklerinden daha yüksek emilime sahiptir [8, 9].

Orta kulak enfeksiyonlarını streptotokal enfeksiyonları, boğaz ağrısı, pnömoni, deri enfeksiyonları ve idrar yolu enfeksiyonlarını tedavi etmek için

kullanılmaktadır. Bu antibiyotik Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) en önemli hayati ilaçlar listesindedir. Çocuklarda yaygın olarak kullanılır.



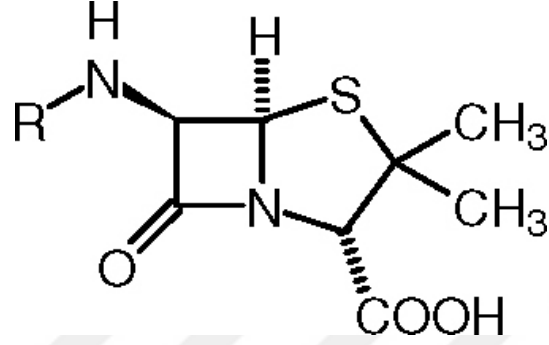
Şekil 2. 2. Amoksisilinin (AMOX) kimyasal yapısı [59].

2.1.6.1. Amoksisilinin ortaya çıkışı

Penisilinler ana halka olarak β -laktam halkası içermektedir. β -laktam halkası bazik ya da nötr çözeltilerde açılır, bu da ilacın etkisini yok eder. Bu halka β -laktamaz enzimi ile de tepkimeye girebilir. Bu enzim bazı penisilin antibiyotiklerini etkisiz hale getiren bakteriler tarafından üretilir. Bu yüzden penisilin antibiyotiklerinin kararlılığının artırılması ve β -laktamaz dayanıklılığın geliştirilmesi için kimyasal yapılarına müdahale etme gerekliliği ortaya çıkmıştır.

1950 yıllarında tüm β -laktam antibiyotik ailesi dar alanda etkili olan, penisilin G ve penisilin V içeren iki bileşikten oluşmaktaydı. Bu yüzden penisilin yan zincirlerini modifiye ederek yeni penisilin türevleri (Şekil 2.3) [61] oluşturmak önem kazandı. Bu yöntemlerden biri fermantasyon sırasında yan halkaların eklenmesidir. Bu yolla üretilen kimyasalların çeşitliliği kısıtlıdır [62]. Daha sonra Beecham Araştırma Laboratuvarından (BRL) bir grup araştırmacı kolay değiştirebilen bir yan zincir olan p-aminobenzene eklemiştir. Broth fermantasyonu ile yeterli miktarda başlatıcı kullanılmadan oluşan 6-aminopenisilianik asit (6-APA) bileşiği ancak 1957 yılında bulunmuştur. Bu bileşiğin yan zinciri yoktur. Bu 6-APA daha sonra sentetik β -laktam

antibiyotiklerini elde etmek için kullanılmıştır. Bunun bir örneği olan β -laktamaz enzimine dayanıklı metisilin 1960 yılında piyasaya çıkmıştır [63].



Şekil 2. 3. Penisilinin temel kimyasal yapısı [61].

1960 yılında ana hedef geniş spektrumda etkili olan penisilin üretmektir. Bu 1961 yılında ampisilin ve daha sonra 1970 yılında amoksisilin senteziyle başarılmıştır. Amoksisilin ampisilin ile etki alanı ve etki gücüyle çok yakın özelliklere sahiptir, fakat ağızdan alındığında çok daha iyi emilmektedir. Aynı dozlarda alındığında kandaki amoksisilin konsantrasyonu ampisiline göre neredeyse iki kat daha fazladır [63].

Amoksisilin 1960 yıllarında İngiltere’de Beecham tarafından geliştirilen 6-aminopenisilanic asit (6-APA) türevi semisentetik bir antibiyotiktir. 1972 yılında piyasaya sürülmüştür ve 1961 yılında ampisilinden sonra piyasaya sürülen ikinci aminopenisilindir [11]. 1981 yılında SmithKline Beecham amoksisilin veya amoksisilin/kluvanat potasyum tabletlerinin patentini alarak 1998 yılında antibiyotiği amoksisilin, amoksil ve trimoks ticari adlarıyla piyasaya sürmüştür [12].

2.1.6.2. Amoksisilin yan etkileri

Amoksisilin yan etkileri genellikle β -laktam antibiyotikleri ile aynıdır. Mide bulantısı, kusma, döküntü ve antibiyotik kaynaklı kolittir. İlaçların yan etkilerini belirlemek için Ocak 1988 yılından Haziran 2005 yılına kadar WHO tarafından yürütülen farmakolojik çalışmalar amoksisilin hakkında 1095 ve amoksisilin/klavulanik asit hakkında 1088 yan etki rapor etmiştir. Bunların arasında deri alerjileri hem amoksisilin hem de amoksisilin ile beraber verilen ilaçlarda %82 ve %76'lık oranla dikkat çekmiştir. Bunun aksine mide-bağırsak, hepatik ve hematolojik yan etkiler sırasıyla %7, %1 ve %1 sadece amoksisilin için ve amoksisilin ile beraber verilen ilaçlarda ise %13, %4 ve %2 çıkmıştır [11]. Amoksisilin kombinasyonu Stevens-Johnson sendromu, domuz vebası ve hepatit hastalıklarına yakalanma riskini artırmaktadır. Amoksisilin ile ilgili yan etkiler Çizelge 2.1'de verilmiştir [63,64].

Amoksisiline karşı alerjik durumlar acil tıbbi müdahaleyi gerektirmektedir. Bu durumlarda ilk aşama akıl sağlığı kaybı, deri döküntüsüyle beraber şiddetli kaşınma ve bazen de ateş yükselmesi, mide bulantısı ve kusmadır. Fakat daha hafif semptomlardan olan kaşınma tedavi süresinin herhangi bir zamanında baş gösterebilir. Amoksisiline alerjisi olan bazı kişilerde yan etkiler anafilaksi yüzünden ölümcül olabilmektedir. Bir haftadan fazla amoksisilin/klavulanik asit kombinasyonu kullanan hastalarda hepatit ortaya çıktığı görülmüştür. Fazla miktarda amoksisilin emilen genç çocuklarda letarji (uyuşukluk), kusma ve böbrek fonksiyon bozukluğu görülmüştür [13,14].

Çizelge 2.1. Amoksisilinin yan etkileri ve görülme sıklıkları [63,64].

Organ / Sistem	Sıklık				
	Sık (1/10)	Bazen (1/100-1/10)	Nadir (1/1000-1/100)	Ender (1/10000-1/1000)	Çok ender (1/10000 altında)
Mide-bağırsak yolu (GIT)	İshal	Mide bulantısı, kusma, mide-bağırsak yanması	Hazımsızlık		Antibiyotik kaynaklı kolit, Siyah tüylü dil, Yüzeysel diş solması
Deri alerjisi		Alerjik deri tepkileri	Tipik Tip I alerjik tepki (kaşıntı, prurit vs)	Eritrema multiforme	Steve-Johnsons sendromu, toksik epidermal nekroliz, büllöz ekzfoliyatif dermatit, şiddetli jeneralize ekzantematöz, püstüloz
Hepatobilier sistem			AST değerlerinde yükselme		Hepatit ve kolestatik sarılık, hepatik etkiler
Sinir sistemi			Baş dönmesi, Baş ağrısı		Tersinir hiperaktivite ve konvülsiyonlar
Kan ve lenfatik sistem				Tersinir lökopeni	Tersinir agranülositoz ve hemolitik anemi, kanama ve protrombin zamanı uzaması
Kardiyovasküler sistem				Tüm alerjiler anafilaktik şoka sokabilir	
Bağışıklık sistemi bozukluğu					
Ürojenital sistem					Anjiyonötik ödem, anafilaksi, serum hastalığı benzeri sendromu, aşırı duyarlılık vasküliti
Enfeksiyonlar ve infestasyonlar		Mukokutanöz kandidiyazis			İnterstisyel nefrit ve kristalüri

2.1.6.3. Amoksisilinin kötüye kullanımı

Amoksisilin, ağızdan alınabilmesi ve diğer antibiyotiklere göre daha yüksek oranda emilmesi nedeniyle hem hayvan hem de insan tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu durumda hastalıkların tedavisinde kullanılan antibiyotik kalıntısı biyolojik sıvılar ve hayvansal ürünlerde birikmektedir. Buna paralel olarak antibiyotiklerin uygunsuz kullanımı gıda maddelerinde kalıntılara yol açmaktadır. Gıda maddeleriyle alınan bu antibiyotikler de insanlarda bazı yan etkilere neden olabilmektedir [10]. Yan etkiler detaylı olarak bir önceki bölümde anlatılmıştır. β -laktam kalıntıları içeren gıdaların tüketilen bazı durumlar alerjik reaksiyonlar ortaya çıktığı literatürde bildirilmiştir [65]. Bu nedenle, gıda maddeleri ve biyolojik sıvılardaki kalıntıları tespit etmek önemlidir.

Antibiyotik ile tedavi edilen çiftlik hayvanlarının eti veya sütü insan tüketimi için kullanılabilir hale gelmeden önce tüm kalıntıların güvenli düzeye inene kadar (spesifik çekilme dönemi) beklenmesi gerekmektedir [66]. Antibiyotiklerin su ürünleri yetiştiriciliğinde kullanılması yalnız gıda güvenliğini değil aynı zamanda çevreyi de tehdit etmektedir. Antibiyotikler ve diğer terapötik kimyasallar hayvan yemlerine ilave edildiği zaman hedeflenmeyen organizmaları da etkilemektedir [15]. Bunun yanı sıra, balık çiftliklerinde kullanılan birçok ilacın su ortamında bulunan diğer canlılar üzerinde de etkili olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle bileşik kalıntılarının hem su ortamında hem de et, süt, yumurta gibi günlük tüketim ürünlerinde izlenmesi çok büyük önem taşımaktadır.

2.1.6.4. Amoksisilinin tayin metotları

Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresine (FDA) göre süt dolu her tankerin β -laktam antibiyotik kalıntısı için test edilmesi zorunludur (1991). Sütte β -laktam antibiyotiklerini hızlı test etmek için genellikle mikrobiyolojik inhibisyon ve hızlı tarama testleri kullanılmaktadır [67,68]. Bu tarama metotlarının spesifik olamaması nedeniyle yanlış olumlu sonuçlar verdiği belirtilmiştir [69]. Bu nedenle olumlu sonuç veren süt örneklerinde β -laktam antibiyotikleri için ilave nicel ve teyit edici tahlil yöntemleri gerekmektedir.

Şu anda, AMOX miktarını belirlemek için, spektroskopi [16,17], kromatografi [18,19], yüzey plazmon rezonansı (SPR) [20] ve elektrokimyasal yöntemler [21,22] gibi bir dizi analitik yöntem kullanılmıştır. Örneğin, Beltran ve arkadaşları yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) için idrar örneklerinden AMOX ekstraktı elde etmek için moleküler baskılama tekniği (MIP) kullanmıştır [70]. Wan ve arkadaşları AMOX için bir kemilüminesans sensörü inşa etmek için MIP kullanmıştır [71]. Szultka ve arkadaşları, HPLC ve kütle spektrometrisini, insan plazma numunelerinde AMOX tespit etmek amacıyla MIP ile birlikte kullanmıştır [72]. Yola ve arkadaşları, hassas AMOX belirlemesi yapmak amacıyla, MIP ile bir SPR sensörü hazırlamıştır [20]. Buna ek olarak, Dönüşümlü voltametri [21,22], kare dalga voltametri [73], Kronoamperometri [74,75] ve diferansiyel puls voltametri [22,76] gibi farklı voltametrik yöntemlerin AMOX kalıntısı tespit etmek için kullanıldığı bildirilmiştir. Camsı karbon elektrotlar (GCEs), nikel-kurkumin kompleksi [71] ve polianilin [72], modifiye edilmiş karbon, çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNTs) [19], MWCNTs / FeCr₂O₄ hibrid filmi [77] ve poliglütamik asit / glutaraldehit [71], modifiye edilmiş elektrotlar ve Au nanopartiküller (NPS) indiyum kalay oksit elektrot [22] bu methodlara dahildir. Bununla birlikte, bunların seçiciliği ve / veya duyarlılığının da artırılması gerekmektedir.

Bu yöntemlerden bazıları amoksisilin tayini için çok duyarlı, doğru ve hassas olmalarına rağmen, rutin kontrol prosedürlerinde bazı dezavantajları vardır. Rutin tespitler hızlı sonuç gerektirmektedir ve bu teknikler zaman alıcıdır. Bu yüzden, gıda örneklerinde amoksisilin tayini hassas ve spesifik olması için kolay, hızlı ve süratli bir metot bulmak önemlidir.

2.2. Biyosensörler

Biyosensörler için genel olarak en çok kabul edilen ifade, biyolojik aktif elementleri uygun fiziksel dönüştürücü ile kimyasal açıdan derişimler ile doğru orantılı, ölçülebilen sinyal üretmek için ortaklaşa çalışan bir analitik cihazdır [23-27]. Aktif biyolojik element, biyolojik olarak üretilen malzeme olup çalışılan örnek ile biyomimetiktir. Bu elementler; dokular, mikroorganizmalar, organeller, hücre reseptörleri, enzimler, antikolar, nükleik asitler vs. olabilmektedir. Fiziksel dönüştürücü ya da detektör ise örneğin biyolojik element ile olan

etkileşimini daha kolay okunabilen ve işlenebilen bir hale getiren alettir. Bu alet fizikokimyasal olarak çalışmaktadır.

Biyosensörler iki şekilde sınıflandırılmaktadır. Birincisi, nükleik asitler, antikor, enzimler gibi cihazın biyolojik elementine göre yapılmaktadır. İkicisi ise optik, piezoelektrik, elektrokimyasal ve termal olmak üzere biyolojik elementin beraber çalıştığı fiziksel detektöre göredir.

Algılama elemanı ve analit arasında etkileşimin bulunduğu sensöre afinite sensörü olarak adlandırılmaktadır. Eğer biyolojik eleman ve analit arasında etkileşim bir kimyasal değişimle devam ediyorsa bu durumda başlangıç maddelerin veya ürünlerin konsantrasyonunun değişimi ölçülmekte ve metabolizma sensörü olarak adlandırılmaktadır. Son olarak da bağlayıcı element analit ile bağlandıktan sonra kimyasal bir değişim olmuyorsa ve bir yardımcı başlangıçta kullanılan malzemeyi değiştiriyorsa bu durum katalitik sensör olarak bilinmektedir. İletme metodu fizikokimyasal değişimi algılamaya göre değişmektedir [28,29].

İlk biyosensörler 1962'de Clark ve Lyons tarafından glikoz oksidaz (GOD) molekülünü amperometrik oksijen elektrotu üzerinde sabitledikten sonra yarı-geçirgen membran üzerinden örneklerdeki glikoz konsantrasyonunu ölçmesiyle ortaya atılmıştır [29,30]. Burada yapılan glikoz konsantrasyonunu belirlemek için bir elektrodun ucuna glikoz oksidaz molekülü bağlayıp enzim dönüştürücüleri membran arasına yerleştirerek daha "akıllı" bir alet olan günümüzdeki elektrokimyasal sensörleri (pH, polarografik, potansiyometrik ve kondüktometrik) yapmışlardır. O zamandan beri biyosensörler halk sağlığı ve çevresel faaliyetlerin izlenmesinden gıda güvenliğine kadar birçok farklı alanlarda başarıyla uygulanmaya devam etmektedir [29,31,78,79,80]. İlk biyosensör olarak tanımlanan bu cihaz 1962 yılında yapılmış olmasına rağmen biyosensörlerin bulunuşu ve gelişmesi çok daha öncesine dayanmaktadır. Biyosensörlerin kronolojik gelişmesi şu şekilde gerçekleşmiştir [81]:

- 1916 - İlk kez bir invertaz proteini aktifleştirilmiş kömür üzerine adsorblanarak Nelson ve Griffin tarafından sabitlenmiştir.
- 1922 - İlk cam pH elektrotları ortaya çıkmıştır.
- 1956 - Clark tarafından oksijen elektrodu bulunmuştur.

- 1962 - Clark tarafından ilk biyosensör kavramının ortaya atılmış ve glikozu ölçmek için amperimetrik enzim elektrodu yapılmıştır.
- 1969 - İlk potansiyometrik biyosensörün bulunması: ürenin ölçülmesi için üreaz proteininin ammonyum elektroduna bağlanmasıyla bulunmuştur.
- 1970 - İyon seçici alan-etkili tranzistör Bergveld tarafından icat edilmiştir
- 1972/5 - İlk ticari biyosensörler ortaya çıkmıştır: Yellow SPRings Instruments tarafından üretilen kalem şeklinde tek kullanımlık glikoz biyosensörü üretilmiştir.
- 1975 - İlk mikrop tabanlı biyosensör, ilk bağışıklık sensörü: platinyum teli üzerinde ovalbumin proteini ile yapılmıştır, pO₂/PCO₂ optik sensörü üretilmiştir (floresan sinyal & gaz geçirgen membranların kullanılması).
- 1976 - Miles tarafından ilk kez yapay pankreas yapılmıştır.
- 1980 - Peterson tarafından kandaki gazların ölçümü için fiber optik pH sensörü yapılmıştır.
- 1982 - İlk fiber optik tabanlı glikoz sensörü yapılmıştır.
- 1983 - İlk yüzey plazmon rezonansı (SPR) tabanlı medikal sensör yapılmıştır.
- 1984 - Amperometrik sensörlerin aracı olarak kullanılması: glikoz tayini için ferrosen ile glikoz oksidaz kullanılarak yapılmıştır.
- 1987 - Glikoz biyosensörü üreticisi olan MediaSense ExacTech şirketi kurulmuştur.
- 1990 - SPR tabanlı sensörler üreten Pharmacia BIAcore şirketi kurulmuştur.
- 1992 - i-STAT kan tahlil cihazı üretilmiştir.
- 1996 - Kolay glikoz ölçümü yapan Glikokartlar çıkmıştır. Aynı yıl Abbot MediSense şirketini 867 milyon dolara satın almıştır.
- 1998 - LifeScan şirketi FastTake kandan glikoz tayini biyosensörünü üretmiştir, aynı yıl Roche'nin Mergeri ve Boehringer Mannheim Roche Diagnostics şirketini kurmuştur.
- 2001 - LifeScan Inverness Medical tarafından yürütülen glikoz test işini 1.3 milyar dolara satın almıştır.

- 1999-günümüz - BioNMES, kuantum noktacıkları, nanoparçacıklar, nanokonsollar, nanoteller ve nanotüpler biyosensör yapımında kullanılmaktadır.

Yakın zamanda Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (UIPAC) tarafından ortaya atılan biyosensör tanımı şöyledir: “Biyosensör; kendi kendine yeten, transdüktöre bağlı olan, bir biyolojik algılama elementi (biyolojik reseptör) kullanarak kantitatif veya yarı kantitatif analitik bilgi toplama yeteneğine sahip entegre bir cihazdır” [82]. Bir biyosensör biyoanalitik sistemden farklı olarak, biyoanalitik sistemler reaktif ekleme gibi fazladan işlem aşaması gerektirmektedir. Biyosensörlerin en önemli özelliklerinden biri seçici olmasıdır. Bunun yanı sıra biyosensörler geleneksel analitik tekniklere göre pek çok üstünlüğe sahiptir. Biyosensörler, hızlı ve gerçek zamanlı ölçümler yapabilmeleri, yüksek seçiciliğe sahip olmaları, kalibrasyon için çok az miktarda analite ihtiyaç duymaları, hızlı tepki vermeleri ve ayrıca apolar molekülleri ölçebilmeleri nedeniyle adeta bilim dünyasında çığır açmışlardır [32].

Başarılı bir biçimde biyosensör yapmak için öncelikle bazı şartlar sağlanmalıdır; analiz için seçilen biokatalizör yüksek seçiciliğe sahip olmalı, uygun saklama şartları altında kararlı olmalı ve son olarak da birden fazla analiz arasında çok az farklılık göstermelidir. Tepkime koşulları, pH ve sıcaklık gibi fiziksel parametrelerden bağımsız olmalı ve bu parametreler kontrol edilebilmelidir. Bu da analit örneklerinin en az ön işleme ile tayin edilebilmesini sağlar. Eğer tepkime bir kofaktör veya koenzim içeriyorsa bunlar da enzim ile sabitlenmelidir. Tepki zamanının doğru, hassas, yenilenebilir ve konsantrasyona göre lineer bağımlılık göstermesi gerekmektedir. Aynı zamanda dönüştürücüden gelen gürültü sinyali de yok edilmelidir. Eğer biyosensör klinik ortamında invaziv izleme için kullanılacak ise sonda küçük ve biyouygun olmalıdır, toksik olmamalı ve antijen bulundurmamalıdır. Özellikle insandan alınan örneklerin izlenmesi için biyosensör gerçek zamanlı ölçüm yapabilmelidir. Nihayetinde üretilen biyosensör malzeme ucuz, küçük, taşınabilir olmalı ve kullanımı tecrübe gerektirmemelidir [33]. Bunun gibi zor şartları sağlayabilen biyosensörler, günlük hayatta klinik, medikal uygulamalar, biyoreaktör, kalite kontrolü, ziraat ve veterinerlik ilaçları, bakteriyel ve viral

teşhis, ilaç üretimi, endüstriyel atık suların kontrolü, madencilik, savunma sanayii gibi birçok farklı alanda kullanılmaktadır [83,84].

2.2.1. Biyosensörlerin Türleri

2.2.1.1. Biyolojik algılama elementine göre türleri

2.2.1.1.1. Enzimler

Enzimler, biyosensörlerde algılama elemanı olarak sıklıkla kullanılan malzemeler arasındadır. Bu tarz biyosensörlerde hedef moleküller için tasarlanmış enzimler ürün oluşumunu katalizlemek için kullanılmaktadır. Daha sonra bu cihaz sinyal dönüştürücüler ile ortak çalıştırılmaktadır. Kullanılan enzimler ve bu enzimlerin işlevsel görevleri aşağıda Çizelge 2.2'de verilmiştir [85]. Kullanılan en basit enzimatik biyosensör tasarımında, enzimatik tepkimenin ürünü veya substratı elektrokimyasal olarak aktiftir ve elektrodun üzerinde hızlı bir şekilde oksitlenebilir veya indirgenebilir. Enzimler görevlerine göre, substrat ve inhibitör olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Substrat biyosensörler enzimatik tepkimenin spesifik substratlarını algılamak için tasarlanmıştır. Buna örnek olarak glikoz oksidaz bazlı enzimatik sensör kullanarak glikoz tayini veya üreaz sensörüyle üre tayini yapılması verilebilir [86,87]. İnhibitör sensörler enzimin aktivitesini düşüren maddeleri algırlar. Buna örnek olarak ise asetokolinesteraz katalizörlü asetokolin hidrolizini inhibe eden organofosfor pestisitlerin tayini gösterilebilir [88,89]. En sık kullanılan enzimatik biyosensörler glikoz ve üre biyosensörüdür [90]. Enzim tabanlı biyosensörlerin performansını enzim miktarı, pH, sıcaklık ve bazı durumlarda kofaktör gibi parametreler etkileyebilir. Elektrodun verimini etkileyebilecek bir faktör de enzimi yüzeye sabitleme yöntemi ve sensör yüzeyindeki enzim tabakasının kalınlığıdır [86].

Çizelge 2. 2. Enzimlerin işlevsel görevlerine göre sınıflandırılması [85].

Enzim kategorisi	Enzimin işlevsel görevi
Oksidoredüktazlar	Oksitleme / indirgeme tepkimeleri
Transferazlar	Bir molekülden başka moleküle fonksiyonel grupların taşınması
Hidrolazlar	Hidrolitik ayrılma
Lyazlar	C-C, C-O, C-N bağlarının oksitleme veya hidroliz ile kırılması
İzomerazlar	Molekül içi yer değiştirme
Ligazlar	İki molekülün bağlanması

2.2.1.1.2. Antikorlar

Antikor, yüzlerce amino asitin düzgün bir şekilde sıraya girmesiyle oluşan kompleks biyomoleküldür. Antijen özgül antikor kendine özgü antijenine çok yüksek seçicidir. Onların bu eşsiz özelliği bağışıklık sistemi için çok büyük önem taşımaktadır. Tek analit olan antijenler antikorların bağlama yerlerine tutunmaktadır [91]. İmmüno globulinler bağışıklık sistemi tarafından üretilen reseptörlerdir. Bunlar vücuda tanınmadık bir biyolojik bileşiğin (antijenler) girmesine karşılık olarak salgılanan maddelerdir. İmmüno globulinler de antikor adıyla bilinmektedir. Kanda antijenlerin var olması bazı maddelerin toksik olması veya enfeksiyonun yayılması sonucu algılanabilmektedir. Antijenler sadece biyolojik sıvılarda değil doğal ortamlarda da tayin edilebilir. Antikorlar özgül antijen olması şartıyla neredeyse her bileşiği yüksek seçicilikte algılayabilmektedir [92].

2.2.1.1.3. Nükleik asitler

DNA, RNA ve peptit nükleik asit tabanlı biyosensörler yüksek seçicilik ve algılama kabiliyetlerini, nükleotit dizilimini bir arada tutan güçlü baz çiftlerinin afinitesinden almaktadır [93]. Nükleik asit (NA) tabanlı biyosensörler NA'ları (oligo- ve polinükleotitlerin doğal veya mimetik formları) biyolojik algılama elemanı olarak kullanır. Günümüzde DNA hibridizasyonu sensör sondaları olarak sentetik oligodeoksiribonükleotitleri (ODN) kullanılmaktadır [94]. ODN'leri

sinyal dönüştürücü yüzeyinde sabitlemek için tiyoller, disülfidler, aminler veya biyotinler kullanılmaktadır. Bunun gibi diğer nükleik asitler canlı organizmalardan türetilmemekte, sadece onların bazı fragmanlarını içeren sondalar alınmaktadır.

DNA sensörlerin başka bir amacı da özellikle DNA fragmanlarıyla etkileşime giren proteinleri ve makromoleküler bileşikler ortaya çıkarmaktır. Bu proteinler, DNA'ya zarar veren tümör işaretleyicileri ve birçok antikanser ilacı olabilmektedir. Böylece patojen mikroorganizmaları ve virüslerin güvenilebilir bir şekilde tayin edilmesini sağlamaktadır. Bu yöntemle genetik teşhisde yaşanan sorunlar da çözülmektedir [89,95,96,97]. Bu yöntem akrabalık, genetik bozukluğun tespiti ve GDO'lu ürünlerin tespitinde kullanılmaktadır.

2.2.1.2. Sinyal dönüştürücüye göre türleri

Biyosensörler dönüştürücü türüne göre elektrokimyasal, optik, piezoelektrik, kalorimetrik olarak üçe ayrılmaktadır.

2.2.1.2.1. Elektrokimyasal dönüştürücüler

İlk bilimsem olarak önerilen ve başarılı bir şekilde ticarileşen biyosensörler elektrokimyasal tabanlıdır [98]. Bu sınıftaki biyosensörlerin temel çalışma prensibi sabitlenmiş biyomolekül ve analit arasındaki tepkime sonucu iyon veya elektron oluşması veya emilmesine ve bunun sonucu olarak da çözeltinin elektriksel özelliklerini değiştirmesine dayanmaktadır [99,100]. Elektrokimyasal sinyal de analit miktarı ile eşleştirilmektedir. Bu tarz elektrokimyasal dönüştürücüler kendi içinde çalışma prensibine göre ayrılmaktadır.

-Potensiyometrik transdüktörler; bir biyokimyasal tepkime sonucunda iyonlar oluşmakta ve bu da çözeltinin iletkenliğini ya da direncini değiştirmektedir. Bu durumda analitik sinyal ana elektrot ve referans bir elektrot arasındaki gerilim farkına denk gelmektedir. Ayrıca iki referans elektrot birbiriyle yarı geçirgen membran ile ayrılmış olabilir. Bu tarz dönüştürücülerde ise iyon seçici elektrot (ISE) sinyal transdüktörü olarak görev yapmaktadır. En yaygın olarak kullanılan potensiyometrik biyosensörler pH metrelerdir.

-Voltametrik transdüktörler; elektroaktif elemanların oksitlenme veya indirgenme akımını ölçülmektedir. Bunun sonucunda elektrotlar arasında görünür potansiyel fark oluşturmaktadır. Çoğu durumlarda, referans elektroda sabit potansiyel uygulanmaktadır. Ölçülen akım ya elektroaktif elemanların konsantrasyonuna ya da harcanma - oluşma hızına bağlı olmaktadır [32].

-Kondüktometrik transdüktörler; bu tarz dönüştürücüler çözeltinin elektriksel iletkenliğini biyokimyasal tepkime boyunca ölçer. Biyolojik tanıma elemanı enzim gibi elektrik iletkenliği olmayan malzemeler olduğunda kullanımları azalır. Kondüktometrik biyosensörler, hücre çözeltisinin elektriksel iletkenliğindeki değişimi algılayabilmektedirler. Çoğu tepkime çözeltinin içeriğinin değişmesine neden olmaktadır. Bu değişim analitin konsantrasyonundaki değişime denk gelmektedir [101].

Alan etkili transistör tabanlı transdüktörler; İyon-seçici alan etkili transistör (ISFET) tabanlı biyosensörler bu gruba aittir. Yarı iletken alan etkili transistörlerin (FET) yüzeyi iyon duyarlıdır. Yüzey elektrik potansiyeli yarı iletken ve iyonlar arasındaki tepkime nedeniyle değişmektedir. Bu değişim ölçülerek sinyal haline getirilmektedir.

Elektrokimyasal biyosensörler en büyük avantajlarından biri sisteme zarar vermeden ölçüm alabilmeleridir [102]. Bu tarz biyosensörlerin endüstriyel ve çevresel analizlerde kullanımı önemlidir [103]. Gıda üretimi kontrolü, gıda kalitesinin değerlendirilmesi, fermantasyon sürecinin kontrolü ve organik kirleticilerin izlenmesi elektrokimyasal biyosensörlerin uygulamalarından birkaçıdır.

2.2.1.2.2. Optik dönüştürücüler

Optik dönüştürücülerin kullanıldığı biyosensörlerde sinyal ışık ile doğru orantılıdır. Optik transdüktörler ışığın absorplanması, flüoresans, lüminesans, iç yansıma, yüzey plazmon rezonans veya ışık yayılma spektroskopisi tabanlı olabilmektedir. Flüoresans tabanlı biyosensörler çok kısa süren elektromanyetik radyasyonun yayılması sonucu frekans değişikliğini algılamaktadır. Parlak bir sinyal elde etmek için tek bir molekülün ışınlanması bile tek hücreden sinyal almak için yeterli olmaktadır [104]. Optik yayılma

tabanlı cihazlarda silikon yüzeyi protein ile kovalent bağlanarak kaplanmaktadır. Daha sonra bu protein kaplı silikon maske kullanılarak morötesi ışığa maruz bırakılmaktadır ve antikolar bu durumda inaktif kalmaktadır. Silikon parçaları analit ile etkileşime sokularak aktif olan kısımlarda antikor-antijen bağları oluşturulmaktadır. Bunun sonucunda lazer veya başka ışık kaynağına maruz bırakıldığında yayılma meydana gelmektedir. Oluşan sinyal doğrudan veya artırılarak işlenmektedir [98]. Fiber optik biyosensörler (FOBS) optik fiberleri dönüştürücü olarak kullanılmaktadırlar ve hedef molekülleri algılamak için sadece optik dönüşüm mekanizması devreye girmektedir. Yüzey plazmon rezonans (SPR) tabanlı biyosensörler analit çözeltisi ve SPR yüzeyine sabitlenmiş biyolojik eleman arasındaki etkileşimi özel elektromanyetik dalgaları kullanarak izlemektedir. Bu tarz biyosensörlerin avantajları biyolojik analitlerin algılanması ve biyomoleküler etkileşimlerin izlenmesidir, bu durumda SPR biyosensörler etiketleme ihtiyacı olmadan hızlı gerçek zamanlı analiz teknolojisi sunmaktadır [34]. Örneğin sütteki kazeini algılamak için altın nanoparçacıkların kullanıldığı SPR tabanlı biyosensör yapılmıştır [105].

Son yıllarda fiber optik tabanlı biyosensörler hasta bakımını büyük ölçüde geliştirerek ve ameliyat maliyetlerini ciddi derecede düşürerek medikal alanda çok başarılı olmuştur. Günümüzde erken kanser ve AIDS teşhisi gibi birçok medikal uygulamada kullanılmaktadır.

2.2.1.2.3. Piezoelektrik dönüştürücüler

Piezoelektrik sensörler elektrik potansiyeli altında deformasyona uğrayan kristalleri kullanmaktadır. Kuvars, tourmalin, lityum niobat veya tantalat, çinko oksit veya alüminyum nitrid gibi birçok malzeme piezo etkisi göstermektedir. Sabit frekansta dalgalı akım kristalin yapısını sabit tutmaktadır. Analitin biyolojik tanıma elementleriyle kaplı kristal yüzeyine adsorblanması sonucu rezonans frekans değişmektedir bu da bağlanmanın gerçekleştiğini göstermektedir. Piezoelektrik biyosensörler şu ana kadar yapılmış en hassas sensörler arasında göstermektedir, zira bunlar antijenleri pikogram seviyesinde bile algılayabilmektedir. Piezoelektrik dönüştürücüler molekülleri etiketleme gerekmeden algılayabilmektedir [106].

Kristal yüzeyinin uygun molekül veya algılama tabakası ile kaplanarak moleküler algılamada yeni kapılar açıldığından beri piezoelektrik cihazların uygulaması büyük ilgi görmektedir. Bunun yanı sıra piezoelektrik biyosensörler gıda, çevresel ve klinik analiz alanlarında başarılı bir şekilde uygulanmaktadır [107].

2.2.1.2.4. Kalorimetrik (Termal) dönüştürücüler

Kalorimetrik biyosensörler, biyomoleküllerin sıcaklık sensörleri üzerine sabitlenmesiyle elde edilmiştir. Analit biyokomponent ile bir araya geldiğinde analitin konsantrasyonuna denk gelen tepkime sıcaklığı ölçülmektedir. Toplam alınan veya verilen ısı miktarı tepkime elemanlarının toplam molar entalpilerine eşittir. Sıcaklık ölçümü termistör ile yapılmaktadır ve bu tip cihazlar enzim termistörü olarak adlandırılmaktadır. Termal biyosensörler kalibrasyona ihtiyaç duymamaktadır ve örneğin optik veya elektrokimyasal özelliklerine karşı duyarsızdır [105]. Kalorimetrik biyosensörler gıda, kozmetik, farmakolojik alanlar gibi birçok farklı alanda kullanılabilir [108,109]. Bunun yanında termal biyosensörlerin kullanımı çok yaygın değildir [94].

2.2.2. Biyoalgılama elemanlarının sensör yüzeyine sabitlenmesi

Bir biyosensörün doğru çalışabilmesi için biyomalzeme, dönüştürücü yüzeyine bağlanmalıdır. Bu işlem biyolojik bileşenin sabitlenmesi denmektedir. Sabitlemek demek biyomalzemeyi (enzim, antikor, nükleik asit) çözünür hale getirerek transdüktörün yüzeyine kimyasal ya da fiziksel şekilde tutturma işlemidir. Biyomalzemeleri sabitlemek için kullanılan birkaç yöntemden aşağıda belirtilmiştir [92,110].

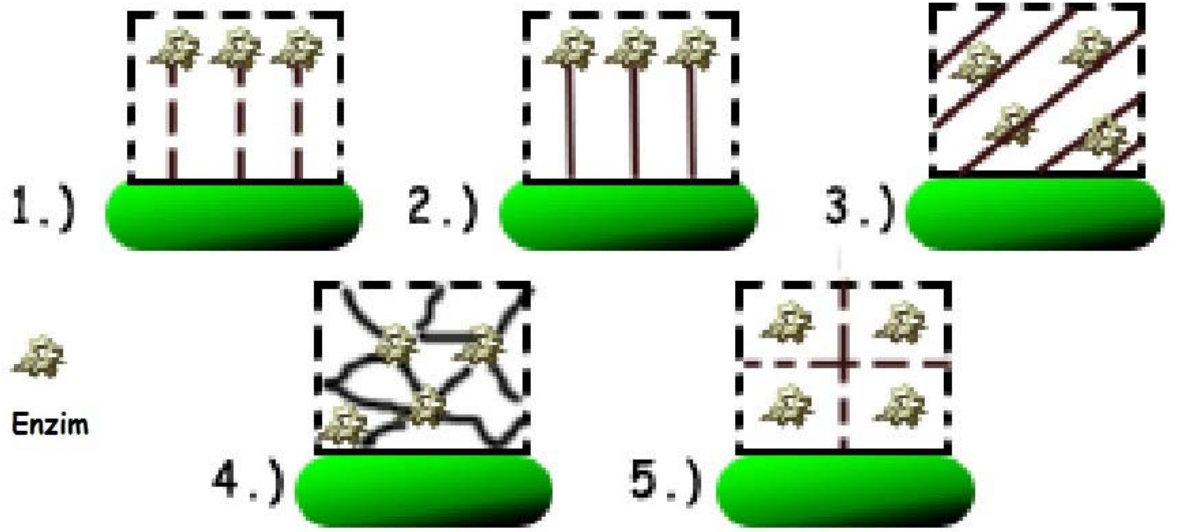
-Adsorblama: Bu durumda hem fiziksel hem de kimyasal adsorblama olabilmektedir. Fiziksel adsorblama, sensörün yüzeyine biyomalzemeleri bağlamak için Van der Waals, hidrojen bağları ve iyonik etkileşimleri kullanır. Selüloz, kolodyum, silika jel, cam, hidroksiapatit ve kollajen gibi birçok substrat biyomolekülü adsorbe edebilmektedir. Bu yöntem çok basittir, fakat biyomoleküllerin sabitlendiği bağlar çok güçlü olmadığı için kolaylıkla kırılabilir. Bu nedenle adsorblama yöntemi ile hazırlanan biyosensörler uzun ömürlü olmamaktadır.

-Kovalent bağlama: Sensör yüzeyi biyolojik malzemelerin bağlanabileceği kimyasallar ile kaplanmaktadır. Biyolojik algılama malzemesi olarak enzimler kullanıldığında bu kimyasallar biyotepkimeyi kataliz etmeyecek şekilde seçilmektedir. Genellikle proteinlerin amin, karboksilik, imidiazol, tiyol, hidroksil gibi nükleofilik gruplarını sensör yüzeyine bağlamak için kullanılır. Bu metot yüzey homojenliğini, biyomoleküllerin eşit dağılımını ve dağılım yoğunluğunu artırmaktadır. Kovalent bağlama biyomoleküllerin kararsızlığı, difüzyonu ve agregasyonu gibi sorunları azaltmakta veya tamamen ortadan kaldırmaktadır [111].

-Matriks kalıplama: Bu durumda biyomoleküller bir polimer jel matriksine hapsedilmektedir. Bu metot için genellikle poliakrilamid, nişasta, aljinat, pektat, polivinil alkol, polivinil klorür, polikarbonat, selüloz asetat ve silika jel kullanılmaktadır. Matriks kalıplamanın dezavantajlarından biri hapsedilme sırasında biyomalzeme polimer matriksinden dışarı akabilmektedir, bu da verimi azaltmaktadır [113].

-Çapraz bağlama: Moleküller arası çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit, heksametilen diizosiyanür, 1,5-difloro 2,4-dinitrobenzen ve bisdiazobenzidin-2,2'-disülfonik asit gibi fonksiyonel ya da çoklu-fonksiyonel malzemeler kullanılmaktadır. Bunların arasında enzimlerin lizin amino grubuyla bağ yapan glutaraldehit kullanılmaktadır.

-Kapsülleme: Bu yöntemde biyolojik malzeme etrafında delikli enkapsülasyon matriksi oluşturularak malzemenin sensöre bağlanması kolaylaştırılmaktadır. Bu yöntem için bir başka yaklaşım da cam, seramik ve başka inorganik malzemelerin yüzeyine biyolojik molekülleri sol-jel yöntemi ile sabitlemektedir. Bu durumda, biyomalzemeler okzo-bağlanmış SiO₂ ağı gibi delikli matrikslerde kapsüllenmektedir. Bu kapsüller optik olarak transparan olduklarından dolayı kimyasal etkileşimleri kolay izlenebilir kılmaktadır. Sol-jel yönteminin oda sıcaklığında yapılabilmesi nedeniyle biyomoleküllerin denatürasyonu önlenmektedir. Bu yöntemle sabitlenen biyomoleküller çok kararlı olmasına rağmen tekrarlanabilir delikli sol-jel yapmak hala ciddi bir sorun olmaya devam etmektedir [113]. Bu yöntemlerin tamamı Şekil 2.4'de gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Biyomoleküllerin sensör yüzeyine sabitleme yöntemleri: 1) Adsorpsiyon, 2) Kovalent bağlama, 3) Matriks kalıplama, 4) Çapraz bağlama 5) Kapsülleme [113].

2.2.3. Biyosensörlerdeki son gelişmeler

Biyosensör geliştirme çalışmalarında uygun biyoreseptör, uygun sabitleme yöntemi ve transdüktörü seçimi önemlidir. Biyoloji, biyokimya, kimya, elektrokimya, fizik, kinetik ve kütle transferi gibi bilimlerin biyosensör çalışmalarında kuşkusuz önemi büyüktür. Bundan yola çıkarak biyosensör konulu çalışmalara disiplinler arası çalışmalar denebilir. Teknolojinin gelişmesiyle birlikte disiplinler arası çalışmaların artması, biyosensörlerin günlük hayattaki kullanımlarını arttırmaya başlamıştır.

2.2.3.1. Mikrobiyosensörler

Küçük, entegre ve güvenilir mikrotransdüktörlerin biyolojik duyu elemanlarıyla birleştirilmesi teknolojisindeki önemli gelişmeler son on yılda biyosensör alanında adeta bir çığır açmıştır. Bu tür mikrobiyosensör sistemler hücre metabolizma konularına açıklık getirmiştir ve insan metabolizmasının biyolojisini tamamıyla anlamadaki beklentileri ciddi derecede artırmıştır. Son yıllarda kanser, kan veya diğer vücut sıvılarında antijen değişiminin izlenmesiyle kolaylıkla tespit edilebilmektedir [112]. Aynı şekilde diyabet de kandaki glikoz miktarının zamanla değişimi ölçülerek izlenebilmektedir [113].

Fakat bu cihazların yaygın klinik kullanımına rağmen bazı potansiyel eksikleri vardır. Örneğin, bu cihazların tepki zamanlarının çok yavaş olması bazı hastalar için muayene sürecini zorlaştırmaktadır. Ayrıca bu sensörlerin maliyetli yüksektir ve sağlık endüstrisinde bu sensörler için yılda milyarlarca dolar harcanmaktadır [114]. Bu sebeple daha verimli ve daha güvenilir sensör teknolojisinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

2.2.3.2. Nanoteknolojik yenilikler

Nanoparçacıklar üstün kimyasal, fiziksel ve elektronik özellikler göstermektedir. Büyük malzemelerden en önemli farkı yüksek yüzey-hacim oranıdır, bu da biyosensörlerin performansını artırmaktadır [115]. Metal, oksit, yarı iletken veya kompozit gibi çeşitli nanoparçacıklar biyosensörler için kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra farklı nanoparçacıklar farklı biyosensör sistemlerinde farklı roller oynayabilmektedir. Örneğin altın nanoparçacıklı ince film elektrotlar çift-zincirli DNA adsorblanmasıyla yüzeye DNA sabitlemesi için kullanılmıştır [116]. Altın nanoparçacıklar glikozu mikromolar derişimlerde algılamada yüksek performans göstermiştir. Altın nanoparçacıklar ile değiştirilmiş amperometrik biyosensörler pestisitlerin belirlenmesinde önemli gelişme kaydetmiştir. Fonksiyonel nanoparçacıklar (elektronik, optik ve manyetik) biyolojik moleküllere (peptitler, proteinler, nükleik asitler) bağlanarak çeşitli sinyalleri algılamak ve artırmak için kullanılmıştır [117,118].

2.2.3. Biyosensörlerin uygulama alanları

2.2.3.1. Klinik muayene

Biyosensör alanındaki gelişmeler son yıllarda büyük bir yol kat etmiş olsa da biyosensör piyasasının %90'nını oluşturan glikoz biyosensörler hariç, klinik uygulamalarda kullanımı çok yaygın değildir. İstenmeyen moleküllerin gerçek örneklerle etkileşimi, yüksek seçiciliği ve doğruluğu hala sorun teşkil etmektedir. Bu sorunların çözülmesi klinik etiketlemede istenmeyen moleküllerin giderilmesi açısından çok önemli olabilmektedir. Piyasada satılan birçok biyosensör amperometrik tabanlıdır [119]. Glikoz konsantrasyonu diyabet ve diğer endokrin metabolizma bozukluğu gibi hastalıklarda en çok

izlenen göstergedir. Kandaki glikoz, elektrolitler ve gazlardan sonra en çok ölçülen analittir [120].

2.2.3.2. Gıda kontrolü

Gıda sektörü ve biyoteknoloji alanlarında biyosensörler medikal alanlarda olduğu kadar sık kullanılmamaktadır [121]. Medikal alanda kullanılan örnekler kan, serum veya idrar iken gıda sektöründe örneklerin içeriği çok fark olabilmektedir. Bu da biyosensör optimizasyonu, tasarımı ve birleştirilmesini zorlaştırmaktadır. Gıda sektöründe biyosensörlerin kullanımına örnek olarak amperometrik biyosensörler verilebilir. Şarap veya alkollü içeceklerde glikoz, fruktoz, gliserol, laktik asit, maleik asit veya asetik asit gibi analitlerin tayini için oksidoredüktaz enzim tabanlı amperometrik biyosensörler kullanılmaktadır.

2.2.3.3. Çevresel izleme

Çevre kirliliği izlenmesinde kimyasal analizler tek başına ekolojik riskler veya atık suların kirliliği hakkında yeterli bilgi verememektedir [122]. Avrupa Birliğinde suların işlenmesi gibi sert kuralların (91/271/EEC Konsey Direktifi) yanı sıra atık suların çevreye dökülmeden önce belirli toksisite değerlerine uygun olması gerekmektedir. Bu yüzden toksisite ölçümleri için biyotahlil yöntemleri ve biyosensörler geliştirilmiştir. Örneğin Microtox ® (Azur, Buks, BK) toksik tahliller lüminesan bakteri tabanlıdır. Hızlı ekotoksisite analizi için Escherichia coli bakterilerini kullanan Cellsense ® ise bir başka örnektir.

Endokrinler estrogen reseptörlerine bağlanabilmektedir. Bundan yola çıkarak potansiyel toksisite incelemesinde endokrin bilgisi sağlayan estrogen tabanlı biyosensörler yapılmıştır. Bu sensörlerin kullanımının basit olması büyük bir avantajdır [123]. Doğal kaynak sularında pestisitlerin bulunma sebebi pestisitlerin yaygın kullanılmasıdır. Her ne kadar HPLC/MS ve GC/MS teknikleri yeterli bilgileri verse de biyosensörler ucuz ve daha hızlıdır. Bunların yanı sıra fenoller, sülfektanlar, alkanlar, aromatik bileşikler ve poliaromatik hidrokarbonlar gibi birçok çevre kirleticilerinin tayini için de çeşitli biyosensörler geliştirilmiştir [124].

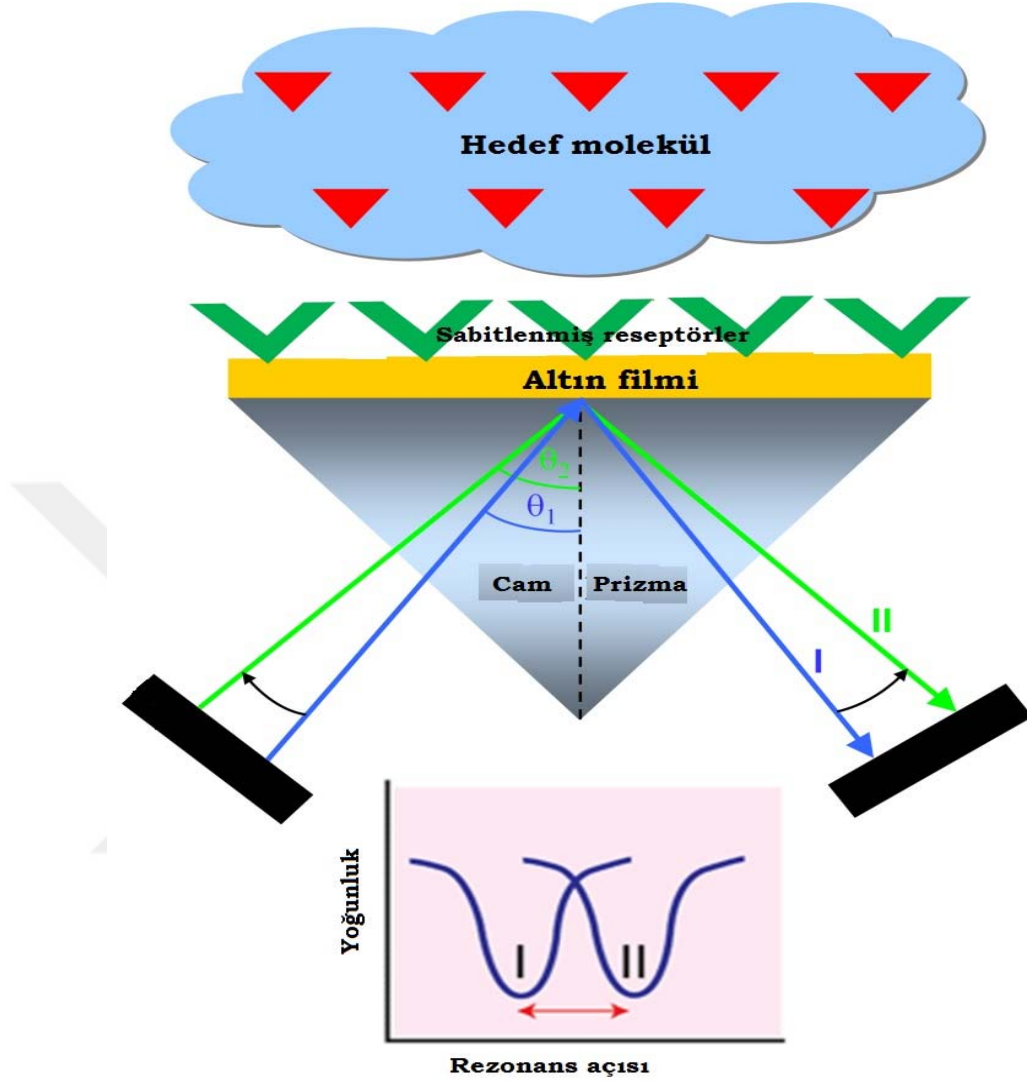
2.3. Yüzey Plazmon Rezonans (SPR)

Yüzey plazmon rezonans (SPR), pozitif ve negatif geçirgenliği olan iki malzeme arasında ışık ile elektronların rezonans osilasyonu sonucu oluşan olaydır. SPR sensörler son yıllarda büyük ilgi toplamıştır [125,126]. SPR p-polarize ışığın bir prizmadan geçerek prizma yüzeyini kaplayan ince metal tabakasına belli bir açıda çarpması sonucu oluşan bir olaydır [127]. Yüzey plazmon polaritonu radyoaktif olmayan materyalin negatif geçirgenliğine paralel elektromanyetik yüzey dalgasıdır.

Monokromatik polarize ışık iki transparan ortam arasına girdiğinde yüksek kırılma endeksi daha yüksek olan ortamdaki ışık kısmen yansır ve kırılır. Örneğin bu iki ortam olarak prizma ve tampon çözeltiyi alırsak ışık prizmadan çözeltiliye geçerken kısmen kırılmaktadır ve yansımaktadır. Kritik açının üstünde ise ışık tamamen yansımaktadır, bu olay toplam iç yansıma (TIR) olarak bilinmektedir. SPR metodunda cam prizma yüzeyi altın film ile kaplanmaktadır. Altın gibi iletken metallerde değerlik elektronları plazma osilasyonu ya da başka adıyla plazma dalgaları yaratmaktadır. Başka periyodik elektromanyetik dalgalar gibi bunlar da parçacık-dalga teorisi ile değerlendirilebilir. Fotonlar ve fononlar ışık ve ses dalgalarının parçacık halinin adı olduğu gibi plazmonlar da plazma dalgalarının parçacık halidir. Yüzey plazmon rezonans metal yüzeyine hapsedilmiş plazmonlardır. Bu plazmonlar altın yüzeyi ve tampon çözelti arasında oluşmaktadır. Bu plazmonlar hem altın film hem tampon çözelti hem de prizma boyunca 100 nm 'ye kadar uzanan elektriksel alan oluşturmaktadır. Bu dalgalar zamanla sönmektedir.

Gelen ışık dalgası TIR ile aynı açıya sahipse yüzey plazmon rezonans oluşmaktadır. Rezonans açısı (θ) denilen bu açıda ışıktaki fotonların momentumu (vektörel yön ve büyüklük ile) yüzey plazmonları ile aynıdır ve fotonlar plazmonlara dönüşmektedir. Başka bir ifadeyle, optik enerji altın yüzeyine bağlanmış durumdadır. Malzemenin içeriğindeki herhangi bir değişim, örneğin sabitlenmiş yüzeydeki aptamerlere hedef moleküllerin bağlanması yüzey plazmonlarının ve sönümlü dalgaların momentumunu değiştirmektedir. Bunun sonucunda rezonans daha önceki plazmon açısında oluşmamaktadır ve bir kayma gözlenmektedir. Bu rezonans açısındaki kayma

altın filmi yüzeyindeki kütle değişimi ile doğru orantılıdır. Bu olay Şekil 2.5’de gösterilmiştir [128].



Şekil 2.5. Altın yüzeyinde bulunan reseptörlere hedef moleküllerin bağlanması sonucu rezonans açısının kayması [128].

1902 ve 1912 yılları arasında R. M. Wood (1868-1955) John Hopkins Üniversitesinde (Baltimore, USA) metal destekli difraksiyon ışına polarize ışığı yansıttığında geri yansıya ışıkta alışılmadık karanlık ve aydınlık spektrumlarını gözlemlemiştir [129,130]. Wood’un gözlemlediği alışılmadık ışınların resmi

Şekil 2.613’da verilmiştir. Wood her ne kadar ışık, metal ve kırınım ağının etkileşimini tahmin etmeye çalışsa da olayın açıklaması tam olarak yapılamamıştır. Bu olayın ilk teorik açıklaması 1907’de Lord Rayleigh tarafında yapılmıştır [131]. Rayleigh kendisinin “kırınım ağı dinamik teorisini” geri

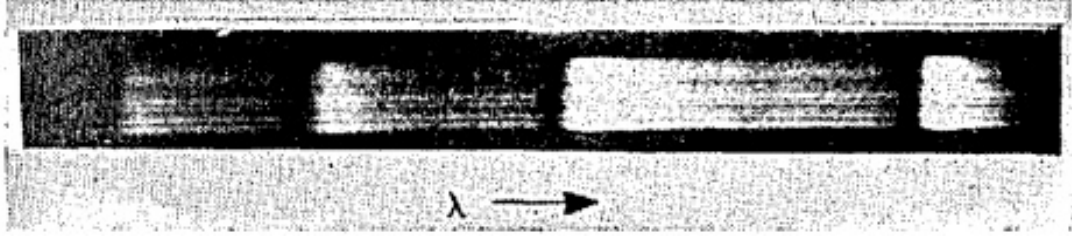
yansıyan ışıkların elektromanyetik alanına uygulamıştır. Bunun sonucunda geri yansıyan ışıkların Wood'un gözlemlediği ışık dalgaları ile aynı olduğunu fark etmiştir ve daha sonra bu dalgalar Rayleigh dalga boyları olarak tarihe geçmiştir. Ellilerde gazlarda ve ince tabakalarda elektron kaybına dair daha çok deneyler yapılamaya başlanmıştır [132]. Pines ve Bohm enerji kaybının iletken elektronların uyarılmış hale geçmesi sonucu plazma osilasyonu başka adıyla plazmon oluşturması sonucu olduğunu ortaya koymuştur [133].

Altmışlı yılların sonuna doğru, Kretschmann [134] ve Otto [135] yüzey plazmonlarının optik şekilde uyarılmalarını göstermiştir. Yüzey plazmonların optik olarak uyarılması teorisi iki şekilde açıklanmıştır: hafifletilmiş toplam yansıma (ATR) ve kırınım ağındaki difraksiyon. Hafifletilmiş toplam yansıma ile oluşturulan yüzey plazma dalgalarının sensör uygulamaları Nylander ve Liedberg'in öncülüğünde gerçekleştirilmiştir [136]. Kolay olması nedeniyle bu yöntem ince filmlerin karakterizasyonu [137,138] ve biyokimyasal algılamada kullanılmıştır [139].

Kırınım ağı difraksiyonu ile oluşturulan SPR'lerin kullanımı Cullen tarafından yapılmıştır [140]. Kırınım ağı tabanlı SPR sensörler prizma tabanlı sistemlere alternatif olarak düşünülmüştür [141]. 1980 yıllarında yüzey plazmon rezonans (SPR) ve bununla alakalı teknikler ince filmleri, biyolojik ve kimyasal etkileşimleri açıklamak için uygulanmıştır [142]. Bu teknikler kullanıcının sabitlenmiş reseptör ve analit çözeltisi arasındaki etkileşimi etiketleme ihtiyacı olmadan gerçek zamanlı çalışmasına olanak vermektedir. Bağlanma hızı ve bağlanma gücünü inceleyerek bağın özgüllüğü, kinetiği ve afinitesine dair birçok bilgi edinilebilmektedir.

Son yirmi yılda SPR teknolojisi; klinik muayene, çevresel izleme, ilaç keşfi ve polimer mühendisliği gibi sağlık ve biyolojik bilimlere içeren alanlarda inanılmaz gelişmeler katdedilmiştir [143,144]. SPR sensörlerin en güçlü yanlarından biri antikör-antijen, protein-protein, enzim-süstrat ya da inhibitör, protein-DNA, reseptör-ilaç, protein polisakkarit ve protein-virüs gibi bağlanma olaylarını invazif olmayan algılama ve gerçek zamanlı izleme olanağı vermesidir [145,146]. 1990 yılında Biacore tarafından İsveç'te SPR teknolojisinin tanıtılmasından bu yana biyosensör, çip üstü laboratuvar (lab-on-a-chip; LOC)

ve hasta başında test (POC) gibi alanlarda basılan makalelerin 2008-2010 yılları arasında zirveye ulaşmasından anlaşıldığı gibi gözle görülür ilerlemeler olmuştur [147]. SPR sensörlerin araçlar, bilgi işleme ve analiz performansı lokalize yüzey plazmon rezonans (LSPR) ve SPR tarama yöntemleri (SPRi) nedeniyle son altı yılda zirveye ulaşmış gibi görünmektedir [149].



Şekil 2.613. Wood'un gözlemlediği alışılmadık siyah ve beyaz dalga boyları [131].

2.3.1. Yüzey Plazmon Rezonans teorisi

“Yüzey plazmon” ve “polariton” terimleri parçacık-dalga ikilemini gösteren (foton ve fononlar) kuazi-parçacıklarına verilen addır ve genel olarak metal gibi değerlik elektronları içeren maddelerde bulunmaktadır [148]. Plazmon, değerlik elektronlar bulutunun metaldeki sabit pozitif iyonların etrafındaki osilasyonudur. “Yüzey plazmon” terimi metal yüzeyinde yük bulutu dalgasının yayılmasıdır [149]. Metal yüzeylerine çarpan fotonların yüzey plazmonlar ile etkileşimi sonucu yüzey plazmon polaritonları (SPP) oluşmaktadır. Bunlar karışık kuazi-parçacıklardır ve yüzey plazmonları ile fotonlardan oluşmaktadır [150]. Fotonların dalga boyları yüzeyin kırılma endeksine (n) göre değişmektedir, fakat osilasyon frekansı aynı kalmaktadır. Kuazi-parçacık için yayılma dalga boyu λ ve osilasyon frekansı ω şu şekilde ilişkilidir:

$$\lambda = \frac{2\pi c}{\omega}$$

c vakumdaki ışık hızı. Dolayısıyla dalga yayılma numarası β ile şu şekilde ilişkilidir:

$$\beta = \frac{2\pi}{\lambda}$$

SPP'lerin yayılımı, yayılma numarası β ile ortam boyunca osilasyon frekansı ile alakalıdır [151]. SPP'lere dayanan en basit geometri dielektrik sabiti ϵ_1 olan

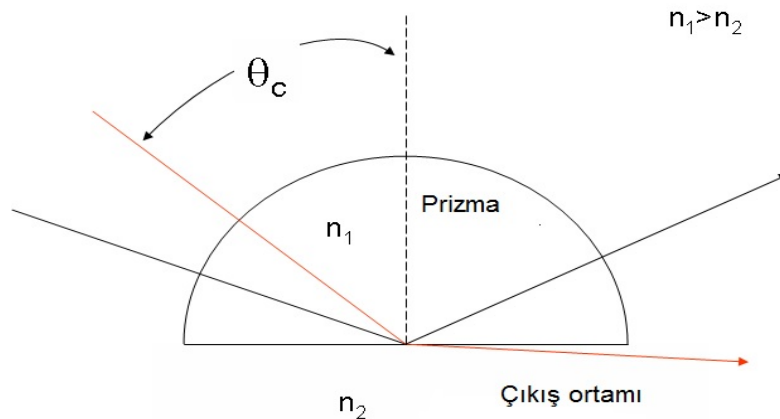
metal (1) ve dielektrik sabiti ϵ_2 olan dielektrik ortam (2) arasındaki düz arayüzdür. SPP'lerin yüzey boyunca yayılma numarası β osilasyon frekansına iki metal-dielektrik arayüzünün dielektrik sabitleri ile ilişkisi şu şekildedir:

$$\beta = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_1 \epsilon_2}{\epsilon_1 + \epsilon_2}}$$

Yüzey plazmon polaritonların elektromanyetik alanının yoğunluğu arayüze olan uzaklık artması sonucu ani düşüşe geçmektedir. Gelen ışık ile SPP etkileşimi sonrası gelen fotonların enerjisini emmekte ve yüzey boyunca β (K_{sp}) yayılma numarası ile yayılmaktadır. Bu yüzden, yansıyan ışığın yoğunluğu gelen ışığından daha azdır ve toplam yansımaya (R) birden azdır. Verilen monokromatik ışık kaynağı için SPP'ler uyarılabilir. Ayrıca rezonans üretebildiği özel bir açı vardır. Sabitlenmiş optik ve malzeme durumlarında, SPR açısı sadece ortamın kırılma endeksine (veya dielektrik sabitine) bağlıdır.

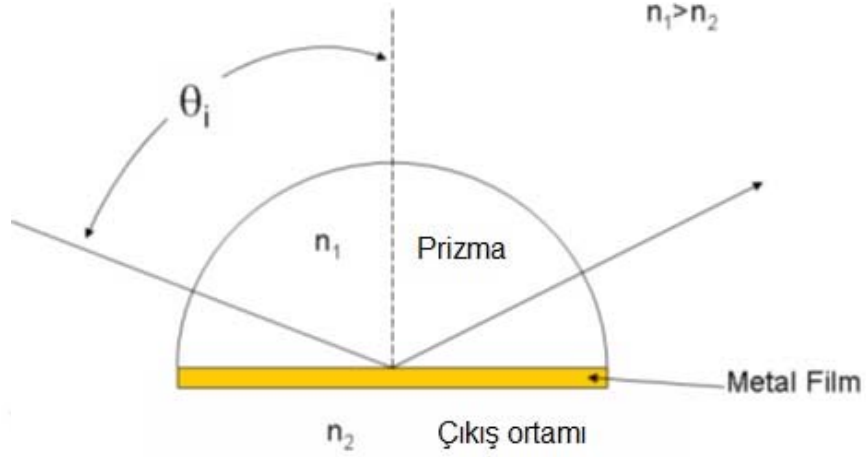
SPR transdüktörler genel olarak prizmadan geçen ışık yarı transparan soy metal ile kaplı optik substrattan geçerek toplam iç yansımaya gerçekleşmektedir. İlk olarak ara yüzeyde toplam iç yansımaya gerçekleşmesi gerekmektedir (

Şekil 2. 14) [152]. Toplam iç yansımaya kritik açı θ_c azalana kadar gerçekleşmektedir; bu açıda gelen ışığın bir kısmı ara yüzey içinde kırılmaktadır.



Şekil 2. 14. Prizma ara yüzeyinde toplam iç yansımaya. n_1 ve n_2 prizmanın ve çıkış ortamının kırılma endeksidir. Kritik açıda kırılmış ışık kırmızı renk ile gösterilmiştir. Gelen ışığın yansımaya açısı giden ışık ile aynıdır [152].

Eğer ara yüzey, yarı transparan soy metal ile kaplanırsa (Şekil 2.) [155], bu durumda toplam iç yansıma gerçekleştiğinde yüzey plazmon rezonans oluşabilir. Bu genel olarak Kretschmann ayarlaması olarak bilinir.



Şekil 2. 8. Prizma yüzeyi metal film kaplandığında SPR gerçekleşmektedir [155].

Yüzey plazmon rezonansının oluşması için bazı şartların gerçekleşmesi gerekmektedir. Gelen dalga vektörü aşağıdaki denklem ile verilmiştir:

$$K_i = \left(\frac{2\pi}{\lambda}\right) n \sin\theta_i$$

K_i gelen ışığın prizma yüzeyine paralel dalga vektörüdür, θ_i gelen ışık açısı, λ gelen ışığın dalga boyu, n prizmanın kırılma endeksi.

Plazmonların dalga vektörü aşağıdaki denklem ile açıklanmaktadır:

$$K_p = \left(\frac{2\pi}{\lambda}\right) \sqrt{\frac{\epsilon_1 \epsilon_2}{\epsilon_1 + \epsilon_2}}$$

K_p yüzey plazmonlarının dalga vektörü, ϵ_1 ve ϵ_2 metal ve dielektrik ortamın dielektrik geçirgenlik sabitleri. Yüzey plazmon rezonans durumu ancak şu durumda gerçekleşmektedir: $K_i = K_p$

Yüzey plazmon rezonans gerçekleştiğinde yansıyan ışığın yoğunluğu azalmaktadır. Eğer gelen ışık açısı sabit, polikromatik ise ve ışık yüzeyden yansır, ışık rezonans tarafından belli dalga boylarında absorbe edilir. Bunun sonucunda yansıma spektrumunda tipik plazmon rezonansın minimumu oluşur. Eğer monokromatik ışık yüzeyden farklı geliş açılarında yansır aynı

rezonansın minimumu oluşmaktadır. Yüzey plazmonlardan dolayı oluşan yansıma minimumu yüzey ve gelen foton alanı arasındaki faz farkından dolayı olmaktadır. Bu faz farklılığı rezonansın altında 0° olmaktadır ve rezonansın üstünde 180° yaklaşmaktadır. Bu sebeple metal-prizma ara yüzeyinden yansıyan fotonlar uyarılmış plazmonların yaydığı fotonlar ile yok edici etkileşime girmekte ve bunun sonucunda karakteristik yansımanın minimumu oluşmaktadır.

2.3.2. SPR biyosensörler

Birçok SPR sensör şu bileşenlerden oluşmaktadır; optik sensör, mikroakışkan kanal çipleri, örnekleme sistemi, bilgi işlem yazılımı [147,153]. SPR sensörler sadece çipin yüzeyine yakın (300 nm'ye kadar) ortamları test edebilmektedir [151], bu yüzden mikroakışkan kanal yapımı kolay kontrol edilebilen, yenilenebilir örnek akışı açısından kritik rol oynamaktadır [150]. Titizlikle kontrol edilen sıcaklığın ayarlanması gerekmektedir. Çünkü sıcaklık sadece SPR sensörün yanıtını değil biyomoleküler etkileşimin afinitesini ve kinetiğini de etkilemektedir [154].

SPR sistemin temel bileşenleri; ışık kaynağı, optik sistem, optik birleştirme parçaları (prizma, kırınım ağı, optik fiber), optik resim alma sistemi ve fotodetektörden oluşmaktadır [155]. Optik birleştirme parçalarının ayarından ve ışık dalgası modülasyonundan başlayarak SPR ve SPRi'lerin hassaslığını ve çözünürlüğünü artırmak için farklı biçimler geliştirilmiştir.

1980 yılında Pharmacia, SPR üzerine gösterilen yoğun ilgi sonrası bu tekniği araştırmaya başlamıştır. 1984 yılında Pharmacia fonksiyonel SPR sensör yapmak, geliştirmek ve satmak için Pharmacia Biosensor AB şirketini kurmuştur. Pharmacia Biosensor tarafından uygun sensör yüzeylerin geliştirilmesi [156] ve silikon mikroakışkan kartuşu ile beraber kullanımı kolay olan SPR-sensörler rüyasını gerçek kılmıştır [157]. Kısa sürede, Pharmacia Biosensor SPR sinyali ve RIA analiz metotları ilişkisi sonucu dekstran hidrojelinin tanımlayan birçok makale yazmış ve BIACORE sensörünü tanıtmıştır [158]. BIACORE cihazları kanal şeklinde lazer ışını dalgası ve detektör olarak diyot kullanarak hiçbir parçası hareket etmeyen bir cihaz ortaya çıkarmıştır. 1990 yılında ilk BIACORE cihazı satılmıştır. Daha sonra

1994 yılında daha da basitleştirilmiş BIALite cihazı piyasaya sürülmüştür. Bu cihazda örnek, bilgisayar kontrolü yerine el ile kontrol edilmektedir. Tekniklerin gelişmesiyle beraber daha hassas olan BIACORE X, BIACORE 2000, 3000 ve kalite kontrol amaçlı Q cihazları piyasaya sürülmüştür. Bundan sonraki gelişmeler sıvı örneklerin yerleştirilmesi üzerine olmuştur.

Tipik bir SPR cihazı örnekleri başka detektörlere göndermek için birden fazla vanası olan mikroakışkan kanal içerir. Bu özelliğe sahip ilk cihaz (BIACORE A100) 2005 yılında üretilmiştir [159]. Mikroakışkan kanaldaki 4 akış kanalı çok geniştir ve her kanalda beş adet detektör bulunur. Örnek hidrodinamik olarak bu detektörlerden herhangi birine gönderilmektedir. İlerleyen yıllarda başka şirketler de SPR sistemleri geliştirmeye başlamıştır. Bio-Rad şirketinin ürettiği ProteOn XPR36 cihazı 6x6 kesişmeli analiz kullanarak aynı anda 36 etkileşimin incelenmesine imkân vermektedir. Bazı cihazlar büyük hücrelerin bağlanmasını kolaylaştıran kuvvet sistemi kullanmaktadır (örneğin IBIS Biosensor, IAsys Biosensor). Bazı cihazlar da rezonans açısını bulmak için rezonant ayna kullanmaktadır (örneğin IAsys Biosensor). Sensata Technologies'in SPReta Evaluation modülü ev içinde analiz için uygundur ve muhtemelen şu ana kadar üretilmiş en basit SPR cihazıdır. Yeni cihazların gelişmesiyle beraber makine kontrol modülünün gelişmesi, elle yapılan deneyleri önemli ölçüde kolaylaştırmıştır. Bunun yanı sıra detektörleri analiz eden yazılımlar günümüzde çok daha gelişmiş durumdadır. Artık çoğu cihazda kanalların hizalanması ve temizlenmesi otomatik olarak yapılmaktadır. SPR sensör geliştirmek için birçok yöntem olmasına rağmen aralarında en iyisi moleküler baskılamaya dayananıdır [160].

2.3.3. SPR biyosensörlerin uygulama alanları

SPR biyosensörlerin temel biyolojik çalışmalarda, sağlık bilimi araştırmalarında, ilaç keşfi, klinik muayene, çevresel ve ziraat faaliyetlerinin izlenmesinde kullanımı çok popüler olmuştur. SPR bağışıklık sistemi analizi, mutasyon tespiti, tıroapotik ilaç izlenmesi (TDM) gibi klinik laboratuvarlarda kantitatif analiz için uygun adaydır. Ayrıca SPR geliştirilmiş ilaç terapisi için doz kontrolü ve toksisite risk yönetiminde inanılmaz tekrarlanabilirlik performansı ve üstün yenilenebilirlik göstermiştir [161].

Yüzey plazmonlar, içlerinde flüoresans, Raman ve sekonder harmonik osilasyon tekniklerinin de olduğu birçok spektroskopi metotlarının yüzey hassasiyetini arttırmak için kullanılmıştır. SPR yansıma tekniği en basit halde bile polimer, DNA veya protein adsorpsiyonu gibi moleküler adsorpsiyonları ölçebilmektedir. Teknik olarak, minimum yansıma açısını (maksimum adsorpsiyon açısı) ölçmek en yaygın bir metottur. Bu açı adsorpsiyon gerçekleştiğinde 0.1° değişmektedir. Bunun aksi durumlarda adsorpsiyon dalga boyundaki değişimler gözlemlenmektedir [108]. Algılama mekanizması yüzeye adsorplanan moleküller lokal kırılma endeksini değiştirmektedir, bu da yüzey plazmon dalgalarının rezonans durumunu değiştirmektedir.

Farklı biyopolimerler ile şekillendirilen yüzey, uygun optik ve görüntüleme sensörü kullanılarak yüzey plazmon rezonans görüntüleme metoduyla izlenebilir. Nanoparçacıkların çözeltilerinde lokal yüzey plazmon dalgalanması, süspansiyon ya da çözücünde yoğun renk oluşturmaktadır. Soy metallerin nanoparçacıkları veya nanotelleri morötesi-görünür spektrumunda büyük halde iken gözlemlenemeyen güçlü adsorpsiyon göstermektedir. Bu olağanüstü absorpsiyon artması ile metal nanoparçacıkları elektrolitik hücre yüzeyine yığılmasını sağlayarak güneş pillerinin ışık absorpsiyonu artırılmıştır [162]. Lokal kırılma endeksinin değişmesi sonucu rezonans kayması biyopolimer, DNA veya proteinlerin algılanmasında kullanılmaktadır. SPR teknikleri şunlardır; plazmon dalgayönü rezonans, QCM, üstün optik transmisyon ve dual polarizasyon interferometri.

İlk SPR bağışıklık sensörler 1938 yılında Liedberg, Nylander ve Lundström tarafından Linköping Teknoloji Enstitüsünde ortaya atılmıştır [139]. Araştırmacılar insan immunoglobulin G antikorunu 600 angström gümüş filmine adsorplayarak suda anti-immunoglobulin G'yi tespit etmişlerdir. ELISA immunoanaliz tekniklerinin aksine SPR immunosensörler molekül etiketleme ihtiyacı olmadan analiz yapabilmektedir [163].

Multi-parametre yüzey plazmon rezonans (MP-SPR) yöntemi, tabakaları ve katmanları tayin etmek için yapılmış bir SPR tekniğidir. Bağlanma kinetiği dışında MP-SPR katmandaki yapısal değişiklikler yani katman kalınlığı ve kırılma endeksi hakkında da bilgi vermektedir. Bu teknik lipid bağlama ve kopma

ölçümleri [164], tek katman grafen büyütmesi [165] ve mikron kalınlığındaki polimerlerin [166] tayininde de başarılı olmuştur.

Yüzey plazmon rezonansının ilk uygulamalarından biri altın film yüzeyindeki kendinden oluşan katmanların kalınlığını ve kırılma endeksini ölçmek olmuştur. Kalınlık arttıkça rezonans dalgası daha büyük açılara kaymaktadır. Bu bir statik SPR ölçümüne örnektir.

Hızlı gözlem istendiğinde, tek bir doğru rezonans noktası (asgari yansıtma açısı) altında bir açı seçilip, bu noktada yansıma değişiklikleri ölçülebilir. Buna 'dinamik SPR' ölçümü denir. Ölçüm sırasında filmin yapısında önemli bir değişiklik olmadığı varsayılır.

Bileşiklerin afinitesi belirlendikten sonra, bağlanma sabiti belirlenmelidir. Bu, ürün için denge değeridir. Bu değer, dinamik SPR parametreler kullanılarak veya herhangi bir kimyasal tepkime gibi birleşme hızının ayrışma hızına bölünmesiyle bulunabilmektedir. Bunun için, bir yem ligandı SPR kristalin dekstran yüzeyi üzerine sabitlenmektedir. Bir mikroakışkan sistem sayesinde, av analit içeren bir çözelti yem tabakası üzerine enjekte edilmektedir. Av analitin yem ligandını bağlaması sebebiyle, SPR sinyalinde bir artış gözlenmektedir. Belirli birleşme zamanı sonrası analit içermeyen ligant ve analit arasındaki bileşiği ayıran çözelti (genelde tampon çözeltisi olmaktadır) mikroakışkan kanala enjekte edilmektedir. Burada analit ve ligant arasındaki etkileşim kırıldığından dolayı SPR sinyalinde düşüş görülür. Bu birleşme ve ayrışma hızları kullanılarak bağlanma sabiti bulunmaktadır. SPR sinyali gelen ışık ve altın yüzeyindeki plazmonların elektromanyetik olarak birleşmesiyle açıklanabilir. Bu plazmon altın-çözelti ortamındaki birkaç nanometre kalınlığındaki tabakadan bile etkilenebilir. Bağlanma yansıma açısını değiştirmektedir.

2.4. Moleküler baskılama teknolojisi

Günümüzde teknolojinin gelişmesiyle beraber farklı alanlarda molekül tayini ve analizi oldukça önem kazanmıştır. Özellikle besinlerde kalan toksik kimyasalları tayin etme, onların çevreye yayılmasını izleme, biyoterörizmi tespit etme gibi ihtiyaçlar artmıştır. Bu molekülleri tespit etmek için özel olarak tasarlanmış kimyasallara ihtiyaç duyulmaktadır. Analiz edilmek istenen

moleküle seçici ve afinitesi olan kimyasala her zaman olduğundan fazla ihtiyaç duyulmaktadır. Biyolojik sistemlerde bu tarz etkileşimler “molekül tanıma” olarak adlandırabileceğimiz bir şekilde işlemektedir. Bu tarz etkileşimleri bilim insanları enzim-substrat, antikor-antijen, hormon-reseptör, DNA ve RNA arasındaki etkileşim gibi incelemektedir. Proteinler moleküle karşı yüksek seçiciliğe ve afiniteye sahip olmasına rağmen kararlı olmamaları nedeniyle abiyotik sistemlerde kullanımı imkansızdır. Bu durum ortaya benzer abiyotik sistemlerde kararlı olan yapay molekül tanıma sistemlerinin geliştirilmesini tetiklemiştir. “Moleküler baskılama” bu bağlamda ortaya çıkan yeni bir teknolojidir. Moleküler baskılama “sentetik polimerde ligantların seçici bölgeler ile seçiciliği tetiklemek için uygun olarak önceden tasarlanmış şablona göre (bu şablon atom, molekül, iyon, kompleks veya molekül, iyonik ya da mikroorganizmaları içerebilen makromoleküler bir oluşum olabilir) oluşturması” yöntemidir [36].

Moleküle özgü bölgeler hazırlanırken molekül seçiciliği, moleküler etkileşime dayalıdır. Bu yüzden oluşturulan şablonlar bu ikili etkileşime dayanılarak oluşturulmaktadır ve bu şablona göre de akıllı polimerler geliştirilmektedir. Bu molekül seçici yerlerin oluşturulması oldukça çapraz bağlı bir polimer üzerinde molekülün girebileceği boşluklar oluşturularak yapılmaktadır. Oluşturulan boşluklar moleküle özgü olup molekülü tanıma yeteneğine sahiptir. Bu boşluklar hazırlanırken kalıp molekül kullanılmaktadır. Kalıp molekül tayin edilmek istenilen moleküle yakın bir yapıda seçilmektedir [167]. Bu kalıp molekülün polimerden herhangi bir yöntemle uzaklaştırılması sonucu moleküle özgü yer açılmaktadır ve kalıp molekülü bağlı tutan fonksiyonel gruplar kalmaktadır. Bu fonksiyonel gruplar sadece özel bir moleküle göre tasarlandığı için yüksek seçicilik göstermektedir. Oluşturulan polimer, moleküler baskılanmış polimer (MIP) olarak adlandırılmaktadır.

MIP oluşturma yöntemi fonksiyonel monomer ve çapraz-bağlayıcı olarak görev yapan bir molekülü çözücüde kalıp molekül etrafına dolayarak polimerizyon yapılmaktadır [35]. Böylece ortada kalıp molekülü içeren şablonun olduğu bir üç boyutlu polimer ağı oluşturulmaktadır. Bu polimer ağından şablon içinden kalıp molekülün desorpsiyonu ile tayin edilmek istenilen moleküle özgü yerler oluşmaktadır. Oluşturulan boşluklar şekil, büyüklük ve moleküler etkileşimler

açısından kalıp moleküle özgüdür. Kalıp molekül ve MIP'in monomeri ile olan bağın kuvvetine göre moleküler baskılanmış polimer oluşmakta, bağ zayıf ise MIP oluşmamaktadır [168].

MIP'ler, seçici polimerler olmalarının yanı sıra diğer polimerler gibi mekanik ve kimyasal özellikler sergilemektedir. Mekanik özellikleri arasında strese ve ısıya dayanıklılık, kimyasal özellikler arasında ise asit, baz, su ve organik çözücülere dayanıklılık gelmektedir [169]. MIP yöntemi bu üstün özelliklerden dolayı başta sensöre dayalı olmak üzere, ayırma, ilaç ve kimyasal tayini, kataliz gibi birçok farklı alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. MIP'lerin üretimi basit ve ucuz olmakla birlikte birkaç yıl boyunca bozulmadan, etkinliğini kaybetmeden saklanabilmektedir [37].

Moleküler baskılama yöntemine olan ilgi oldukça fazla olmasına rağmen bu alanda yapılan araştırmalar nanomalzemeler ve floresan tekniği gibi alanlara göre geri kalmaktadır. Bunun sebeplerinden biri, bu yöntemde kullanılan foksiyonel monomer sayısının kısıtlı olması nedeniyle uygulama alanlarının kısıtlanmasıdır. Son yıllarda bu alanda başarılı çalışmalar yayınlanmıştır [38,170-173]. Bunlardan birkaçı MIP'lerin hazırlanması ile ilgilidir [170].

MIP'lerin gelişmesiyle beraber baskılama şekilleri de değişiklik göstermeye başlamıştır. Yüzey baskılama, nanobaskılama, kontrollü radikal polimerizasyonu, delikli polimer sentezi, mikrokanal sıvı ve katı faz sentezi gibi yöntemler geliştirilmiştir [38]. Bu yöntemler sadece polimerin üretim şekli ile değil kullanılan malzemeler ile de farklılık göstermektedir. Son yıllarda yayınlanan çalışmalarda MIP bazlı sensörlerin geniş yelpazede seçici olduğunu ve çok farklı şekillerde kullanılabileceğini göstermiştir [174].

MIP'ler sensör alanında kullanılmak için uygundur. Bunlar çözünmeyen polimer olmalarıyla beraber enzimlerde, antijenlerde olduğu gibi ekstra bir immobilizasyon aşamasına gerek duyulmaz [40]. Son yıllarda gelişen MIP'ler ile birlikte, kullanımı oldukça etkin bir pazar payına sahiptir. Bu nedenle güncel araştırma konuları arasında bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda bu polimerlerden üretilen sensörlerin seçiciliğinin ve özgüllüğünün yüksek olduğu gösterilmiştir [175]. MIP'lerin bu denli yüksek seçicilik göstermesi, onları yaygın olarak kullanılabilecek sensör grubu yapmaktadır. Fakat polimerin

çapraz bağ yapısı, oluşan boşluklara farklı moleküllerin de bağlanabilmesi (kalıp molekülden daha küçük) ve bu molekül algılama bölgelerinin dağılımı bu sensörleri yavaş kılmaktadır. Bu tarz aşılması gereken problemler her durum için geçerli olmasa da MIP'lerin yaygın olarak kullanımı ve doğal reseptörlerin yerine geçmelerini zorlaştırmaktadır. Bu sorunların giderilmesi için yukarıda sayılan farklı baskılama yöntemleri kullanılmaya başlamıştır. Bunun gibi nanoteknolojinin farklı alanlarında potansiyel kullanımı olan MIP'ler moleküler düzeyde olan etkileşimi makrosisteme taşıyan bir köprü rolü oynamaktadır [176].

2.4.1. Moleküler baskılamanın esasları

Moleküler baskılama teknolojisi, esasları yukarıda bahsedildiği gibi bir fonksiyonel monomer ve kalıp molekül arasında bağ oluşturarak polimer meydana getirmektir. Bu proses üç aşamadan oluşmaktadır bunlar sırasıyla fonksiyonel monomer ve kalıp molekül arasında bağ oluşturmak, polimerizasyon ve son olarak da kalıp molekülün uzaklaştırılmasıdır (Şekil 2.) [177].

1. Aşama: Bağ oluşturma

Bu aşamada fonksiyonel monomer ve kalıp molekül arasında kimyasal (kovalent) ya da çekme gücüne (kovalent olmayan) dayanıklı bağ oluşturulmaktadır. Bu aşamada oluşan kompleks yapı polimerizasyonun başlangıcıdır. Bu aşamada oluşan kompleksin yapısı önemlidir. MIP'in seçiciliği ve afinitesi doğrudan bu bağdan etkilenmektedir.

2. Aşama: Polimerizasyon

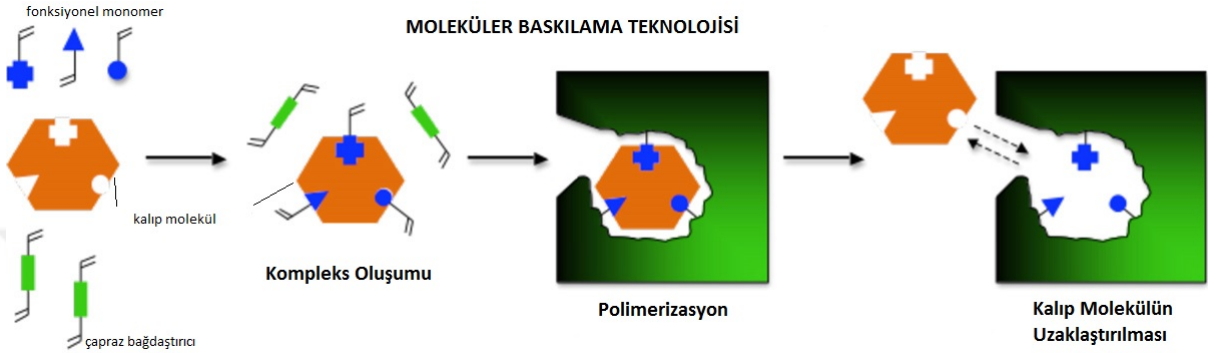
Bu ikinci aşamada ilk basamakta oluşturulan monomer ve kalıp molekül kompleksi polimer haline getirilmektedir. Polimerizasyon sırasında çapraz bağlayıcı kullanılmaktadır ve bu olay bir çözücü içinde gerçekleşmektedir.

3. Aşama: Kalıp molekülün uzaklaştırılması

Oluşan yapının hedef molekülü tanınması için ona uygun boşluk oluşturulması gerekmektedir, bu da hedef moleküle özgü özellikler taşıyan kalıp molekülün uzaklaştırılmasıyla yapılmaktadır. Bu aşama sonucunda oluşan MIP bir

moleküler hafızaya sahip olmakla birlikte hedef molekülü algılama ve bağlama özelliği göstermektedir [179].

Sensör olarak kullanılmak üzere hazırlanan MIP için başlangıç malzemelerinin yani fonksiyonel monomer, kalıp molekül, çapraz bağlayıcı ve çözücü seçimi çok önemlidir. Oluşacak sensörün seçiciliği ve özgüllüğü bu seçilen malzemeler ile belirlenmektedir.



Şekil 2. 9. Moleküler baskılama teknolojisinin aşamaları [177].

2.4.2. Moleküler baskılama teknolojisinde kullanılan malzemeler

Tipik bir MIP sentezi aşamasında şablon (kalıp molekül), fonksiyonel monomer, çapraz bağlayıcı, polimerizasyon başlatıcı ve çözücünden oluşmaktadır [175]. Polimerizasyon tepkimesi monomerin, çapraz bağlayıcının, polimerizasyon başlatıcının yapıları ve miktarlarından ve kullanılan çözücünden, sıcaklık ve polimerizasyon zamanı gibi birçok faktörden etkilenmektedir. Bu yüzden oluşturulan MIP'in seçici ve kullanılan ortama fiziksel olarak dayanıklı olması bu faktörler ile kontrol edilmektedir. Kalıp molekül ve fonksiyonel monomer arasında oluşan kompleks yapının polimere dönüşmesi bir polimerizasyon başlatıcısı ile tetiklenmektedir. Bu aşamada oluşacak olan polimerin yapısının mekanik stres, ısı gibi fiziksel şartlara dayanıklı olması için çapraz bağlayıcı kullanılmaktadır. Çünkü kalıp molekülün uzaklaştırılmasıyla oluşan boşluklu yapının sağlam olması gerekmektedir.

Başlangıç malzemeleri, sentezlenecek MIP'in kullanım alanına göre seçilmelidir. Oluşan MIP'in hedef molekülü doğru olarak tanıyabilme ve bağlayabilme kapasitesi için oluşan polimer matriksinin konfigürasyonu, yapısı ve doğası, kullanılan fonksiyonel monomer ve kalıp molekül, çapraz bağlanma

derecesi gibi polimer matriksin karakteristik özelliklerini oluşturan faktörlerden etkilenmektedir. İkinci aşamada yani polimer oluşturma sırasında fonksiyonel monomerin polimer matriksine rastgele bağlanması, matriksin sistematiğini etkilemekte ve polimerin fiziksel dayanıklılığını düşürmektedir. Polimerizasyonun gerçekleşebilmesi için ilk başta oluşan kalıp molekül ve fonksiyonel monomer arasındaki kompleks yapısı yeterince kararlı olmalıdır. Kovalent bağ ile oluşan komplekslerin dayanıklılığı yüksektir fakat kalıp molekülün uzaklaştırılma aşamasında zorluklara neden olmaktadır. Bu sebepten dolayı kovalent olmayan bağlar ile oluşan kompleksler son aşamada daha kolay desorbe olmakta ve bu ideal bağlanma şartlarını sağlamaktadır.

2.4.2.1. Hedef moleküle özgü kalıp molekül

Moleküler baskılamanın en önemli hedeflerinden biri doğal biyolojik reseptörler ile aynı özgüllüğe ve afiniteye sahip MIP'ler üretebilmektir. Bunlar doğal reseptörlerin yerine geçerek gerçek hayatta uygulanabilmelidir. Genel olarak kalıp molekül şu üç özelliğe sahip olmalıdır: polimerizasyonu önleyecek fonksiyonel gruplarının bulunmaması, polimerizasyon sırasında kimyasal olarak dayanıklı olması ve en önemlisi fonksiyonel monomer ile bağlanabilecek gruplarının bulunmasıdır. Polimerizasyon tepkimesinin gerçekleşmesi için bazı durumlarda yüksek sıcaklık, UV ışını gibi yüksek aktivasyon enerjisine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu gibi durumlarda seçilen kalıp molekülün yapısı bu etkenler altında bozulmadan kararlı kalabilmelidir. Günümüzde MIP'ler birçok alanda küçük organik molekülleri tanımda başarılı olmuştur. Fakat kalıp molekülde oluşan ufak bir değişiklik bile hedef molekülü algılamada sorun yaratabilmektedir. Bunun en belirgin örneği kalıp olarak metal iyonları kullanıldığında yaşanmaktadır; benzer çapta ve aynı yükte olan iyon hedef molekül yerine geçebilmektedir [178]. Bu sorunu aşmak için iyona bağlanabilen ligantlar kullanılmaktadır. Bu da seçiciliği ve özgüllüğü artırmaktadır. Kalıp molekül olarak atom, iyon, molekül, kompleks veya moleküler, iyonik veya makromoleküler bileşik, mikroorganizmalar, proteinler, nükleonlar, hormonlar gibi birçok kimyasal ve biyolojik malzeme kullanılabilir.

Çizelge 2. 'de yaygın olarak kullanılan hedef moleküle özgü kalıplar verilmiştir [37].

Çizelge 2. 3. Yaygın olarak kullanılan kalıp molekül ve iyonlar [37].

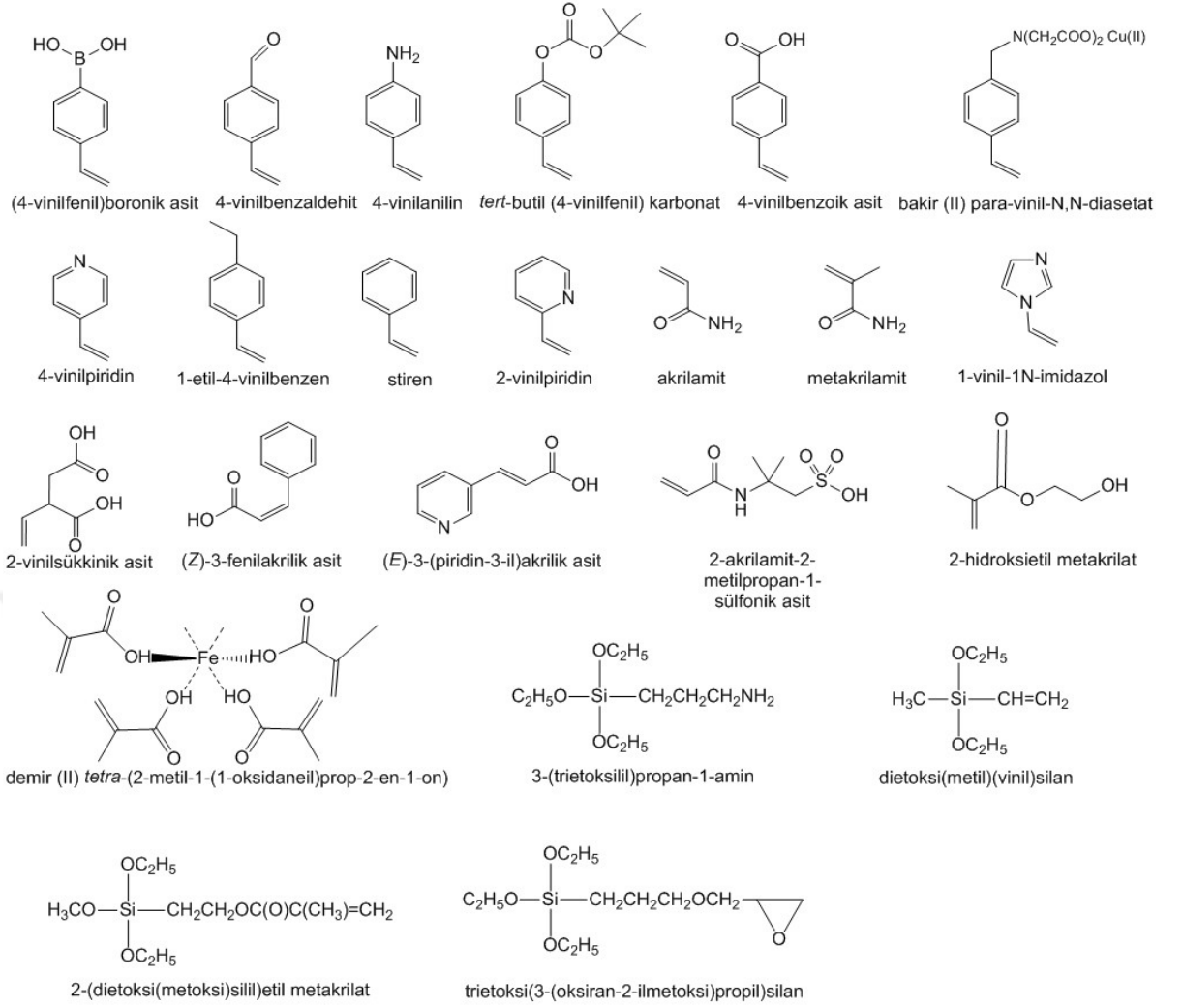
Hedef molekül tipi	Kullanılan kalıp malzeme
İyonlar	Pb(II); Sr(II); Hg(II); CH ₃ Hg(I); Cd(II); Cu(II); Cr(III); Fe(III); Ni(II); UO ₂ ²⁺ ; Th(IV); Eu(III); As(III); PO ₄ ³⁻
Organik moleküller	Pestisitler: atrazin; 2,4-diklorofenoksiasetik asit; benzimidiazol fungusitler, Endokrin bozucu kimyasallar: bisfenol A, estradiol; oesterone; polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) Patlayıcılar: 2,4,6-trinitrotolüen (TNT) İlaçlar: tetrasiklin; kinolonlar; propanolol; digoksin; sülfonamidler Amino asitler ve peptitler: tirozin, alanin, tripeptitler, helik formda peptitler, sinkona alkaloidler N-terminal histidin bağlı dipeptitler Şekerler: d-früktoz, d-glikoza, d-galaktoz
Biyomakromoleküller	Lizozom; adenzin, 3,5-siklik monofosfat (cAMP); sığır serum albümin (BSA)
Hücre ve virüsler	Tütün mozaik virüsü, sığır lösemisi virüsü, dang virüsü, gut-homing T

2.4.2.2. Fonksiyonel Monomerler

Fonksiyonel monomerin görevi polimerizasyon için uygun kalıp molekül ile kararlı bir yapı oluşturmaktır. Bu yüzden kalıp molekül ile güçlü bir bağ oluşturabilecek fonksiyonel monomer seçmek ve polimerizasyon öncesi spesifik donör-reseptör veya antikor-antijen kompleksi oluşturmak önemlidir. Kalıp molekül ve fonksiyonel monomer arasındaki etkileşimler bağlanma şekline göre şu beş ana dala ayrılmaktadır; kovalent olmayan bağlanma, kovalent bağlanma, elektrostatik/iyonik etkileşim, yarıkovalent ve metal ligant

bağdır. Şekil 2. 'da yaygın olarak kullanılan fonksiyonel monomerler verilmiştir [37]. Bilindiği kadarıyla kullanılabilir fonksiyonel monomer sayısı azdır ve bu da MIP'ler gerçek hayattaki uygulamasını kısıtlamaktadır. Genelde fonksiyonel monomer seçilirken iki özellik göz önünde bulundurulmaktadır; birincisi molekülü tanıma ve ikincisi polimerleşebilme özelliğidir. Hedef moleküle özgül bağlanabilen fonksiyonel grupların olması seçiciliği olumlu yönde etkilemektedir. Fonksiyonel monomerin polimerleşebilmesi için vinil çift bağları, silikon hidroksil gibi gruplar bağlanmaktadır.

Kalıp malzeme ve monomer kompleksi polimerleşmesi sonucu oluşan MIP'lerde hedef molekülün bağlanabileceği çok fazla sayıda boşluk oluşmaktadır. Bu da onları biyolojik sistemlerde olduğu gibi sadece algılama için değil hedef molekülü ayırma uygulamalarında da kullanılabilir hale getirmektedir. Polimerleşme tepkimeleri için genellikle apolar çözücüler kullanılmaktadır ve bu durumlarda monomer seçimi yaygın olabilmektedir, ancak polimerleşmenin polar ortamlarda gerçekleşmesinde monomer seçimi hidrojen bağı ile kısıtlanmaktadır.



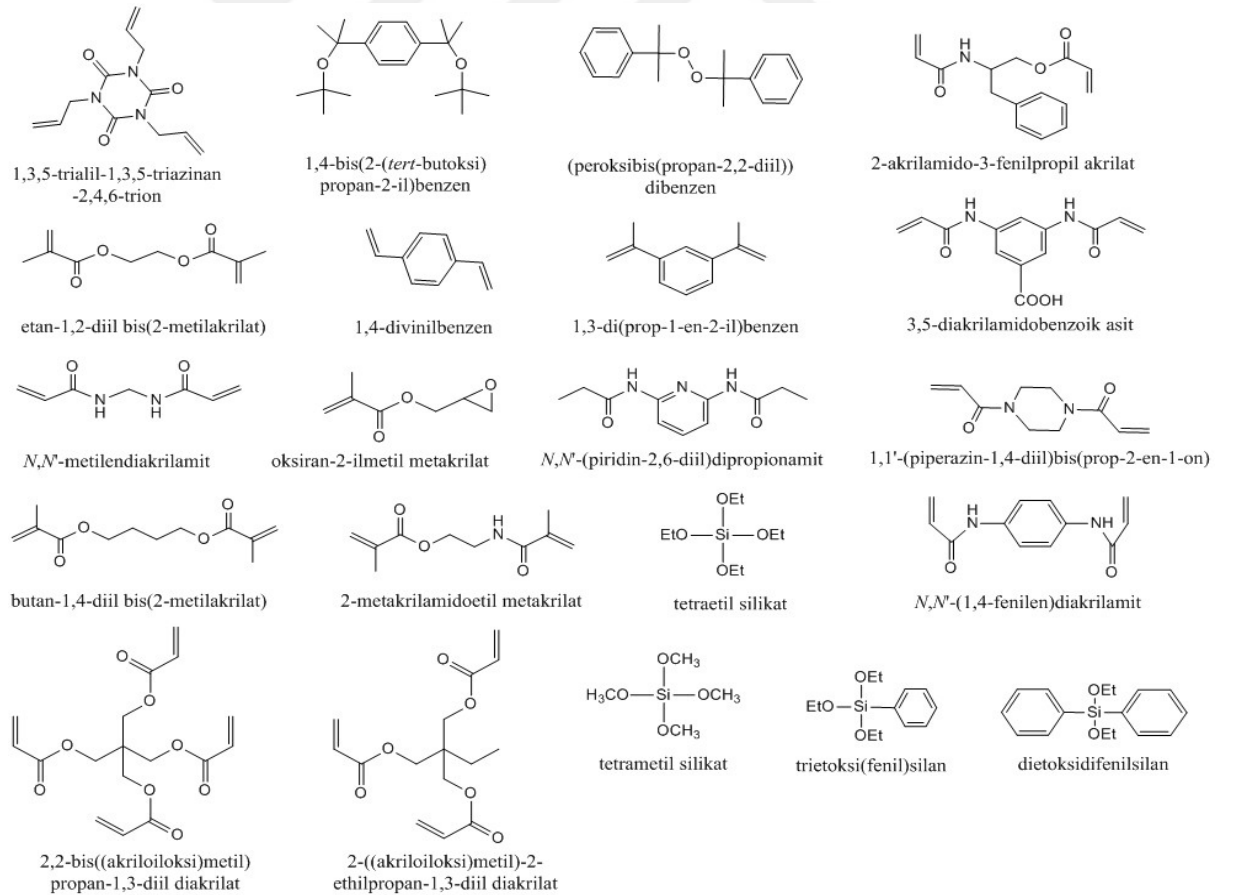
Şekil 2. 10. Yaygın olarak kullanılan fonksiyonel monomerlerin kimyasal yapıları [37].

2.4.2.3. Çapraz bağlayıcılar

Polimerizasyon aşamasında çapraz bağlayıcılar fonksiyonel monomeri kalıp molekül etrafında sabitlemek için kullanılmaktadır, böylece oldukça çapraz bağlı polimer matrisi oluşturularak kalıp molekül ayrıldığında bile esnemen kalmasını sağlamaktadır. Bağlayıcının tipi ve miktarı oluşacak olan MIP'in seçicilik ve bağlama kapasitesini ciddi derecede etkilemektedir [169]. Aynı zamanda çapraz bağlayıcı kullanmak polimer matrisinin esnekliğini artırmakla beraber oluşan polimerin çözücüde çözünmesini önlemekte ve MIP'lerin kullanım alanını genişletmektedir. Az miktarda bağlayıcı kullanmak çapraz bağlanmayı azaltmaktadır, dolayısıyla zayıf ve mekanik strese dayanıksız polimer oluşturmaktadır. Ayrıca az miktarda bağlayıcı kullanmak hedef

molekölü algılayacak boşlukların birbirine çok yakın olmasına neden olmakta ve böylece bir hedef molekül birden fazla algılama merkezini kapatabilmektedir. Bunun sonucunda polimerin seçiciliği ve afinitesi olumsuz yönde etkilenmektedir. Aynı şekilde çok miktarda kullanılan çapraz bağlayıcı sonucunda hedef molekülü bağlayan boşluk sayısı azalmaktadır, bu da MIP'in bağlama kapasitesini düşürmektedir. Fazla miktarda bağlayıcı kullanımı polimerizasyonun homojenliğini etkilemekte ve hedef molekülü tanıyabilme kapasitesine sahip bölgelerin sayısını artırabilmektedir. Bu da seçiciliği etkilemektedir.

Bağlayıcının moleküler yapısı da oldukça önem taşımaktadır. Genellikle çapraz bağlayıcı ajan olarak yapısal açıdan fonksiyonel monomere yakın bir yapıda molekül seçilmektedir. Bunun sebebi bağlayıcı kalıp molekül veya fonksiyonel monomer ile kovalent etkileşime girmesi gerekliliğidir. Günümüzde yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcılar Şekil 2. 'de verilmiştir [175].



Şekil 2. 11. Yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcıların kimyasal yapıları [175].

2.4.2.4. Çözücüler

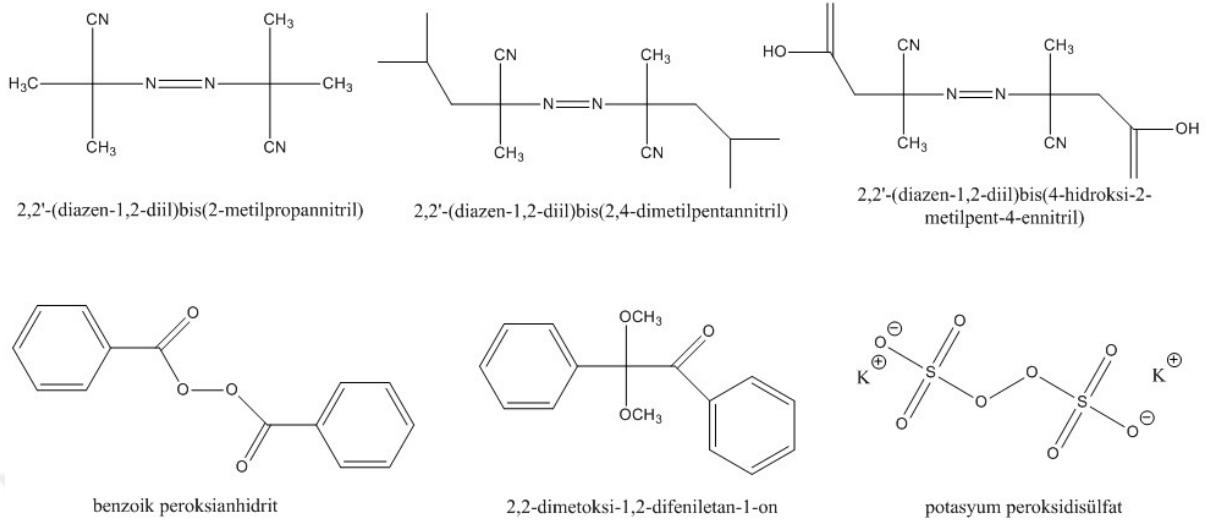
Bazen porojen olarak da adlandırılan çözücülerin kullanım amacı polimerizasyon aşamasında boşluk oluşturmaktır. Oluşturulan boşluklar hedef moleküllerin molekül algılama bölgelerine ulaşmasını, polimer üzerinde kütle aktarımını artırarak kolaylaştırmaktadır. Bu yüzden polimerleşme aşamasında önemli rolleri vardır. MIP üretiminde yaygın olarak kullanılan çözücüler 2-metoksietanol, metanol, tetrahidrofüran (THF), asetonitril, dikloroetan, kloroform, N,N-dimetilformamit (DMF) ve tolüendir [179]. Çözücülerin polaritesi kalıp molekül ve fonksiyonel monomer arasında olan etkileşimi ve MIP'lerin bağlama kapasitesini, özellikle kovalent olmayan etkileşimlerde etkileyebilmektedir. Tolüen, asetonitril ve kloroform gibi polar ya da az polar olan çözücüler, kovalent olmayan baskılamada güzel sonuçlar vermektedir. Çünkü polimerin morfolojisi ve bağlama kapasitesi kullanılan çözücünün tipine bağlıdır.

Çözücülerin bir başka kullanım amacı da polimerizasyon tepkime ısını homojen olarak yaymalarıdır. Sıcaklık doğru olarak yayılmadığı durumlarda MIP'in algılama özelliklerini olumsuz etkileyen yan ürünler oluşmaktadır.

2.4.2.5. Polimerizasyon Başlatıcıları

Bir polimerizasyon tepkimesinde başlatıcılar, genellikle aktivasyon enerjisini azaltarak tepkimenin gerçekleşmesine uygun bir ortam hazırlamaktadır. MIP oluşturmak için genellikle radikalik polimerizasyon (FRP), fotopolimerizasyon ve elektropolimerizasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Radikalik polimerizasyon tepkimesi termal ya da fotokimyasal (UV ışını ile bozunması) tetikleme ile başlatılabilmektedir. Radikalik polimerizasyonda başlatıcı seçimi, kalıp molekül ve fonksiyonel monomer arasında oluşan kompleksin dayanıklılığına göre olmalıdır. Kovalent olmayan bağlar yüksek sıcaklıklara dayanıklı değildir ve bu yüzden radikal tepkime ışınal bozunma ile başlatılır. Yaygın olarak kullanılan başlatıcılar peroksitler ve azo bileşiklerdir. Fonksiyonel monomer ve kalıp molekül arasında kompleks oluşması hem sıcaklık hem de basınca bağlıdır [179]. Yüksek sıcaklıklarda genellikle bu kompleks bozunma eğiliminde olmakta ve oluşan MIP'in seçicilik özelliği düşmektedir. Bu yüzden düşük sıcaklıklar tercih edilmektedir. Bu başlatıcıların yapıları Şekil 2.'de verilmiştir

[169]. Bunların arasından en çok kullanılanı bozunma sıcaklığı 50-70 °C olan azobisizobutironitildir (AIBN).



Şekil 2.12. Yaygın olarak kullanılan peroksit ve azo başlatıcıların kimyasal yapıları [169].

2.4.3. Moleküler baskılama yöntemi

Sentetik polimerlerde moleküler düzeyde baskılama yapmak için oluşturulan bağların türlerine göre iki ana yaklaşım bulunmaktadır. Monomer ve kalıp molekül arasında oluşan bağa göre ilk yaklaşım kovalent [180] ve ikinci yaklaşım da kovalent olmayandır [181].

2.4.3.1. Kovalent baskılama yöntemi

Yukarıda belirtildiği gibi kovalent baskılama yönteminde polimerizasyon öncesi kalıp molekül ve fonksiyonel monomer arasındaki gruplar kendi aralarında tersinir kovalent bağ yapmaktadır. Polimerizasyon sonrası oluşan polimer matriksinden bu kovalent bağlar kırılarak kalıp molekül uzaklaştırılmaktadır. Kalıp molekülün uzaklaştırılmasıyla geride kalan gruplar ve boşluklar hedef moleküle özgüdür.

Bu tür baskılamada oluşan kovalent bağ olması sebebiyle yüksek sıcaklık, basınç, kimyasal, polar veya apolar çözücü, güçlü asit veya baz kullanımı gibi polimerizasyon şartları polimerizasyon öncesi kompleksi bozmadan kullanılabilir kılmaktadır [170].

Diğer taraftan bu yöntemin farklı dezavantajları vardır. Bu şekilde güçlü kovalent bağ yapabilen sınırlı sayıda kalıp molekül ve monomer bulunmaktadır. Bu yüzden MIP üretimi maliyetli olabilmektedir. Son aşama olan kalıp molekülün uzaklaştırılmasında da kovalent bağların güçlü olması sebebiyle zorluklar çıkmaktadır.

2.4.3.2. Kovalent olmayan baskılama yöntemi

Kalıp molekül ve monomer arasında her zaman güçlü kimyasal bağ oluşmamaktadır. Özellikle kalıp molekül olarak iyonların kullanıldığı durumlarda ise hiç kimyasal etkileşim olmamaktadır. Bu durumlarda ilk aşama olan kompleks oluşumu elektrostatik etkileşimler, metal-ligant bağı, hidrojen bağı gibi daha zayıf bağlar ile sağlanmaktadır. Polimerizasyon sonrası kalıp molekül aynı şekilde monomerden daha güçlü bağ yapan bir çözücü veya molekül tarafından uzaklaştırılır. Hedef molekül de aynı şekilde fiziksel bağlar ile oluşan MIP'e bağlanır. Bu yöntemin avantajları şunlardır; kovalent bağ oluşması için herhangi bir kimyasal tepkimenin gerçekleşmesine gerek yoktur, bu da polimerizasyon aşamasını hızlandırmaktadır. Ayrıca kalıp molekül de aynı şekilde kolay uzaklaştırılmaktadır.

Fakat monomer ve kalıp molekül arasında oluşan bağ zayıf olması sebebiyle yüksek sıcaklık, basınç, güçlü asidik veya bazik çözücü kullanımı gibi polimerizasyon koşulları uygulanması bu bağı kolaylıkla koparmaktadır. Bu yüzden polimerizasyon koşulları uygun seçilmelidir. Kimyasal olmayan bağlar spesifik değildir ve kullanılan malzeme miktarına doğrudan bağlıdır. Bu da fazladan malzeme kullanımı önleyememektedir. Sonuç olarak polimerizasyon aşamasında fazla miktarda başlangıç malzemesi kullanımından kaynaklanan fazla, eksik veya tam olmayan gözeneklerin oluşmasına neden olmaktadır [182].

Fiziksel bağlar neredeyse her tür molekül için geçerlidir. Bu yüzden bu tür baskılama yönteminde kullanılacak molekül sayısı oldukça fazladır. Son zamanlarda gelişmiş olan bir diğer bağlanma şekli de π - π etkileşimler genellikle aromatik moleküller için geçerli olmakla beraber moleküler baskılama için yeni bir uygulama kapısı açmaktadır.

2.4.4. Moleküler baskılama hazırlanışı ve kontrolü

Moleküler baskılama yöntemi yeni ve halen gelişmekte olan bir yöntemdir. Bu işlemlerin sonunda oluşan MIP'in doğru seçicilikte ve spesifik olması için sadece başlangıç malzemelerin doğru seçilmesi yeterli değildir. Her aşamanın kontrolü de önemlidir. Başlangıç malzemeler yukarıda anlatılan üretim şekline uygun olarak seçilmelidir. Seçilen moleküller kendi arasında yapabildiği bağa göre baskılama türü seçilmelidir. Aynı moleküller birden fazla şekilde kendi arasında bağ yapabilmektedir. Bu da en son aşamada oluşacak olan MIP'in seçiciliğini ve bağlayabilme kapasitesini artırmaktadır. Kalıp molekül ve fonksiyonel monomer arasında oluşan bağ ne kadar güçlü ve sağlam ise hedef molekül de aynı güçte ve sağlamlıkta MIP'e bağlanmaktadır.

Bunun yanı sıra MIP'in hazırlanması için doğru yöntem seçmek de önemlidir. Genel olarak, MIP hazırlama mekanizması radikal polimerizasyon ve sol-jel yöntemlerine dayanmaktadır. Bunların arasında kütle polimerizasyonu olarak bilinen yöntem en sık kullanılanıdır. Bu yöntemin içinde küçük parçacık oluşmasına neden olan mekanik öğütme ve eleme aşamaları vardır. Bu aşamalardan sonra MIP'in bağlama kapasitesi düşmektedir. Bunun yanı sıra bu yöntem için çok miktarda kalıp molekül gerekmektedir. Bunun gibi sorunları aşmak için süspansiyon polimerizasyonu, emülsiyon polimerizasyonu ve çökelek oluşturma polimerizasyonu gibi farklı tür polimerizasyon yöntemleri geliştirilmiştir [183-185].

2.4.4.1 MIP'lerin karakterizasyonu

Son aşamada oluşan MIP'ler kullanılmadan önce elektron mikroskoplar, yüzey mikroskopları ve spektroskopi yöntemleri ile karakterize edilmektedir. Genel olarak, MIP'lerin yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskopuyla (SEM) ve transmisyon elektron mikroskopuyla (TEM) analiz edilmektedir. MIP ince filmlerinin karakterizasyonunda Atomik güç mikroskopu (AFM) ve çeşitli spektroskopi yöntemleri önemli rol oynamaktadır. Nükleer manyetik rezonans (NMR), kızılötesi (IR) ve morötesi-görünür (UV-VIS) spektroskopisi de monomer-kalıp molekül kompleksinin karakterizasyonunun önemli parçası haline gelmektedir. Son yıllarda MIP'lerin yapılarını X-ışını abzorpsiyonu, X-ışınılı fotoelektron emisyonu (XPS) gibi çeşitli metotlar başarı göstermiştir

[165]. MIP'lerin yüzey alanları ve oşluk çapları Brunauer-Emmett-Teller (BET) analiz metoduyla ölçölmektedir. Termal dayanıklılık da termogravimetrik analiz (TGA) metoduyla yapılmaktadır. MIP'lerin tipik karakterizasyon yöntemleri 2.4'de verilmiştir [37].

Çizelge 2.4. MIP'lerin yaygın kullanılan Karakterizasyon yöntemleri [37].

Karakterizasyon amacı	Yöntem
Yüzey morfolojisi analizi	SEM, TEM, AFM
Fonksiyonel monomer ve kalıp molekül arasındaki etkileşimin incelenmesi	NMR, IR, UV-VIS
MIP'lerin yapısal analizi	X-ışını abzorpsiyonu, XPS
Polimerlerin yüzey alanı ve delik çapı analizi	Azot gazı abzorpsiyon deneyi
Termal dayanıklılık analizi	TGA
Manyetik özellik analizi	Titreşen örnek manyetometresi

2.4.5. MIP sensörler ve avantajları

MIP'lerin gerçek hayatta sensör olarak kullanılması oldukça yeni bir konudur. Şu ana dek sınırlı sayıda uygulamarda kullanılmış olmasına rağmen yüksek oranda başarı göstermiştir [170]. MIP sensörler klinik, biyolojik, biyoanalitik, süreç kontrolü ve çevresel faaliyetler gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır [186]. Uzmanlar MIP sensörlerin sıvı kromatografisi, kütle spektroskopisi gibi analitik ve başka spektroskopi yöntemlerini tamamlayacağına inanmaktadır [187]. MIP sensörlerin düşük maliyetli üretimi, kolay saklanması, uzun kullanım ömrü ve yüksek kapasite gibi birçok avantajları vardır. Bunun gibi uygulamalarda baskılanmış polimer bir sinyal dönüştürücü ile ortak çalıştırılmakta ve bu şekilde MIP'in algılama özelliği sensöre dönüştürölmektedir. Elde edilen sensörün duyarlılığı hedef molekülün polimere olan afinitesine bağlıdır. Bu yüzden baskılanmış polimerleri yüksek yüzey-

hacim oranı olan mikro veya nanometre boyutlarında kullanmak daha doğrudur. MIP sensör hazırlanırken dikkat edilmesi gereken unsurlardan biri de MIP sensörün hazırlanışı yani MIP ile detektörün entegre edilme şeklidir [188]. Bu amaçla birkaç metodoloji geliştirilmiştir: (i) elektropolimerizasyon benzeri yöntemler, (ii) önceden hazırlanmış polimerlerin damlatılarak yaydırılması, (iii) MIP, detektör ve birleştiriciden oluşan kompozit membran tasarımı, (iv) monomerin detektör ile polimerleştirilmesi, (v) kendi kendine oluşan monokatmanlar. Bu yöntemler kullanılarak MIP tabanlı sensörlerde elektrik kapasitör, UV-VIS detektörü ve kuvars kristal mikroterazi (QSM) detektörü kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra yüzey plazmon rezonans yüzeyinde üretilen sensör polimerleri ilgi konusu olmuştur.

2.4.6. MIP'lerin kullanım alanları

MIP'ler, bulunuşlarından bu yana kromatografik ayırma [189], katı faz ekstraksiyonu [190] veya membran ayırma gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Fakat MIP'ler kimyasal sensör olarak çok yüksek verimlere ulaşmıştır [191]. MIP'ler hedef molekülleri çevresel matrikslerde ucuz, kolay ve doğru biçimde izleme imkanı tanımaktadır. MIP'lerin genel kullanım alanları ayırma ve algılama üzerine dayalıdır. Moleküler baskılama tekniği yeterince gelişmiş olmasına rağmen halen yaygın olarak güncel hayatta kullanılamamaktadır.

Hızlı ve ucuz olarak üretilen baskılanmış polimerler kimya, biyoloji ve mühendislik alanlarında birçok farklı uygulamalarda kullanılmaktadır. MIP'ler sensörlerin afinite malzemesi [192], çevreye yayılmış olan kimyasal, antimikrobiyel, boya, gıdalarda ilaç kalıntılarının algılanmasında başarıyla uygulanmaktadır. Bunların yanı sıra MIP'ler katı faz ekstraksiyonu için adsorbent olarak, bağlayıcı, molekül tutucu, yapay antikor ve ayrıca kromatografide durgun faz olarak da kullanılmaktadır. MIP'lerin bir diğer kullanım alanı da ilaç sanayisidir. İlaçları geliştirmek ve izlemek için en uygun malzeme olarak gösterilmektedir [193]. MIP'lerin bazı uygulamaları da kimyasal tepkimelerde istenmeyen yan ürünleri toplamak ve hapsetmeye dayanmaktadır. MIP'ler özgül ve yüksek seçicilikte bağlama kapasitesi göstermektedir [194]. Bu kadar yüksek seçicilikte bağlama bölgelerinin olması

MIP'lerin analitik kimyada katı faz ekstraksiyonunda başarıyla kullanımına neden olmuştur [195].

Moleküler baskılanmış malzemelerin üretimi ucuz ve kolay olması, enzimler antikolar gibi spesifik molekül algılama bölgelerinin olması tıbbi alanda çığır açmalarına sebep olmuştur [196]. Molekül bağlayabilme ve geri bırakabilme kapasite nedeniyle bu tarz polimerlerin medikal alanda ilaç taşıyıcı olarak kullanılması öngörülmektedir. Bunun dışında ilaçların izlenmesi, biyolojik reseptör olarak da kullanılmaya başlanmıştır [197]. Bunların yanı sıra MIP'ler gıda sektörünün gelişmesinde de önemli rol oynamaktadır [198].

Son yıllarda yapılan araştırmalar sentezlenmiş polimerlerin hücre lizatındaki fosfopeptitlerin zenginleştirilmesinde kullanımının mümkün olduğunu göstermiştir. Bu zenginleştirme yaygın olarak kullanılan ve en verimli malzeme olarak bilinen titanyum dioksit (TiO_2) verimini fazlasıyla katlamıştır [199].

Moleküler baskılama ile üretilmiş polimerlerin seçiciliği ve afinitesi doğal spesifik antijenler veya enzimlere göre iki kat daha düşüktür [200]. Bu bağlama yerlerinin doğal özdeşlerine göre düşük olmasına rağmen ucuz ve kolay üretilmektedir. Bu bağlama yerleri proteinlere göre birçok avantaj sağlamaktadır. Proteinlerin temizlenmesi, denatürasyonu ve tekrar kullanımı zor ve masraflıdır. Onların gerçek özdeşleri olan sentetik polimerlerin üretilmesi ise kolay, ucuzdur. Ayrıca tekrar tekrar kullanılabilir. Bu yüzden uzun vadede gerekli araştırmalar yapılarak yapay baskılanmış molekül seçici polimerlerin doğal proteinlerin yerlerine geçmeleri öngörülmektedir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

2-hidroksietilmetakrilat (HEMA), 2,2'-azobisisobütironitril (AIBN), etilenglikoldimetakrilat (EDMA), kalıp molekül olarak kullanılan amoksisilin (AMOX), seçicilik çalışmalarında kullanılan Ampicillin (AMP), Cephalexin (CEP) ve kolesterol (Sigma Chemical Company, ABD) firmasından satın alınmıştır. Reaktifler kullanılabildiği kadar 4°C'de korunmuştur. Çalışmada kullanılan diğer kimyasallar Merck AG (Darmstadt, Almanya) firmasından, analitik saflıkta temin edilmiştir.

3.2. AMOX Baskılanmış ve Baskılanmamış PHEMAGA Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) Nanosensörlerin Hazırlanması

3.2.1. Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) Çip Altın Yüzeylerinin Allil Merkaptan ile Yüzey Modifikasyonu

SPR çip altın yüzeyinin modifikasyonu allil merkaptan ($\text{CH}_2\text{CHCH}_2\text{SH}$) kullanılarak yapılmıştır. Bunun için altın yüzey 20 ml asidik pirana çözeltisi içine daldırılıp 20 saniye bekletildikten sonra temizlenmiştir. Çözeltiden çıkarılan çipler saf etil alkol ile yıkandıktan sonra 3 saat vakum etüvünde (200 mmHg, 40°C) kurutulmuştur. SPR çip yüzeyine 5 µL allil merkaptan damlatılmış ve 12 saat bekletilmiştir. Son aşamada çipler etil alkol ile yıkanmış ve N_2 atmosferinde kurutulmuştur. Modifikasyon sonucunda allil grupları bağlanmış altın kaplı SPR çip yüzeyleri elde edilmiştir.

3.2.2. MAGA:AMOX Ön Kompleksinin Hazırlanması

MAGA:AMOX ön kompleksi kalıp molekül olarak amoksisilin fonksiyonel monomer olarak MAGA monomeri kullanılarak hazırlanmıştır. Kalıp molekül olarak kullanılan AMOX'in N-metakriloil-(L)-glutamik asidin (MAGA) monomeri ile MAGA:AMOX ön kompleksini oluştururken stokiyometrik olarak birleşme oranlarını tayin etmek için farklı mol oranlarındaki MAGA:AMOX (1:1; 4:1; 8:1 16:1) kompleksleri oluşturulmuştur. AMOX miktarı sabit tutularak artan MAGA oranının kompleksleşmeye etkisi 4 farklı amoksisilin baskılanmış PHEMAGA SPR incefilm nanosensörler hazırlanmıştır.

3.2.3. Amoksisilin (AMOX) Baskılanmış ve Baskılanmamış PHEMAGA İncefilm ve Nanopartiküllerin Hazırlanması

AMOX baskılanmış PHEMAGA SPR nanosensörler, MAGA:AMOX ön kompleksinin HEMA fonksiyonel monomeri ve EGDMA çapraz bağlayıcı ile polimerleştirilmesinden elde edilmiştir. Kalıp molekül (AMOX) monomeri sabit tutulup (1 μmol) farklı monomer miktarlarında (MAGA) (1 μmol , 4 μmol , 8 μmol ve 16 μmol) kompleksler hazırlanmıştır. (100 μL) HEMA monomeri ve (40 μL) EDMA çapraz bağlayıcı eklenmiştir. Polimer çözeltisinden 5 dakika N_2 gazı geçirilerek çözülmüş O_2 ortamdan uzaklaştırılmıştır. Başlatıcı olarak (4 mg) AIBN eklendikten sonra daha önceden alillenmiş çip üzerine (4 μL) çözelti damlatılmıştır. Hazırlanan 4 farklı MAGA:AMOX kompleksleri ile 4 farklı AMOX baskılanmış SPR incefilm nanosensörler hazırlanmıştır. Hazırlanan çip, UV lamba altına konularak 40 dakika fotopolimerizasyon reaksiyonu sonucunda polimerleşmiştir. Tepkimeye girmeyen monomerleri uzaklaştırmak için etil alkol kullanılmıştır. Çözelti içindeki monomer yüzdesi (%30 w/v) olarak belirlenmiştir. AMOX baskılanmamış SPR nanosensörler baskılanmış polimer çözeltisi içine AMOX eklenmeden aynı şekilde hazırlanmıştır.

Amoksisilin baskılanmış partiküllerin hazırlanması için aşağıdaki yöntem izlenmiştir. Polimerizasyon iki sıvı faz karışımında gerçekleştirilmiştir. Birinci sıvı faz, PVA (0.187 g), SDS (28.9 mg) ve sodyum bikarbonat (23.45 mg) 10 ml suda çözülerek elde edildi. İkinci sıvı faz ise; PVA (0.1 g) ve SDS (0.1 g) 200 mL suda çözülerek hazırlanmıştır. Monomer fazı, MAGA monomeri (381 μL), HEMA (0.45 mL) ve EGDMA (2.1 mL) kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan monomer fazı, birinci sıvı faza eklenerek miniemülsiyon yöntemi ile (25.000 rpm)'de (T10, Ika Labortechnik, Almanya) cihazı kullanılarak homojenize edilmiştir. Karışım cam polimerizasyon reaktörüne aktararak 3000 rpm ve 40°C da karıştırılmıştır (Radleys Carousel 6, Essex, İngiltere). Hazırlanan karışıma sodyum bisülfat (0.115 g) ve amonyum persülfat (0.126 g) eklenerek polimerizasyon (40°C)'ta 24 saatte yapılmıştır. Tepkimeye girmeyen monomer, yüzey aktif ve başlatıcı maddelerin AMOX baskılanmış partiküllerden uzaklaştırılması için 5 kez deiyonize su, 5 kez etil alkol ve tekrar deiyonize su kullanılmıştır. Her seferinde çözelti (9000 rpm)'de 1 saat süreyle (Allegra-64R Beckman Coulter, ABD) cihazı kullanılarak santrifüj edilmiştir ve

nanopartiküller yıkama ortamından ayrılmıştır. Temizlenen nanopartiküller, deiyonize su içerisinde 4°C'de saklanmıştır. Baskılanmamış PHEMAGA (NIP) nanopartiküller polimerizasyon ortamında AMOX olmaksızın aynı yöntem ile hazırlanmıştır. Allilmerkaptan ile modifiye edilmiş SPR nanosensörlerin altın yüzeylerine 5 µL nanopartikül çözeltisi damlatılmış ve 37°C'de 6 saat kurutulmuştur. Nanopartiküllerle kaplanmış SPR nanosensör yüzeyleri saf su ve etil alkol ile yıkandıktan sonra vakum etüvünde (200 mmHg, 40°C) kurutulmuştur.

3.2.4. Kalıp Molekül AMOX'nin Uzaklaştırılması

Hazırlanan SPR nanosensör yüzeyindeki incefilm ve nanopartiküllerden kalıp molekül AMOX 1.0 M NaCl çözeltisi kullanılarak uzaklaştırılmıştır. AMOX baskılanmış PHEMAGA SPR nanosensör yüzeylerinden AMOX 1.0 M NaCl çözeltisiyle her 10 dakikada bir desorpsiyon çözeltisi yenilenerek 1 saat boyunca yıkanmıştır.

3.3. İncefilm ve Nanopartikül SPR Nanosensörlerin Karakterizasyonu

3.3.1. Zeta Boyut Analizi

Elde edilmiş AMOX baskılanmış PHEMAGA nanopartiküllerin boyut analizi, Nano Zetasizer (NanoS, Malvern Instruments, Londra, İngiltere) cihazı ile belirlenmiştir. Zeta boyut analizi, ışık saçılması tekniği ile ölçüm yapılan partiküllerin hidrodinamik boyutu (0.6 nm-6.0 µm aralığında), zeta potansiyeli (maksimum iletkenlik 200 ms) ve molekül ağırlığı (1x10³-2x10⁷ aralığında) tayininde kullanılan bir sistemdir. Zeta boyut analizinde partikül çözeltisi (3 mL) cihazın örnek yuvasına yerleştirilmiştir ve ışık saçılması sinyali partikül sayısına bağlı olarak (partikül sayısı/s), (90°)'lik geliş açısında ve (25°C)'de tayin edilmiştir. Veri analizi için, kırılma indisi (1.33) ve deiyonize suyun yoğunluğu (0.88 mPa.s) kullanılmıştır. Örnekteki partikül yoğunluğu yeterli ölçüdedir. Ölçümler 3 kere tekrarlanmış sonuçlar zeta boyut analizörünün yazılımı ile incelenmiş ve standart sapma değerleri ile birlikte kaydedilmiştir.

3.3.2. FTIR-ATR Spektrofotometre Analizi

Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) nanosensörlerin altın yüzeyleri FTIR-ATR spektrofotometresi (Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS10, Waltham, MA,

ABD) cihazı ile karakterize edilmiştir. Ölçüm yapılan örnek haznesinden nem ve CO₂'i uzaklaştırmak için 10 dakika N₂ gazı geçirilmiştir. SPR nanosensör, cihazın örnek yuvasına yerleştirilmiş (600-4000 cm⁻¹) dalga sayısı aralığında tarama yapılarak elde edilen spektrumlar kaydedilmiştir.

3.3.3. Elipsometre Ölçümleri

Hazırlanan nanosensörlerin yüzeylerindeki kalınlık ölçümleri incefilm ve nanopartiküllerin EP3-Nulling Elipsometre (Göttingen, Almanya) cihazı ile karakterize edilmiştir. SPR nanosensör lazer ışık kaynağı altına yerleştirildikten sonra Kalınlık ölçümleri 532 nm dalga boyunda,(62°)'lik bir geliş açısında gerçekleştirilmiştir. Yüzey kalınlığı hesaplama program için BK7 + 50 nm altın + 70 nm polimer katmanı veri olarak öngörülmüştür. Ölçümler nanosensör yüzeyinde 6 farklı noktada 3 kere tekrarlanmıştır. Sonuçlar bu değerlerin ortalaması göre rapor edilmiştir.

3.3.4. Temas Açısı Ölçümleri

Temas açısı ölçümleri KRÜSS DSA100 (Hamburg, Almanya) cihazı kullanılarak hesaplanmıştır. Temas açısı SPR altın yüzeylerine bir damla su damlatılarak yapışık damla yöntemiyle belirlenmiştir. Altın yüzeylerinin farklı bölgelerine su damlattıktan sonra 10 kere fotoğraf çekilmiş ve her fotoğraf için ayrı temas açısı hesaplanmıştır. Belirlenen temas açısı değerleri damlacığın katı ile sol temas noktasından alınan soldan temas açısı; sağ temas noktasından alınan sağdan temas açısı olarak belirlenmiş ve her iki noktanın ortalaması olan ortalama temas açısı değerleri elde edilmiştir. Modifiye edilmemiş, AMOX baskılanmış ve baskılanmamış PHEMAGA nanosensör yüzeyleri için alınan 10 temas açısı değerlerinin ortalaması hesaplanmıştır.

3.3.5. Atomik Kuvvet Mikroskopisi (AFM)

SPR nanosensör altın yüzeylerinin karakterizasyonu atomik kuvvet mikroskobu (Nanomagnetics Instruments, Oxford, İngiltere) kullanılarak, yarı degen modda çekilmiştir. AFM serbest kantileverli interferometre özelliğinden dolayı çok yüksek (4096 x 4096 piksel) gibi çözünürlükte ölçüm alabilmektedir. SPR nanosensör çift yüzlü karbon bant ile örnek tutucuya konulmuştur. Görüntüleme çalışmaları hava ortamında, yarı degen modda

gerçekleştirilmiştir. Salınım rezonans frekansı, (341.30 kHz) olarak uygulanmıştır. Titreşim genliği, 1 VRMS ve boş titreşim genliği ise 2 VRMS'dir. Örnekler (2 µm/s) tarama hızında, (256 x 256 piksel) çözünürlükte, (2 x 2 µm)'lik bir alanın görüntüsü olarak alınmıştır.

3.4. AMOX Baskılanmış SPR Nanosensörler ile Kinetik Analizler

MAGA:AMOX ön kompleksinde kalıp molekül olarak Amoksisilin, fonksiyonel monomer olarak N-metakriloil-(L)-glutamik asid (MAGA) monomeri kullanılarak hazırlanmıştır. AMOX miktarı sabit tutulup fonksiyonel monomer (MAGA) miktarı değiştirilerek baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) PHEMAGA nanosensörler hazırlanmıştır. 10 ng/mL AMOX derişimin SPR sensorgramlar alınmış ve %ΔR değerleri belirlenmiştir. AMOX baskılanmış PHEMAGA SPR nanosensörlerin hazırlanmasından sonra kinetik çalışmaları farklı derişimlerdeki (pH 7.0 fosfat tamponuyla hazırlanmış 0.001-1.0 ng/mL aralığında hazırlanmış) AMOX çözeltileri ile gerçekleştirilmiştir. AMOX baskılanmış PHEMAGA incefilm ve nanopartikül SPR nanosensörler kinetik analiz çalışmalarında kullanılmıştır. İlk olarak, SPR nanosensör yüzeyleri deiyonize su (50 mL) ile yıkanmıştır. Sistemden fosfat tamponu (pH 7.0) geçirilerek yüzey plazmon eğrileri alınarak rezonans kırılma açıları belirlenmiştir. Kinetik görüntüleme programının SPRview yazılımı, Kinetik analiz çalışmaları için kullanılmıştır. Rezonans plazmon eğrilerinin alınması ve aynanın rezonans açısı değerine ayarlanmasından sonra SPR sisteminden 5 dakika tampon çözeltisi (pH 7.0) geçirilmiştir. Daha sonra, farklı derişimlerdeki AMOX çözeltileri (2 mL/dakika akış hızı) sisteme verilmiştir. Rezonans frekansındaki kayma değerleri anlık olarak gözlenmiş ve denge durumuna ulaştıktan sonara (1.0 M) NaCl çözeltisi ile (2 ml/dak. Akış hızı, 25°C) desorpsiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Desorpsiyon aşamasından sonra, SPR nanosensör su ve fosfat tamponu (pH 7.0) ile yıkanmıştır. Adsorpsiyon-desorpsiyon-temizleme aşamaları gerçekleştirildikten sonar farklı derişimlerdeki AMOX çözeltileri sisteme verilmiştir.

3.5. Seçicilik Çalışmaları

AMOX baskılanmış PHEMAGA SPR nanosensörlerin seçiciliğini göstermek için AMOX baskılanmamış PHEMAGA SPR nanosensörler hazırlanmıştır.

Amoksisilin (AMOX), ampicillin (AMP), sefaleksim (CEP) ve kolesterol (KOL) moleküllerinin kullanılmasıyla oluşturulan çözeltiler (10 ng/mL, 2 mL, 2.0 mL/dak. Akış hızı, 25°C) SPR sistemine verilmiştir.

3.6. Süt Örneklerinden AMOX Eldesi

Market ve çiftlik süt örneklerinden AMOX tayini için özüt ve seyreltme işlemleri şu şekilde gerçekleştirilmiştir: süt örneği (2 mL) 18 mL hidroklorik asit ilave edilerek sulu çözeltisi (pH 5.0) hazırlanmış ve 4°C'de 10 dakika boyunca 8000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Üst yağ tabakası alınarak 15 mg tripsin (Merck 24579) ve 15 mg clara-diyastaze (Fluka 27540) ilave edilerek 40°C'de 30 dakika hidroliz edilmiştir. Çözelti soğuduktan sonra 10 dakika boyunca 8000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatatın 5 mL'si katı faz ekstraksiyon (SPE, Solid Phase Extraction) kartuşlarından geçirilerek kullanılmıştır [201].

3.7. Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi

AMOX baskılanmış PHEMAGA nanosensörlerin aynı gün içinde tekrar kullanılabilirliğinin incelenmek amacıyla (1000 ng/mL) derişimlerde hazırlanmış AMOX içeren çözeltiler (25 ng/mL, 2 mL 2.0 mL/dak. Akış hızı, 25°C) SPR sistemine 5 kez verilerek tekrar edilmiştir. Ayrıca SPR nanosensörlerin raf ömürlerinin belirlenmesi içinde farklı günlerde tekrar kullanılabilirlik analizi yapılmıştır. 1000 ng/mL AMOX derişiminde hazırlanan AMOX çözeltisi SPR sistemine verilerek sensogramlar alınmış ve nanosensörlerin verimliliği belirlenmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

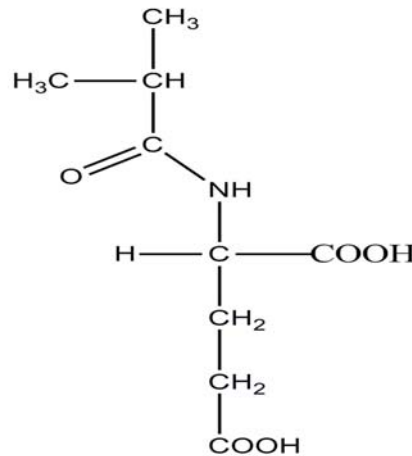
4.1. AMOX baskılanmış ve Baskılanmamış İncefilm SPR Nanosensörler

4.1.1. AMOX baskılanmış [PHEMAGA-AMOX] ve Baskılanmamış [PHEMAGA] İncefilm SPR Nanosensörlerin Karakterizasyonları

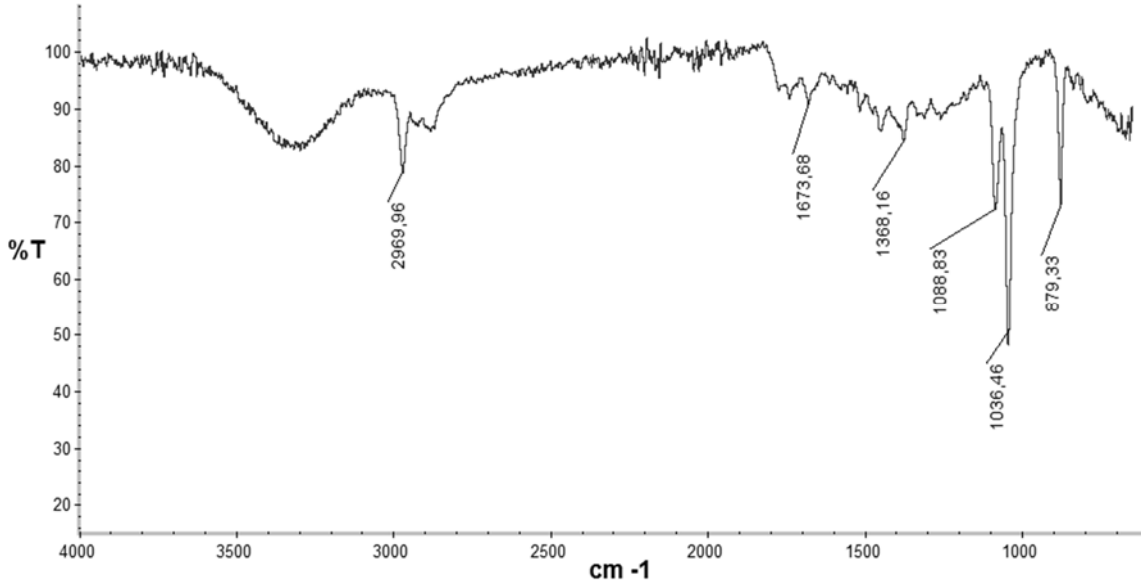
AMOX baskılanmış [PHEMAGA-AMOX] ve Baskılanmamış [PHEMAGA] İncefilm SPR Nanosensörlerin yapısal analizleri için aşağıdaki yöntemler kullanılmıştır.

4.1.1.1. FTIR-ATR Analizi

N-metakriloil-(L)-glutamik asidin (MAGA) monomer FTIR çalışmaları ile karakterize edilmiştir (Şekil 4.1).

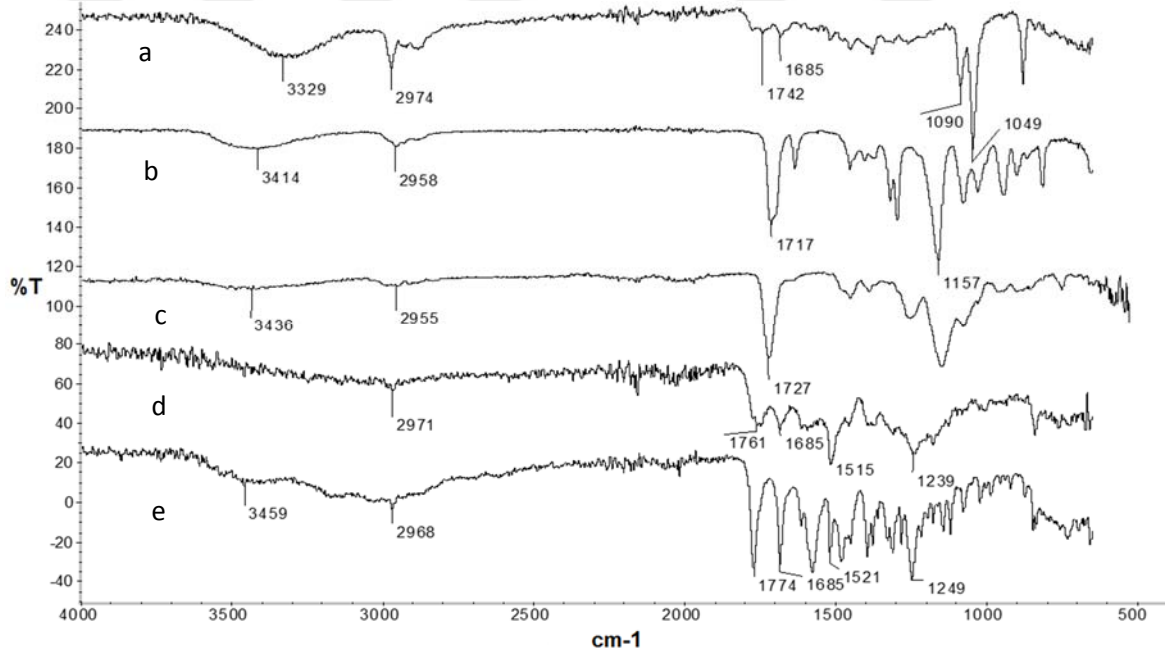


Şekil 4.1. N-metakriloil-(L)-glutamik asidin (MAGA) monomerinin molekül şekli.



Şekil 4.2. N-metakrilolil-(L)-glutamik asidin (MAGA) monomerinin FTIR spektrumu.

MAGA monomerinin yapısının belirlenmesi için FTIR-ATR tekniği kullanılmıştır. MAGA yapısındaki doymuş C-H gerilmesi polimerik yapının spesifik bantları 2969 cm^{-1} , 1680 cm^{-1} 'de amit karbonili gerilmesi, 1111 cm^{-1} 'de karbon-oksijen gerilmesi şekil 4.2'de gözlenmiştir.



Şekil 4.3. MAGA (a), HEMA (b), PHEMAGA (c), AMOX (d) ve AMOX baskılanmış PHEMAGA (e) SPR nanosensöre ait FTIR-ATR spektrumu.

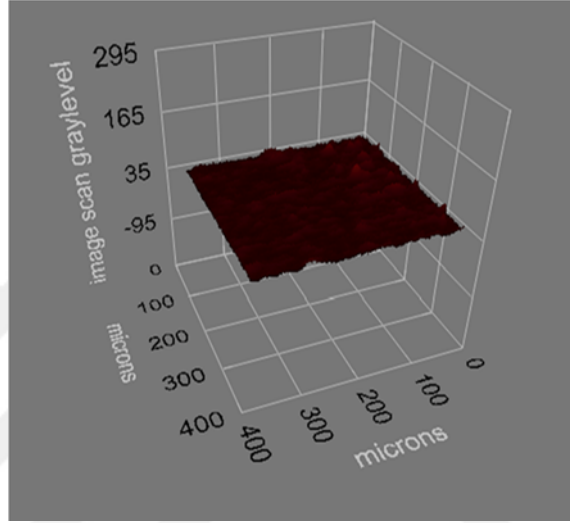
AMOX baskılanmış PHEMAGA SPR nanosensörlerin altın yüzeylerinin spektroskopik karakterizasyonu için FTIR-ATR (Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS10, Waltham, MA, ABD) kullanılmıştır. SPR nanosensör örneği cihaza yerleştirildikten sonra 600-4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında tarama yapılmıştır. AMOX baskılanmış PHEMAGA nanosensör yüzeyine ait FTIR spektrumu Şekil 4.2.'de verilmiştir. AMOX yapısındaki 1684 ve 1740 cm^{-1} 'de karbonil gerilmesi, 1513 cm^{-1} 'de C=C gerilmesi, 1684.72 cm^{-1} 'de aromatic halkası (C-H) gerilmesi piki görünüyor. Ayrıca amin (N-H) gurubunun gerilme piki 3480.1 cm^{-1} görünmektedir. AMOX baskılanma nedeniyle karboksilik (O-H) gurubun pikide 2964.83 cm^{-1} 1245 cm^{-1} 'deki C-C gerilmesi AMOX baskılanmış PHEMAGA SPR incefilme AMOX'in başarılı bir şekilde baskılandığını göstermektedir (şekil 4.3).

4.1.1.2. Elipsometre ve Temas Açısı Ölçümleri

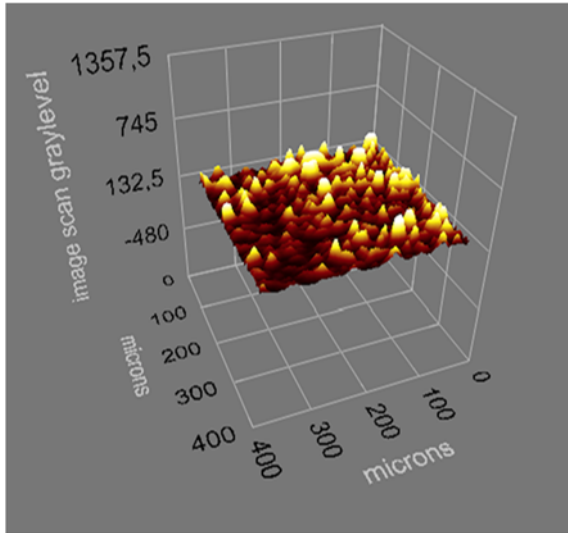
Elipsometre, ışığın bir malzemeden kırılması ve yansması sırasında kutuplanmasında oluşan değişikliği ölçer. Ölçüm alınacak yüzeye doğrusal kutuplanmış ışık gönderilerek yansıyan ışığın kutuplanması ölçülerek ışığın yansımından sonra yatay ve dikey bileşenlerdeki değişiklik ve faz farkı değişimi belirlenebilmektedir. AMOX baskılanmış ve baskılanmamış PHEMAGA SPR nanosensörlerin ortalama yüzey kalınlığını ölçmek için EP3-Nulling Elipsometre (Göttingen, Almanya) cihazı kullanılmıştır. Elipsometrik ölçümler (658 nm) dalga boyunda, (65°)'lik bir geliş açısında gerçekleştirilmiştir. Allil merkaptan ile modifiye edilmemiş SPR nanosensörlerin ortalama kalınlık değeri 62.65 nm, AMOX baskılanmış PHEMAGA SPR nanosensörlerin ortalama kalınlık değeri 72.8 nm ve baskılanmamış PHEMAGA SPR nanosensörlerin ortalama kalınlık değeri 67.4 nm olarak hesaplanmıştır.

Temas açısı cihazı Krüss DSA100 (Hamburg, Almanya) kullanılarak modifiye edilmemiş, AMOX baskılanmış ve baskılanmamış PHEMAGA nanosensörlerin yüzey karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Çizelge 4.1'de modifiye edilmemiş, AMOX baskılanmış ve baskılanmamış PHEMAGA SPR nanosensörlerin yüzey temas açıları verilmiştir. Modifiye edilmemiş, AMOX baskılanmış ve baskılanmamış PHEMAGA SPR nanosensör yüzeylerinin temas açıları sırasıyla 74.2 ± 1.07 , 62.1 ± 2.13 ve 69.6 ± 0.86 olarak ölçülmüştür. Şekil

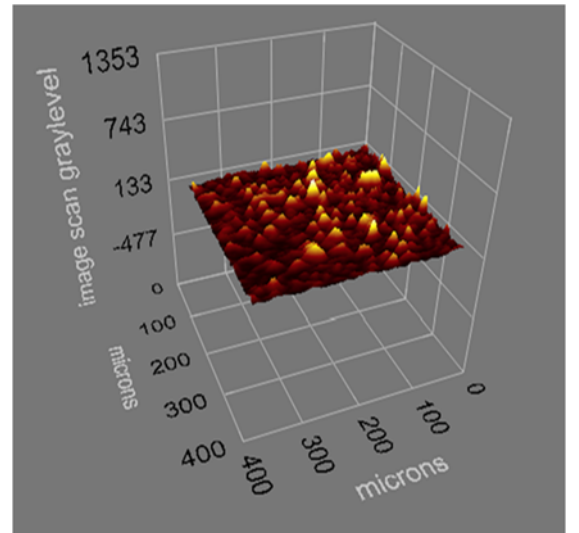
4.5'de modifiye edilmemiş, AMOX baskılanmış ve baskılanmamış PHEMAGA SPR nanosensörlere ait temas açısı görüntüleri yer almaktadır. Temas açısı ölçümlerinden görüldüğü gibi modifiye edilmemiş SPR çip yüzeyinin temas açısı değeri 74.2° , AMOX baskılanmış PHEMAGA çip yüzeyinde 62.1° 'ye düşmüştür. AMOX baskılanmamış PHEMAGA SPR nanosensörün temas açısı değeri 69.6° olarak belirlenmiştir. PHEMAGA polimerinin hidrofilik karakterinden dolayı yüzey temas açısı ölçümlerinde önemli miktarda azalma gözlenmiştir.



(a)



(b)



(c)

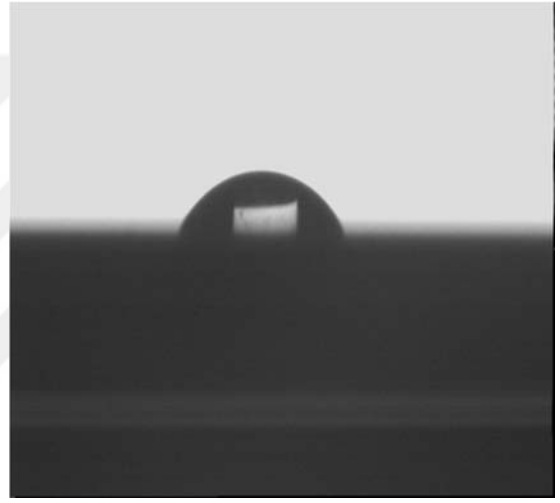
Şekil 4.4. Allil merkaptan ile modifiye edilmemiş (a), AMOX baskılanmış (b) ve baskılanmamış PHEMAGA (c) SPR nanosensörlerin elipsometrik ölçümde alınan 3 boyutlu görüntüleri.



(a)



(b)



(c)

Şekil 4.5. Modifiye edilmemiş SPR altın yüzey (a), AMOX baskılanmış (b) ve baskılanmamış (c) PHEMAGA SPR çiplerin yüzey temas açısı fotoğrafları.

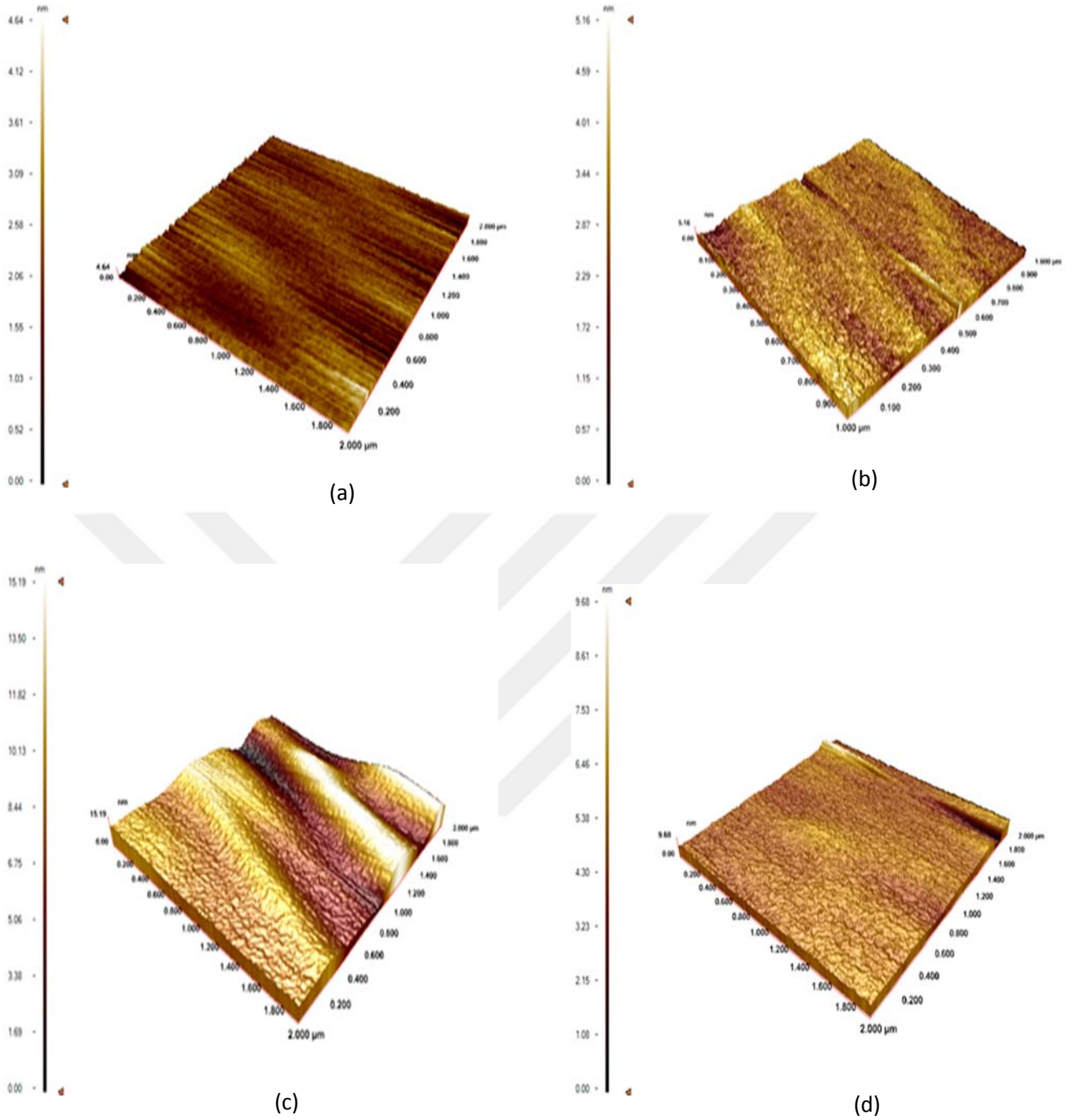
Çizelge 4.1. Modifiye edilmemiş, AMOX baskılanmış ve baskılanmamış incefilm SPR nanosensörlerin yüzey temas açıları.

Yüzey	Temas açısı° (H ₂ O)
Modifiye edilmemiş altın yüzey	74.2 ± 1.07
AMOX baskılanmış nanosensör yüzeyi	62.1 ± 2.13
AMOX baskılanmamış nanosensör yüzeyi	69.6 ± 0.86

4.1.1.3. Atomik Kuvvet Mikroskop Analizi

Modifiye edilmemiş, allil merkaptan ile modifiye edilmiş, AMOX baskılanmış ve baskılanmamış SPR nanosensörlerin yüzey morfolojisi yarı temas modunda AFM cihazı ile incelenmiştir. Yüzeyle ait AFM görüntüleri şekil 4.6'da gösterilmiştir. Asidik pirana çözeltisi ile temizlenmiş SPR çipin yüzeyin pürüzlülük değeri 4.64 nm, allil merkaptan ile modifiye edilmiş SPR çip, AMOX baskılanmış SPR nanosensör yüzeylerin pürüzlülük değeri 15.19 nm ve baskılanmamış PHEMAGA nanosensörlerin yüzey pürüzlülük değeri 9.68 nm olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar; AMOX baskılanmış PHEMAGA SPR nanosensörleri yüzeye başarılı bir şekilde tutunduğunu göstermektedir.



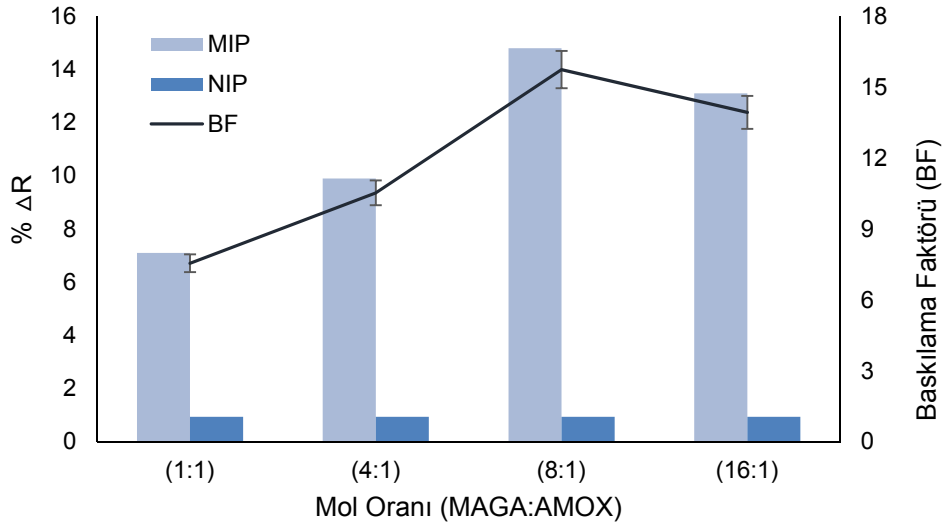


Şekil 4.6. Modifiye edilmemiş SPR nanosensör (a), allil merkaptan ile modifiye edilmiş SPR nanosensör (b), AMOX baskılanmış PHEMAGA SPR nanosensör (c) ve baskılanmamış PHEMAGA SPR nanosensörlerin (d) yarı temas modunda alınan AFM 3B görüntüsü ($2 \times 2 \mu\text{m}^2$).

4.1.2. AMOX Baskılanmış PHEMAGA SPR Nanosensörlerin Hazırlanması ve Kinetik Analizleri

4.1.2.1. MAGA:AMOX Ön-kompleks Oranının Optimize Edilmesi

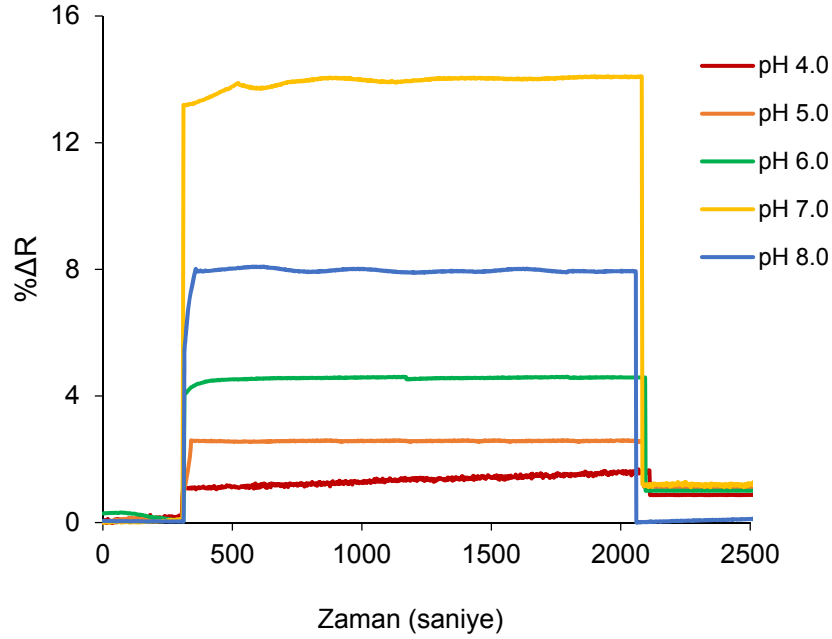
Farklı mol oranlarında MAGA:AMOX (1:1; 4:1; 8:1; 16:1) AMOX baskılanmış ve baskılanmamış SPR nanosensörler hazırlanmıştır. AMOX baskılanmış ve baskılanmamış PHEMAGA SPR nanosensörlerin hazırlanmasından sonra 0.01 ng/mL derişiminde AMOX ile kinetik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. AMOX baskılanmış PHEMAGA SPR nanosensörler için baskılanmamış SPR nanosensörlere göre daha yüksek $\% \Delta R$ değerlerinin elde edilmesi amoksisiline özgü bağlanma bölgelerinin oluştuğunun bir göstergesidir. AMOX baskılanmamış PHEMAGA SPR nanosensörlerin yapısında da aynı miktarda fonksiyonel monomerin yer almasına karşın kalıp moleküle özgü bağlanma bölgeleri oluşmadığından elde edilen $\% \Delta R$ değerleri daha düşüktür. Farklı oranlarda MAGA:AMOX içeren polimerizasyon karışımları ile hazırlanan AMOX baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) PHEMAGA nanosensörler ile elde edilen $\% \Delta R$ ve baskılama faktörü ($BF: \% \Delta R_{MIP} / \% \Delta R_{NIP}$) 8:1 mol oranında (MAGA:AMOX) 15.74 olarak belirlenmiş (Şekil 4.7) ve tüm analizlerde bu oran kullanılarak SPR nanosensörler hazırlanmıştır.



Şekil 4.7. Farklı mol oranlarında MAGA:AMOX ile hazırlanan AMOX baskılanmış ve baskılanmamış PHEMAGA SPR nanosensör için baskılama faktörü değerler.

4.1.2.2. pH'nin Etkisi

AMOX baskılanmış PHEMAGA nanosensörlerin asidik, nötr ve bazik ortamlarda aktivitesini belirlemek için farklı pH aralıklarında (pH 4.0-8.0) kinetik analizler yapılmıştır (Şekil 4.8). AMOX baskılanmış SPR nanosensörlerde en yüksek AMOX tutulması pH 7.0 fosfat tamponunda gözlemlenmiş ve çalışma ortamı olarak pH 7.0 fosfat tampon seçilmiştir.

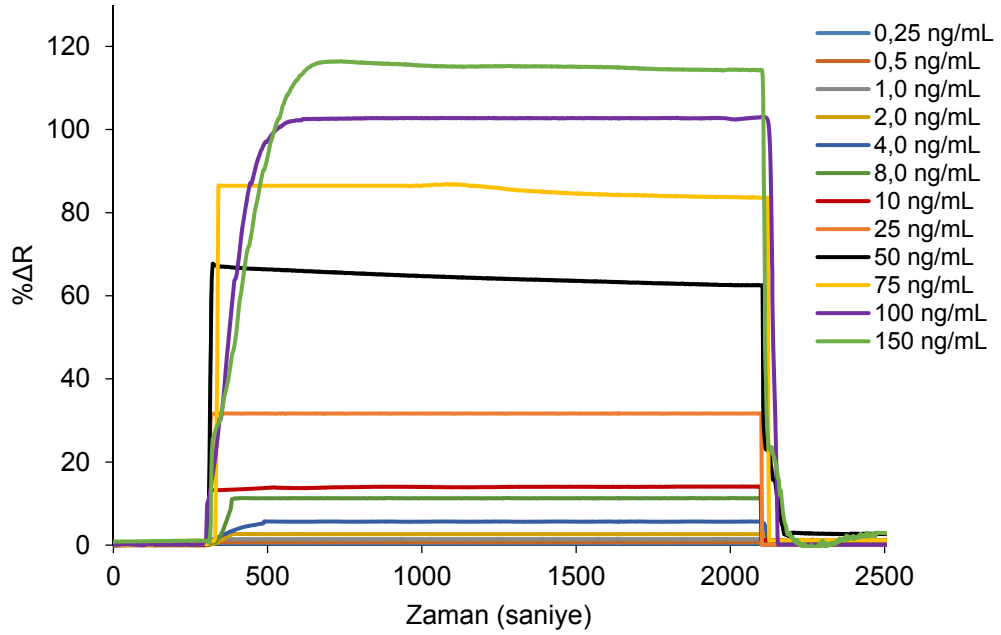


Şekil 4.8. AMOX baskılanmış PHEMAGA nanosensörlerde pH'nin etkisi.

4.1.2.3. Kinetik Analizler

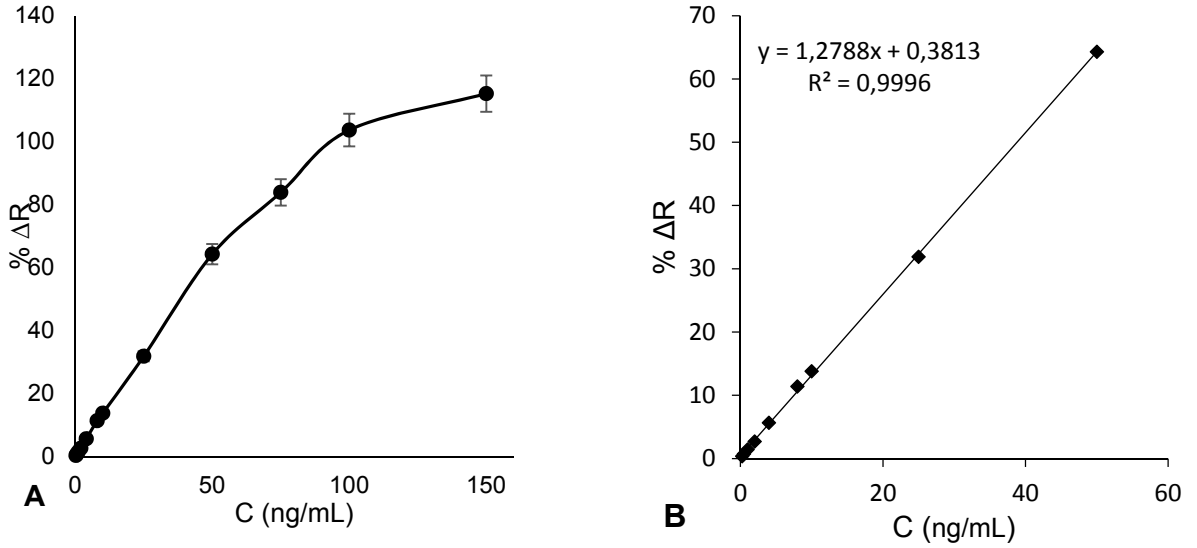
Tez kapsamında AMOX baskılanmış ve baskılanmamış PHEMAGA incefilm sentezlenmesiyle SPR nanosensörler hazırlanmıştır. SPR sinyali ile AMOX derişimi arasındaki tenasübün değerlendirilebilmesi için farklı derişimlerde (0.25-150 ng/mL) AMOX çözeltileri hazırlanmıştır. AMOX çözeltileri SPR nanosensörler ile etkileştirilerek SPRview yazılımı kullanılarak kinetik veriler hesaplanmıştır. Şekil 4.9'de farklı derişimlerde hazırlanan AMOX çözeltilerinden elde edilen sensorgramlar verilmiştir. Şekil 4.9'da farklı derişimlerde AMOX çözeltilerinin nanosensörlere uygulanması ile elde edilen % kırılma indisine karşılık zaman grafikleri görülmektedir. Şekil 4.9'da nanosensör yüzeyine AMOX çözeltisi uygulanmasıyla birlikte % kırılma indisi artmaktadır. SPR sisteminden önce denge tamponu olarak pH 7.0 fosfat

tampon denge tampon geçirilerek sistem yeniden dengeye getirilmiştir. Dengeye gelen SPR sisteminden AMOX çözeltisi geçirilerek farklı derişimler için sensorgramlar alınmış ve en son desorpsiyon çözeltisi kullanılmıştır. Bütün ölçümlerde sistemin dengeye ulaşması 30 dakika süre içerisinde gerçekleştirilmiştir. Desorpsiyon ve rejenerasyon işlemleri 15 dakika içinde yapılmıştır.



Şekil 4.9. Farklı derişimlerde hazırlanan AMOX çözeltisi ile PHEMAGA incefilm SPR nanosensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar.

Şekil 4.9'da yüzeyin AMOX çözeltisi ile etkileşiminde $\% \Delta R$ değerleri artmıştır. Derişimdeki artışla birlikte kırılma indisi değerinde artış olması çözelti ile yüzey arasındaki sürücü güç olan derişim farkının artması gösterilebilir.



Şekil 4.10. AMOX derişimi ile SPR nanosensör (% ΔR) arasındaki ilişki (A) ve 0.25-50 ng/mL aralığında AMOX derişimi ile SPR nanosensör kalibrasyon grafiği (B).

Şekil 4.10 A'da görüldüğü gibi % ΔR değerleri derişim arttıkça artmaktadır. Bu değerler yaklaşık 100 ng/mL'de dengeye ulaşmış ve denge değeri SPR: 103.7 olarak belirlenmiştir. Şekil 4.10 B'de SPR nanosensörler için farklı AMOX derişim aralıklarında derişim-sinyal linerliği verilmiştir. 0.25-50 ng/mL AMOX derişim aralığındaki veriler değerlendirildiğinde elde edilen derişim- ΔR grafiklerinden $y=1.2788x+0.3813$ denklemi elde edilmiştir. Elde edilen bu grafikten doğrusallık katsayısı ise (R^2) 0.999 olarak bulunmuş ve %99 doğrulukta ölçüm yapabilmektedir.

AMOX baskılanmış PHEMAGA SPR nanosensörlerin kinetik verilerine bakarak $3s/m$ denklemi kullanılarak tayin sınırı (LOD) ve tayin limiti (LOQ) değerleri hesaplanmıştır. Bu eşitlikte (s), (ΔR) ve (m) değişkenleri sırayla nanosensör yüzeyinden denge çözeltisi geçerken alınan sinyal değeri, ölçümlere ait standart sapma değeri ve kalibrasyon grafiğinin eğimini göstermektedir. Denge çözelti için R değeri 10 ölçümün ortalaması hesaplanarak, (ΔR) değeri ile birlikte SPR nanosensörler için 0.00047 olarak belirlenmiştir. Buna göre kalibrasyon grafiğine ait yukarıdaki denklem kullanılarak (LOD) SPR:0.0011 ng/mL olarak belirlenmiştir. (LOQ)

hesaplanması için 10s/m eşitliğinden yararlanılmış ve (LOQ) SPR:0.0037 ng/mL olarak belirlenmiştir.

4.1.2.4. Bağlanma Kinetik Analizi ve Denge İzoterm Modelleri

Yüzeyin en yüksek analit bağlama kapasitesi $[B]_0$ olarak tanımlanmaktadır. Diğer derişim değerler ise SPR sinyali olarak ifade edilmektedir. Bu sebeple kütlenin derişime dönüştürülmesine gerek kalmayacaktır. Serbest analit derişiminin akış hücresinde sabit kaldığı Yalancı-birinci derece koşulları altında serbest analit derişiminin akış hücresinde sabit kaldığın bağlanma şu şekilde ifade edilir;

$$d\Delta R / dt = k_a C (\Delta R_{maks} - \Delta R) - k_d \Delta R \quad (4.1)$$

SPR sinyalinin değışim hızı: $d\Delta R/dt$, bağlanma ile ölçülen maksimum sinyal: R ve R_{maks} , analit derişimi (ng/mL): C , bağlanma hız sabiti: k_a , (mL/ng.s) ve ayrılma hız sabiti: k_d (1/s)'dir. Bağlanma sabiti K_A (mL/ng), k_a ve k_d sabitlerinin oranından hesaplanır ($K_A = k_a/k_d$). Denge durumunda, $d\Delta R/dt=0$ alınarak eşitlik basitleştirilir:

$$\Delta R_{denge} / C = K_A \Delta R_{mak} - K_A \Delta R_{denge} \quad (4.2)$$

$\Delta R_{denge}/C$ 'ye karşı ΔR_{denge} grafiğinden bağlanma sabiti K_A ve ayrılma sabiti K_D ise; $1/K_A$ eşitliği ile hesaplanabilmektedir.

$$d\Delta R/dt = k_a C \Delta R_{maks} - (k_a C + k_d) \Delta R \quad (4.3)$$

$d\Delta R/dt$ 'ye karşı ΔR grafiği etkileşim kontrolü kinetikler için çizildiğinde eğimi $-(k_a C + k_d)$ olan bir doğru vermektedir. Başlangıç bağlanma hızı analit derişimiyle doğru orantılı olup kantitatif olarak derişim belirlenmesinde kullanılmaktadır. R_{maks} değeri ile tek bir sensorgram kullanılarak k_a ve k_d değerleri

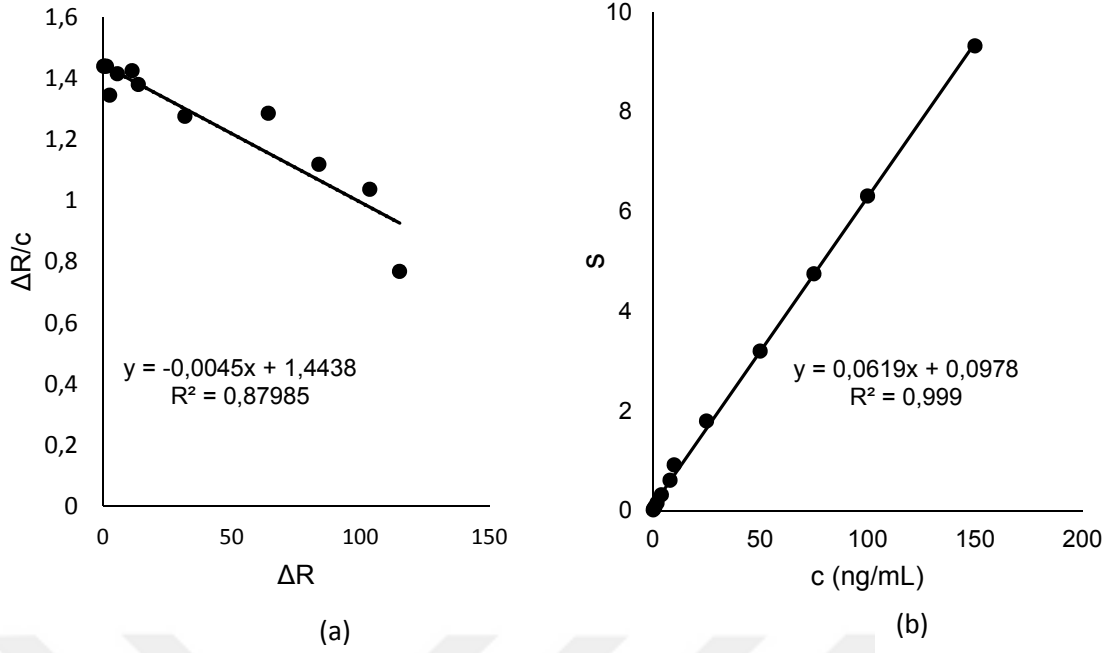
hesaplanabilmektedir. R_{maks} 'ın deneysel olarak belirlenmesi için yüzeyi tamamen doygunluğa eriştirmek için çok yüksek analit derişimleri gerekmektedir. Birçok farklı analit derişimlerinde bağlanma sensorgramlarının alınması en çok tercih edilen yaklaşımdır. İleri ve geri yöndeki hız sabitleri ile ilişkili bir eğim değeri (S) ileri ve geri yöndeki hızların analizi için çizilen $d\Delta R/dt$ 'ye karşı ΔR grafiklerinden elde edilmektedir.

$$S = k_a C + k_d \quad (4.4)$$

S'ye karşı C grafiğinden eğim k_a belirlenebilirken teorik olarak kesim noktası k_d değerini belirlenmektedir. k_d 'nin hesaplaması için $k_a C \gg k_d$ olduğu durumlarda bu yöntem çok güvenilir değildir. Bu sebeple ayrışma kinetiğinin incelenmesi gerekmektedir.

$$\ln(\Delta R_0 / \Delta R_t) = k_d (t - t_0) \quad (4.5)$$

SPR sinyal değerlerinden ΔR_0 ve ΔR_t ayrılma eğrisindeki t_0 ve t belirlenebilmektedir. Denge analizi ve bağlanma kinetik analizi için çizilen doğrular Şekil 4.11A a ve 4.11B'de ve bu doğrulara ait denklemlerden hesaplanan ΔR_{maks} , k_a , k_d , K_A ve K_D değerleri Çizelge 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.11. Kinetik hız sabitlerinin belirlenmesi (a) Denge analiz yaklaşımı (Scatchard), (b) Bağlanma kinetik yaklaşımı.

Çizelge 4.2. Kinetik hız sabitleri.

Denge Analizi (Scatchard)	Bağlanma Kinetik Analizi
ΔR_{maks} : 320.84	k_a , ng/mL.s: 0.0619
K_A , ng/mL: 0.0045	k_d , 1/s: 0.0978
K_D , mL/ng: 222.22	K_A , ng/mL: 0.633
R^2 : 0.879	K_D , mL/ng: 1.579
	R^2 : 0.999

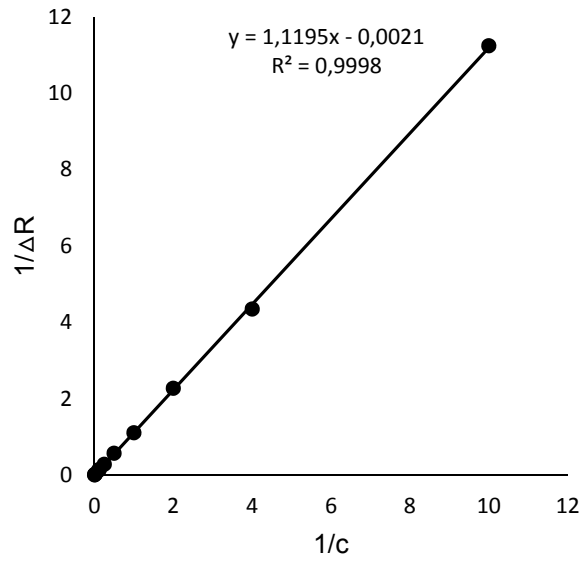
Scatchard, Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich (LF) modelleri AMOX baskılanmış SPR nanosensör ile AMOX arasındaki etkileşimi incelemek amacıyla bu dört farklı izoterm modeli uygulanmıştır:

Scatchard	$\Delta R_{\text{denge}} / [C] = K_A(\Delta R_{\text{maks}} - \Delta R_{\text{denge}})$
Langmuir	$\Delta R = \{\Delta R_{\text{maks}}[C] / K_D + [C]\}$
Freundlich	$\Delta R = \Delta R_{\text{maks}}[C]^{1/n}$
Langmuir-Freundlich	$\Delta R = \{\Delta R_{\text{maks}}[C]^{1/n} / K_D + [C]^{1/n}\}$

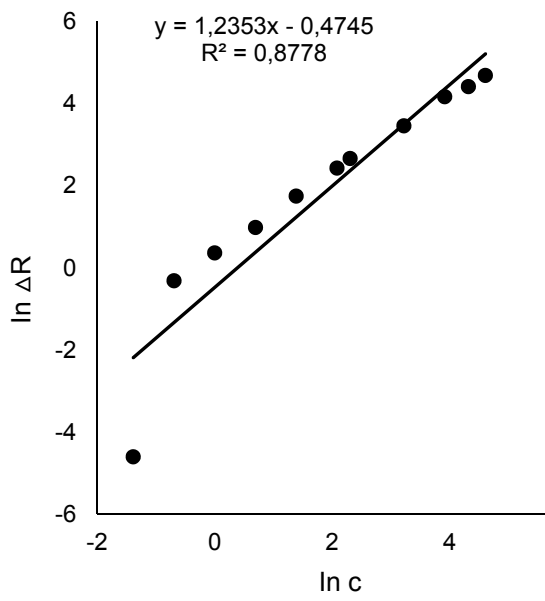
SPR sinyal değişimin hızı: $d\Delta R/dt$, maksimum SPR sinyal kayması: ΔR_{maks} , denge halindeki SPR sinyal kayması: ΔR_{denge} , analit derişimi (ng/mL): C , bağlanma denge sabiti: K_A (ng/mL), ayrışma denge sabiti: K_D (mL/ng), Freundlich yüzey heterojenite indeksi: $1/n$ 'dir.

Adsorpsiyon izotermi, nanosensörlerin hedef molekülünü tanıma ve ayırma kabiliyeti, hedef molekül ile nanosensörün etkileşimi sonucu yüzeyin homojen olup yada olmadığını belirlemek için kullanılmaktadır. Bağlanma kinetik analizi sözde birinci derece adsorplama kinetiği ile ilgili bir yaklaşımdır ve k_a 'nın k_d 'den daha küçük olması durumunda bağlanma hızının ayrışma hızından daha az olduğunu göstermektedir.

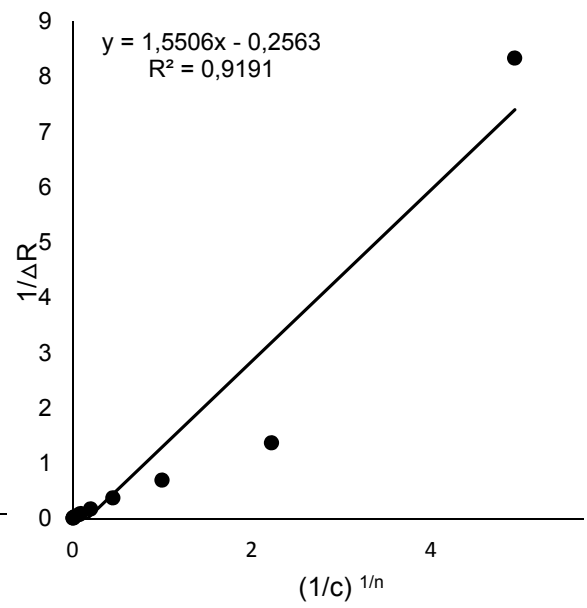
Langmuir izotermde adsorplanan maddenin başlangıç derişimi ile doğru orantılı olarak artarken yüzeyde en yüksek doyma noktasına ulaştığında tek tabaka olarak kaplanarak adsorbe olmuş madde miktarı sabit kalmaktadır. Langmuir izotermde yola çıkılarak bazı varsayımlar yapılarak geliştirilen Freundlich izotermi adsorban yüzeyinde farklı türdeki adsorpsiyon alanlarına sahip olduğundan yüzeyde bulunan adsorpsiyon alanları heterojendir. Langmuir izoterm eşitliğinden farklı olarak, düşük derişimde hem Henry kanunu uygulanamaz hem de dengeden sonra sabit bir adsorplanan madde miktarı değeri elde edilemez (Şekil 4.12).



(a)



(b)



(c)

Şekil 4.12. Adsorpsiyon modelleri; (a) Langmuir, (b) Freundlich, (c) Langmuir-Freundlich.

Çizelge 4.3. Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich parametreleri.

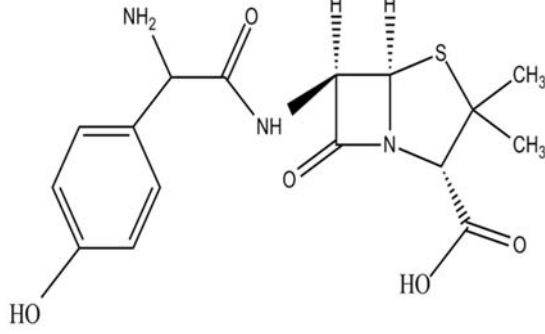
	İncefilm
Langmuir	ΔR_{maks} , ng/mL: 120.48 K_D , mL/ng: 0.0056 K_A , ng/mL: 178.20 R^2 : 0.999
Freundlich	ΔR_{maks} , ng/mL: 1.607 1/n: 1.2353 R^2 : 0.878
Langmuir-Freundlich	ΔR_{maks} , ng/mL: 3.901 1/n: 0.9562 K_D , mL/ng: 6.0499 K_A , ng/mL: 0.1652 R^2 : 0.919

Çizelge 4.3’de korelasyon katsayı (R) değerleri incelendiğinde SPR nanosensör sistemleri ile AMOX arasındaki etkileşimi en iyi Langmuir izotermi modeline uyduğu gözlemlenmiştir. Langmuir izoterminden hesaplanan en yüksek sinyal değeri ΔR_{maks} , 0.999 olarak elde edilmiştir. Bu sonuç, hazırlanan nanosensör yüzeyindeki AMOX bağlanma özellikleri tek tabakalı, eş enerjili en düşük yanıl etkileşime sahip ve homojen dağılımlı olduğunu tespit etmektedir. Her üç izoterm modelinden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3’de verilmiştir.

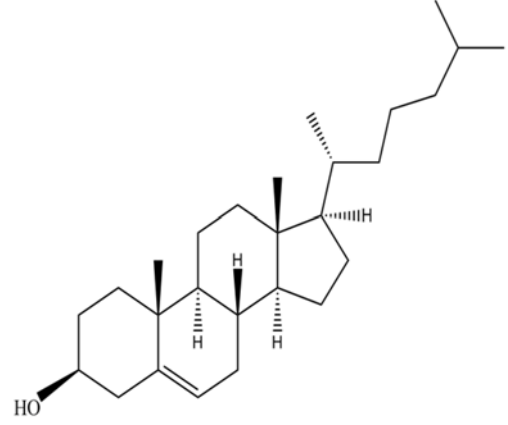
4.1.2.5. Yarışmalı Kinetik Analizler ve Baskılama Seçiciliğinin Belirlenmesi

Hazırlanan AMOX baskılanmış nanosensörün AMOX’e karşı seçiciliğinin belirlenmesi için yarışmalı adsorpsiyon çalışmaları Amoksisilin (AMOX), Ampisilin (AMP), Sefaleksın (CEP) ve kolesterol (KOL) çözeltilerinin kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.13).

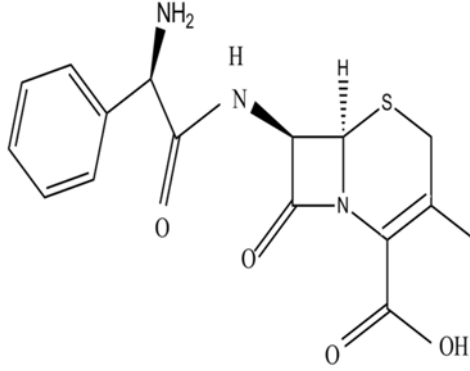
AMOX



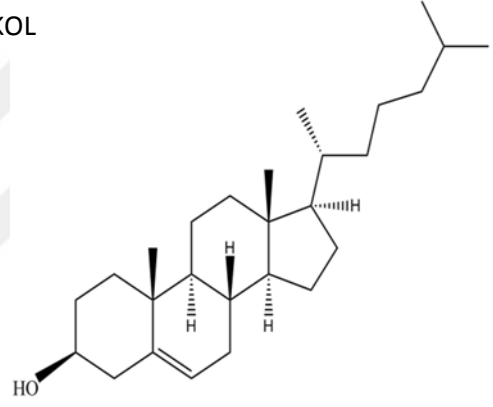
AMP



CEP

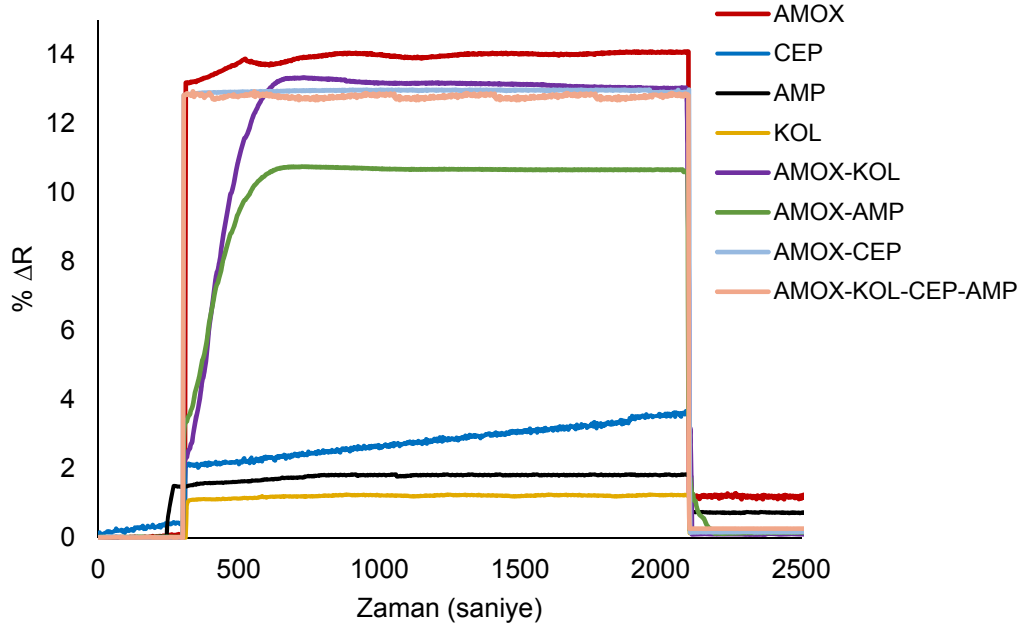


KOL



Şekil 4.13. Yarışmalı adsorpsiyon çalışmaları için kullanılan amoksisilin (AMOX), ampisilin (AMP), sefaleksın (CEP) ve kolesterol (KOL) biyomoleküllerinin molekül şekilleri.

Yarışmalı adsorpsiyon çalışmaları için Amoksisilin-Kolesterol, Amoksisilin-Ampisilin, Amoksisilin-Sefaleksın ve Amoksisilin-Kolesterol-Sefaleksın-Ampisilin karışım çözeltileriyle gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.14'de görüldüğü gibi en yüksek kırılma noktası AMOX baskılanmış SPR nanosensör ile AMOX çözeltisinden en yüksek sinyal cevabı gözlemlenmiştir. Bu, AMOX baskılanmış SPR nanosensörün AMOX molekülüne karşı daha seçici olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.14. Amoksisilin (AMOX), Ampisilin (AMP), Sefaleksim (CEP) ve kolesterol (KOL) çözeltileri ile AMOX baskılanmış SPR nanosensör arasındaki etkileşimlere ait % kırılma-zaman grafikleri.

Ampisilin (AMP), Sefaleksim (CEP) ve kolesterolün (KOL) AMOX molekülerine göre dağılım ve seçicilik katsayıları aşağıdaki eşitliğe göre belirlenmiştir:

$$K_d = [(C_i - C_f)/C_f] \times V/m \quad (4.6)$$

Dağılım katsayısı (mL/g): K_d , biyomoleküllerin başlangıç ve sonuç derişimleri (ng/mL): C_i ve C_f , kullanılan çözelti hacmi (mL): V ve polimerin kütlesi (g): m ifade edilmektedir. Başlangıç ve son derişimleri arasında önemli bir fark gözlenememesi, polimerin kütlesinin kesin olarak belirlenememesi ve derişimin ΔR ile doğrusal tenasüpte olması nedeniyle SPR nanosensör uygulamalarında, derişim ve kütle parametrelerinin dönüştürülmesi gerçekleştirilmektedir.

Bu durumda seçicilik katsayısı,

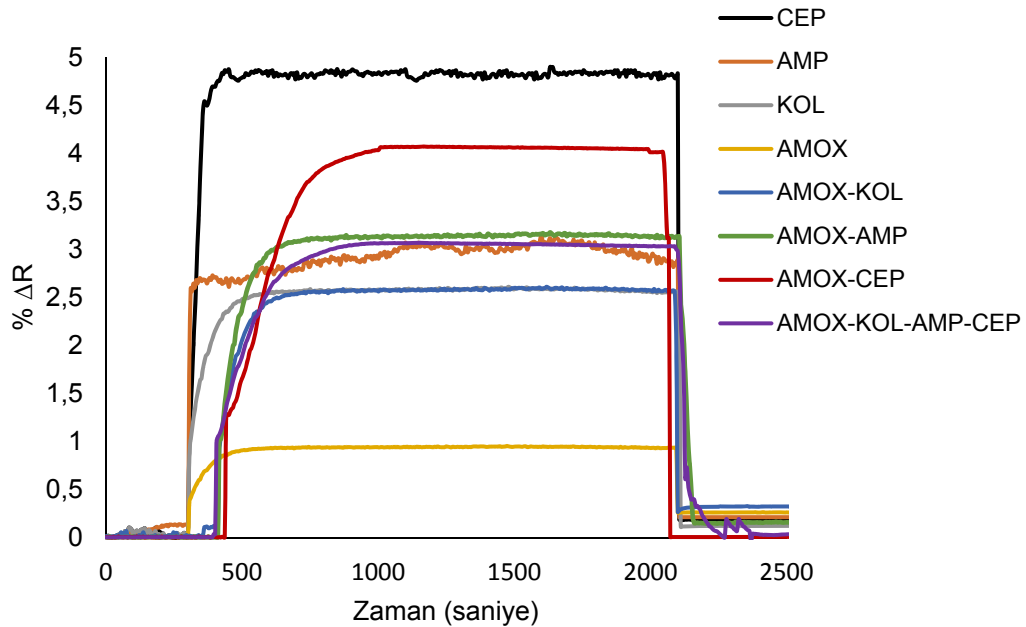
$$k = \Delta R_{\text{kalıp}} / \Delta R_{\text{girişimci}} \quad (4.7)$$

şeklinde kullanılabilir. Baskılama seçiciliğinin belirlenmesi ise;

$$k' = k_{\text{baskılanmış}} / k_{\text{kontrol}} \quad (4.8)$$

şeklinde ifade edilebilir.

Bütün kırılma noktası değerleri, seçicilik kat sayıları çizelge 4.4'de verilmiştir. AMOX baskılanmış PHEMAGA SPR nanosensörün baskılama seçiciliğini göstermek için AMOX baskılanmamış SPR nanosensör hazırlanmıştır (Şekil 4.15). Amoksisilin (AMOX), Ampisilin (AMP), Sefaleksim (CEP) ve kolesterolün (KOL) biyomoleküllerinin kullanılmasıyla oluşturulan karışımlar SPR sistemine verilmiştir. Bu çözeltiler fosfat tamponunda (pH 7.0) 10 ng/mL derişimde hazırlanmışlardır. Ampisilin (AMP), Sefaleksim (CEP) ve kolesterolün (KOL) bulunduğu ortamda daha az ΔR değeri vermesinin sebebi; bu moleküllerin yarışmacı ajan olarak davranıp AMOX'nin bağlandığı bölgelere bağlanmak istemesidir. AMOX baskılanmış ve baskılanmamış SPR nanosensörler karşılaştırıldığında AMOX SPR sinyalinin 14.08'den 0.94'a düştüğü görülmüştür (Çizelge 4.4). Bağlı seçicilik değeri, $k' > 1$ ise baskılama işleminin etkin olduğunu göstermektedir [202].



Şekil 4.15. Amoksisilin (AMOX), Ampicillin (AMP), Sefaleksim (CEP) ve kolesterol (KOL) çözeltileri ile AMOX baskılanmamış SPR nanosensör arasındaki etkileşimlere ait % kırılma-zaman grafikleri.

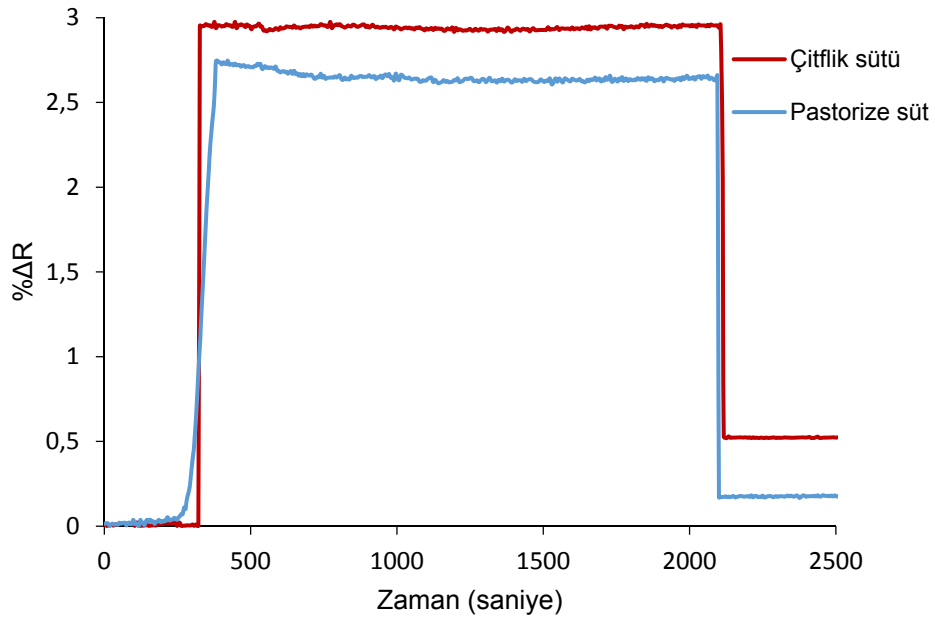
Çizelge 4.4. Seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları.

Biyomolekül	MIP		NIP		k'
	ΔR	K	ΔR	k	
AMOX	14.08	-	0.94	-	-
CEP	3.55	3.966	4.83	0.195	20.338
AMP	1.82	7.736	3.05	0.308	25.117
KOL	1.23	11.447	1.75	0.537	21.317
AMOX-KOL	13.17	1.069	2.59	0.363	2.945
AMOX-AMP	10.66	1.321	3.15	0.298	4.433
AMOX-CEP	12.98	1.085	4.06	0.232	4.677
AMOX-KOL-AMP-CEP	12.82	1.098	3.04	0.309	3.553

4.1.2.6. AMOX Baskılanmış SPR Nanosensör ile Gıdalardan AMOX Tayini
Gıdalardan AMOX tayini için geliştirilen SPR nanosensör sistemlerinin doğruluğunun belirlenebilmesi gerçek gıda kaynaklarından analizler yapılmıştır. SPR nanosensörlerin gıdalardan AMOX tayini için öncelikle çiftlik ve pastörize sütünden AMOX özütü elde edilmiştir. Örneklerin hazırlanması, analitlerin bozunmaya karşı korunması için az ışık altında ve buz üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Gıdalardan AMOX için market ve çiftlik süt örneklerinden AMOX tayini için özüt ve seyreltme işlemleri şu şekilde gerçekleştirilmiştir. Süt örnekleri (2 mL) 18 mL hidroklorik asit ilave edilerek sulu çözeltisi (pH 5.0) hazırlanmış ve 4°C'de 10 dakika boyunca 8000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Üst yağ tabakası alınarak 15 mg tripsin (Merck 24579) ve 15 mg clara-diyastaze (Fluka 27540) ekleyerek 40°C'de 30 dakika hidroliz edilmiştir. Çözelti soğuduktan sonra 10 dakika boyunca 8000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatatın 5 mL'si katı faz ekstraksiyon (SPE, Solid Phase Extraction) kartuşlardan geçirilmiştir. Elde edilen çözeltiliye 2 ng/mL AMOX standart çözeltisinden ilave edilerek SPR nanosensörlere verilmiş ve sensorgramlar alınarak gıdalarda bulunan AMOX miktarları belirlenmiştir [201].

Şekil 4.16'de gösterildiği üzere sisteme ilk olarak dengeleme tamponu olarak pH 7.0 fosfat tamponu verilmiştir. Daha sonra gıda örneklerinden elde edilen gıda özütleri sensör sistemlerine verilerek sensorgramları alınmış ve kırılma indisi değişiklikleri gözlemlenmiştir. Son olarak sisteme desorpsiyon çözeltisi olarak 1.0 M NaCl çözeltisi verilerek bağlanan kalıp molekül sensör yüzeyinden sökülüştür. Sistemden geçirilen gıda örneklerine ait sensorgramlar Şekil 4.16'de verilmiştir. Şekildeki sensorgramlardan elde edilen $\% \Delta R$ değerleri $y=1.2788x+0.3813$ denkleminin yerine konduğunda her gıdaya ait AMOX miktarları hesaplanmıştır.



Şekil 4.16. AMOX baskılanmış SPR nanosensörün çiftlik ve pastörize sütün içindeki AMOX miktarının belirlenmesi.

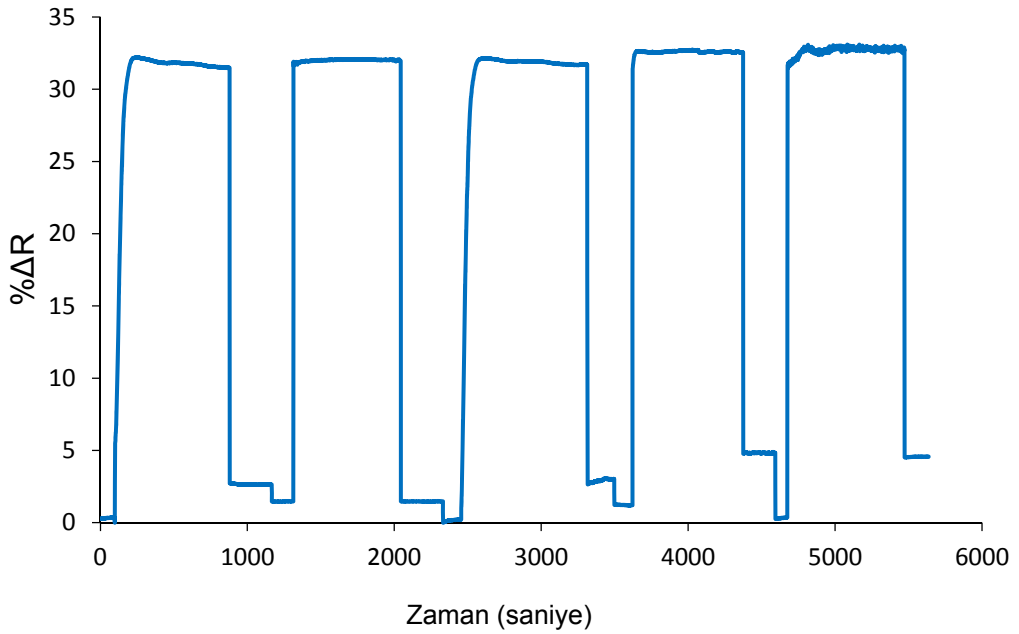
4.1.2.7. SPR Nanosensörlerin Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi

SPR temelli nanosensörlerin en önemli avantajı raf ömürlerinin uzun ve tekrar kullanılabilme gibi avantajlarının yanında tanıma elemanı olarak biyolojik moleküllerin kullanılması durumunda tekrar kullanım sınırlıdır. Çünkü rejenerasyon için kullanılan çözeltiler biyolojik molekülün üç boyutlu yapısını bozarak sensörün tanıma kapasitesini değiştirmekte ve sensör zamanla kullanılamaz hale gelmektedir. Moleküler baskılanmış polimerler ile hazırlanan sensörler ise polimerik yapının sağlamlığı ve çevresel koşullara karşı dayanıklılığı nedeniyle biyomoleküller ile hazırlanan sensörlere göre daha

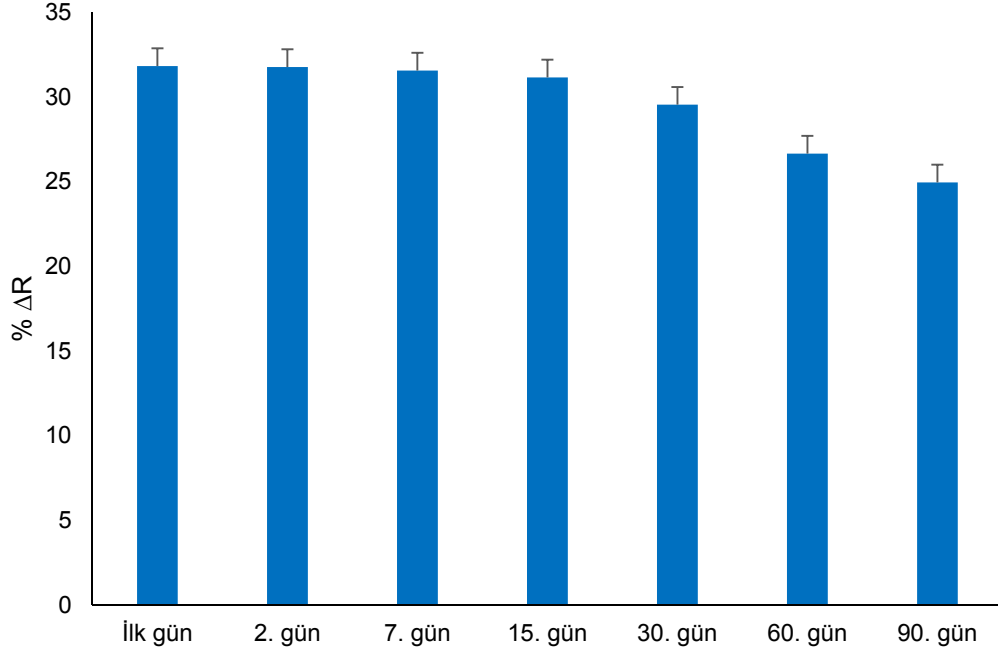
uzun süre tekrar kullanılabilme kapasitesine sahiptir. AMOX baskılanmış SPR nanosensörün tekrar kullanılabilirliğini incelemek amacıyla AMOX çözeltileri 5 kere SPR sistemine verilmiş ve sonuçlar şekil 4.17'de gösterilmiştir.

Nanosensör yüzeyinden 25 ng/mL derişimindeki AMOX çözeltisi AMOX baskılanmış PHEMAGA SPR nanosensörlerden 5 kez ard arda geçirilerek tekrar kullanılabilirliği incelenmiştir. Şekil 4.17'de gösterildiği üzere ilk olarak sistemden pH 7.0 fosfat tamponu geçirilmiştir. Daha sonra 25 ng/mL AMOX çözeltisi ve son olarak da desorpsiyon çözeltisi olarak 1.0 M NaCl çözeltisi sisteme verilmiştir. Aynı işlem 5 kez tekrar edilmiş ve elde edilen sensorgramlardan kırınım indisi Şekil 4.17'de gösterilmiştir. SPR nanosensörlerin verimlilik değeri %97 olarak belirlenmiştir.

AMOX baskılanmış SPR nanosensörler hazırlandıktan sonra farklı zamanlardan da tekrar kullanılabilirlikleri test edilmiştir (Şekil 4.18). 25 ng/mL AMOX varlığında ilk gün ve 90. gün sonrasında farklı zaman aralıklarında tekrar kullanıldıklarında SPR nanosensörlerin verimliliğinde %78 olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, tasarlanan SPR nanosensörlerin tekrar kullanılabilirliğinin yüksek olduğunu ve endüstriyel uygulamalarda kullanılabileceğini göstermiştir.



Şekil 4.17. AMOX baskılanmış SPR nanosensörün aynı gün içindeki tekrar kullanılabilirliğinin gösterildiği % kırılma-zaman grafiği.



Şekil 4.18. AMOX baskılanmış PHEMAGA SPR nanosensörlerin farklı günlerde tekrar kullanılabilirliği.

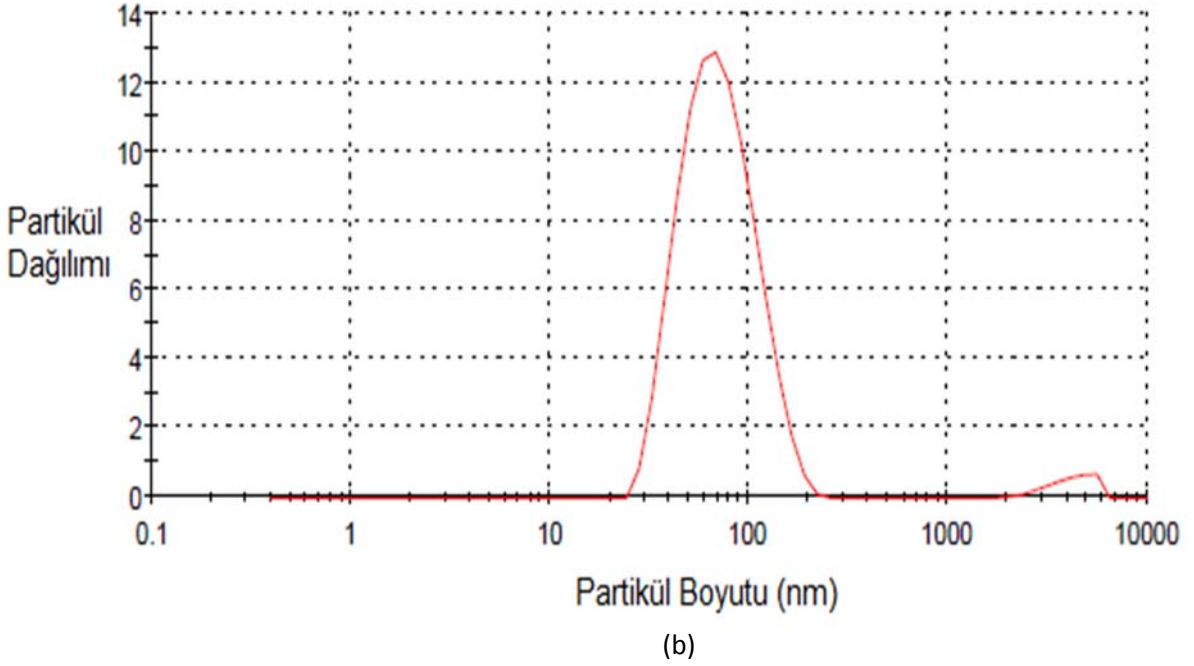
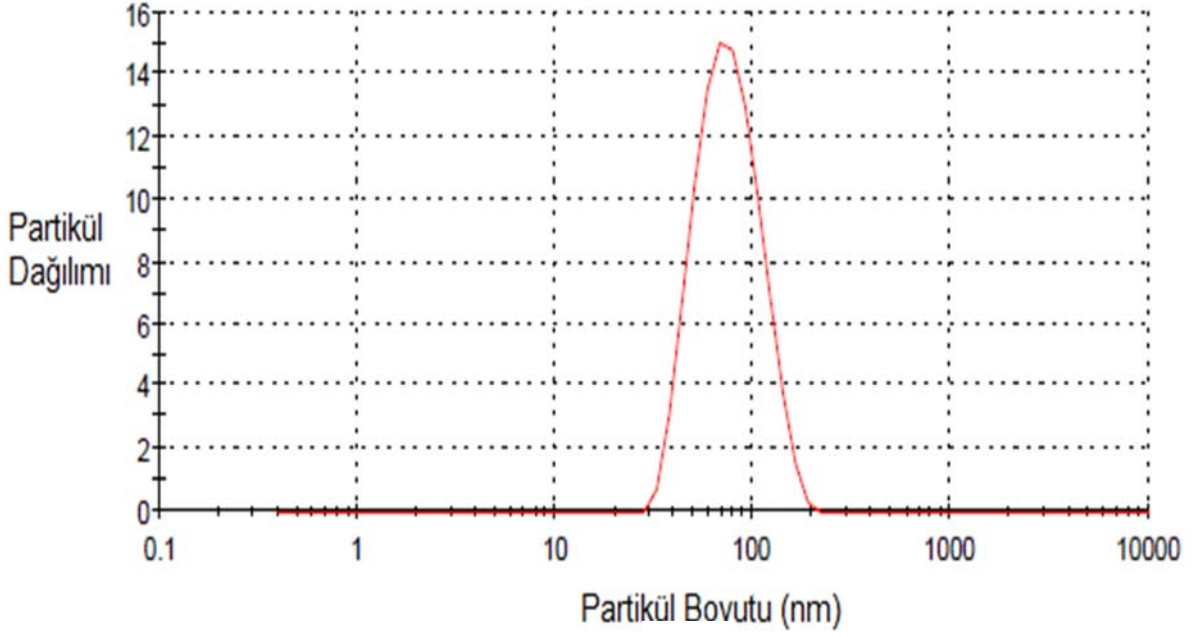
4.2. AMOX Baskılanmış ve Baskılanmamış Nanopartikül SPR Nanosensörler

4.2.1. AMOX Baskılanmış [PHEMAGA-AMOX] ve Baskılanmamış [PHEMAGA] Nanopartikül SPR Nanosensörlerin Karakterizasyonları

AMOX baskılanmış [PHEMAGA-AMOX] ve Baskılanmamış [PHEMAGA] nanopartikül SPR Nanosensörlerin yapısal analizleri için aşağıdaki yöntemler kullanılmıştır.

4.2.1.1. Zeta Boyut Analizi

Şekil 4.19'da AMOX baskılanmış ve baskılanmamış partiküllerin zeta boyut analizi sonuçları verilmiştir. AMOX baskılanmış partiküllerin ortalama boyutu 69.83 nm ve polidispersitesi 0.123 olarak tespit edilmiştir. AMOX baskılanmamış partiküller içinse bu değerler sırasıyla 66.46 nm ve 0.200 olarak bulunmuştur.



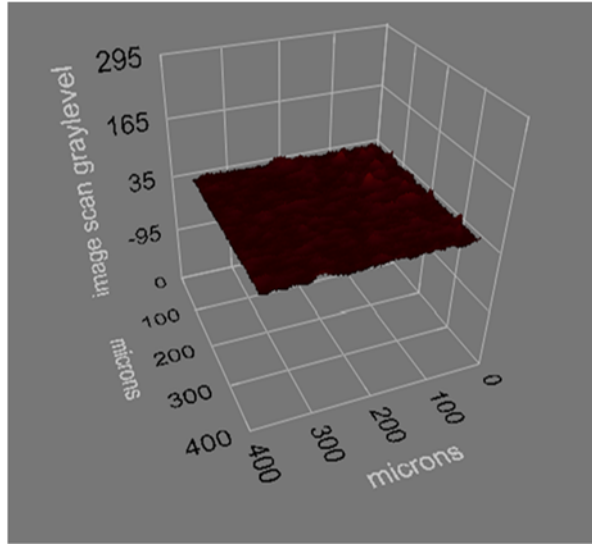
Şekil 4.19. AMOX baskılanmış (a) AMOX baskılanmamış (b) PHEMAGA nanopartiküllerin zeta boyut analizleri.

Polimerizasyon işlemleri sonucunda boyutları birbirine yakın baskılanmış ve baskılanmamış partiküller elde edilmiştir. AMOX baskılanmış nanopartiküllerin boyutlarındaki artış baskılanmanın başarılı olduğunu göstermektedir.

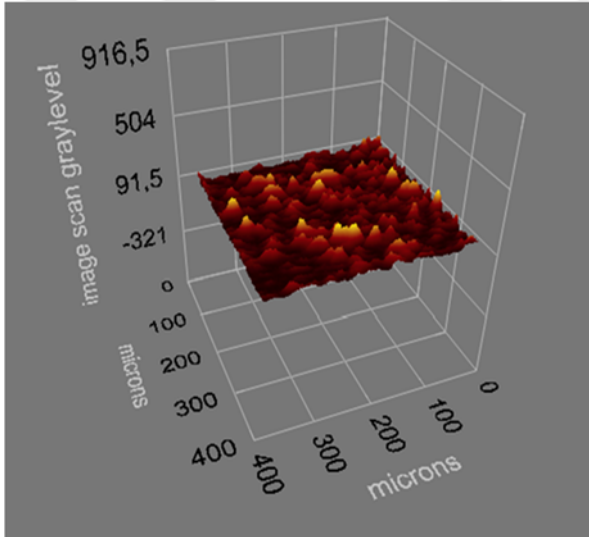
4.2.1.2. Elipsometre Analizi

AMOX baskılanmış ve baskılanmamış PHEMAGA nanopartiküllerin sentezlenmesiyle hazırlanan SPR nanosensörlerin yüzey kalınlıklarını ölçmek için Nanofilm EP3-Nulling Elipsometre (Göttingen, Almanya) kullanılmıştır. Ölçümler SPR nanosensör yüzeylerinde 6 farklı noktada 3 kere tekrarlanarak elde edilen değerlerin ortalaması alınmıştır. Modifiye edilmemiş SPR altın yüzeyin ortalama kalınlığı 62.65 nm, AMOX baskılanmış SPR nanosensörlerin ortalama kalınlığı 73.25 nm ve baskılanmamış SPR nanosensörlerin ortalama kalınlığı 67.30 nm olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.20).

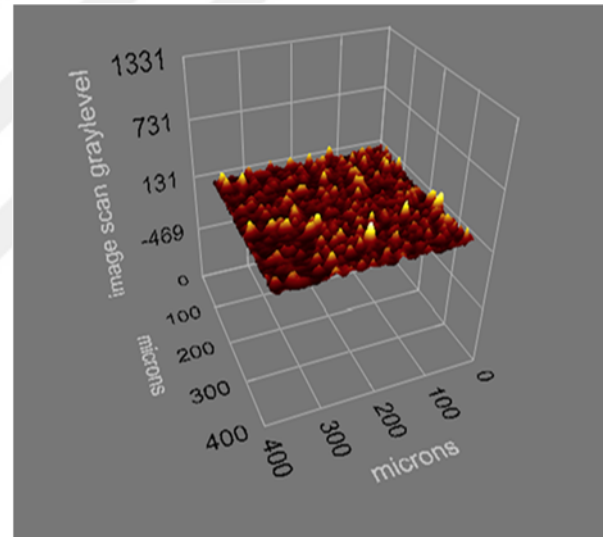




(A)



(B)



(C)

Şekil 4.20. Modifiye edilmemiş (A), AMOX baskılanmış (B) ve baskılanmamış PHEMAGA SPR nanosensörlerin (C) elipsometrik ölçümde alınan 3 boyutlu görüntüleri.

4.2.1.3. Temas Açısı Ölçümleri ve Atomik Kuvvet Mikroskobu Analizi

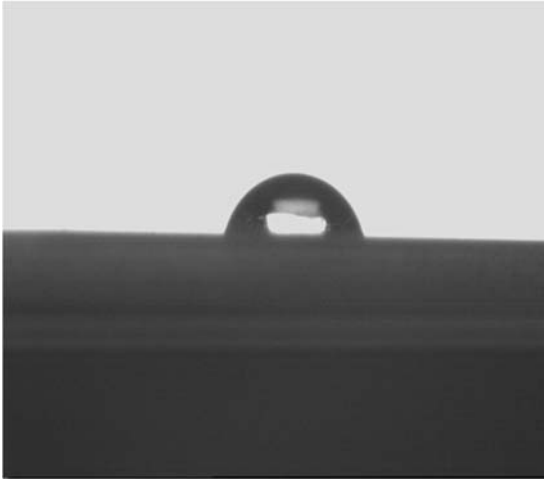
Modifiye edilmemiş, AMOX baskılanmış ve baskılanmamış PHEMAGA nanosensörlerin yüzey karakterizasyonu Krüss DSA100 (Hamburg, Almanya) temas açısı cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Modifiye edilmemiş SPR çip yüzeyinin temas açısı değeri (74.2°), AMOX baskılanmış PHEMAGA SPR nanosensör çip yüzeyinin temas açısı değeri (62.1°)'ye düşmüştür (Çizelge 4.5). AMOX baskılanmamış PHEMAGA SPR nanosensörün temas açısı değeri (58.4°) olarak belirlenmiştir. Yüzeyin temas açısının önemli miktarda azalması, yüzeyin hidrofilik özelliğinin arttığını göstermektedir. MAGA monomerinin hidrofilik karakterde olduğundan dolayı, yüzeye tutturulmasından sonra yüzeyin hidrofilitésinin artmasına ve temas açısı değerinin azalmasına neden olmaktadır. Şekil 4.21'de modifiye edilmemiş altın yüzeyin, AMOX baskılanmış ve baskılanmamış PHEMAGA SPR nanosensörlere ait temas açısı görüntüleri verilmiştir.

Çizelge 4.5. Modifiye edilmemiş, AMOX baskılanmış ve AMOX baskılanmamış PHEMAGA nanopartikül SPR nanosensörlerin yüzey temas açıları.

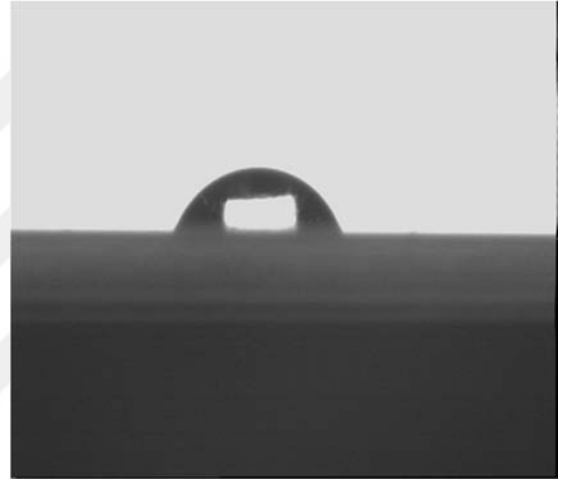
Yüzey	Temas Açısı°
Modifiye edilmemiş altın yüzey	74.2 ± 1.07
AMOX baskılanmış nanosensör yüzeyi	62.1 ± 0.66
AMOX baskılanmamış nanosensör yüzeyi	58.4 ± 0.98



(a)



(b)

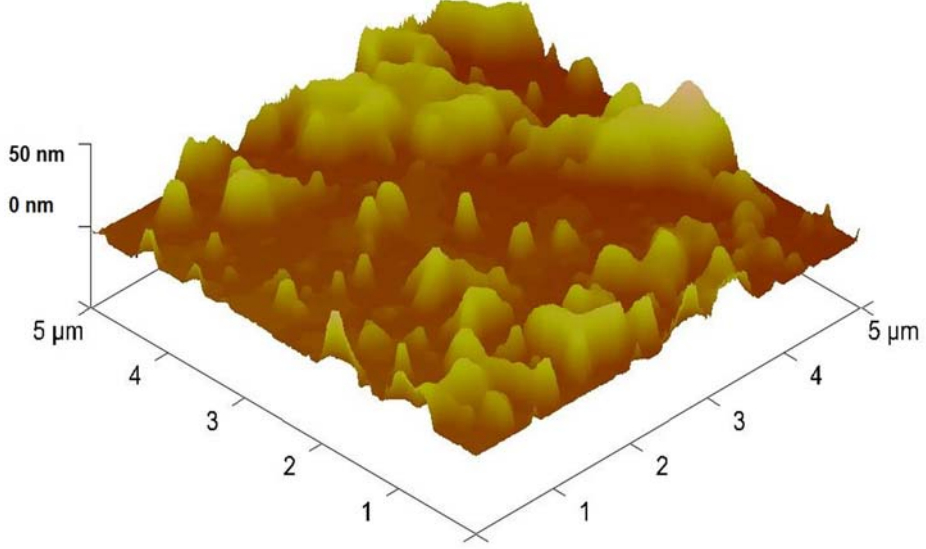


(c)

Şekil 4.21. Su ile temas açısı ölçümleri, Modifiye edilmemiş (a), AMOX baskılanmış (b) ve baskılanmamış PHEMAGA nanopartikül SPR nanosensör (c) yüzeyleri.

Modifiye edilmemiş, allil merkaptan ile modifiye edilmiş ve AMOX baskılanmış PHEMAGA nanopartiküllerin sentezlenmesiyle hazırlanan SPR nanosensör yüzeylerin morfolojik karakterizasyonu AFM ile analiz edilmiştir. AFM ölçümlerinden elde edilen pürüzlülük değerleri modifiye edilmemiş SPR altın yüzey için 4.64 nm, allil merkaptan ile modifiye edilmiş SPR altın yüzey için 5.16 nm ve AMOX baskılanmış PHEMAGA nanopartikül SPR nanosensör için pürüzlülük değeri 50 nm olarak bulunmuştur. Modifiye edilmemiş ve AMOX baskılanmış PHEMAGA SPR nanosensörleri yüzeylerinin pürüzlülük değerleri

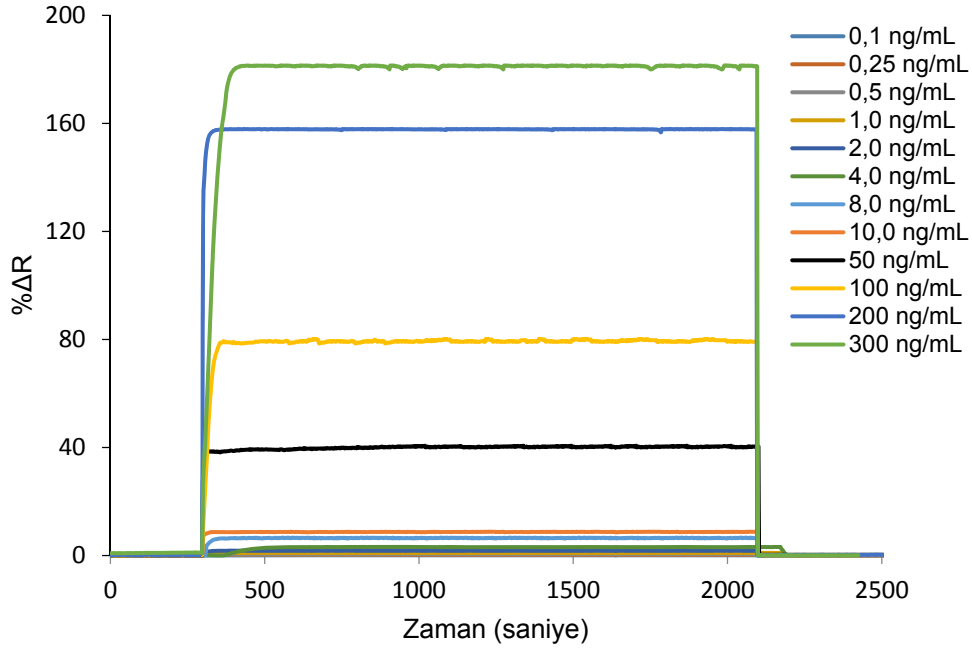
arasındaki farklılık AMOX moleküllerinin SPR nanosensör yüzeylerine başarılı bir şekilde baskılandığını göstermektedir (Şekil 4.22).



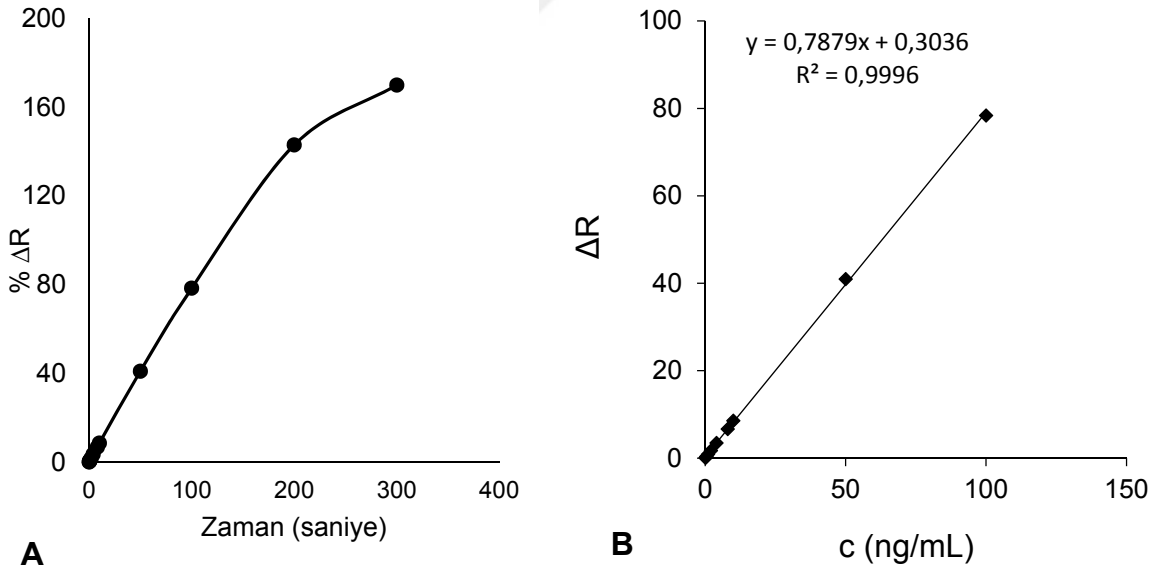
Şekil 4.22. AMOX baskılanmış PHEMAGA nanopartikül SPR nanosensörlerin alınan AFM 3B görüntüleri (5 x 5 μm^2).

4.2.2. Kinetik Analizler

Tez çalışmasının ikinci kısmında AMOX baskılanmış ve baskılanmamış PHEMAGA nanopartiküllerin sentezlenmesiyle SPR nanosensörler hazırlanmıştır. SPR sinyali ile AMOX derişimi arasındaki ilişkinin değerlendirilebilmesi için farklı derişimlerde AMOX çözeltileri (0.1-200 ng/mL) hazırlanmıştır. Farklı derişimlerdeki AMOX çözeltileri SPR nanosensörler ile etkileştirilmiş ve SPRview yazılımı kullanılarak kinetik veriler incelenmiştir. Şekil 4.23'de farklı miktarlarda AMOX içeren çözeltilerin sensogram grafikleri verilmiştir. Şekil 4.23'de farklı derişimlerde AMOX çözeltilerinin nanosensörlere uygulanması ile elde edilen kırılma yüzdesi karşılık zaman grafikleri verilmiştir. Şekil 4.23'de de görüldüğü gibi sensör yüzeyine AMOX uygulanmasıyla birlikte kırılma yüzdesi değeri artmaktadır. Derişimdeki artışla birlikte kırılma yüzdesi değeri artışı daha fazla olduğu görülmektedir.



Şekil 4.23. AMOX çözeltisi ile PHEMAGA nanopartikül ile hazırlanmış SPR nanosensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar.



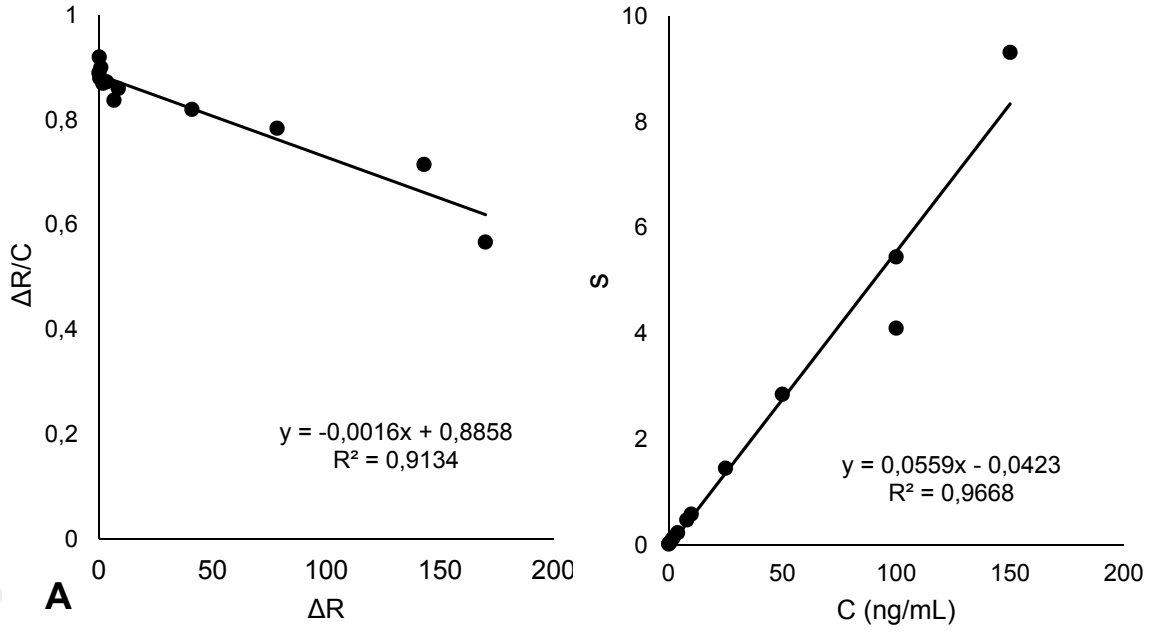
Şekil 4.24. AMOX derişimi ile SPR nanosensör (%ΔR) arasındaki ilişki (A) ve 0.1-100 ng/mL aralığında AMOX derişimi ile SPR nanosensör kalibrasyon grafiği (B).

Şekil 4.24 A'da görüldüğü gibi $\% \Delta R$ değerleri derişim arttıkça artmaktadır. Bu değerler yaklaşık 100 ng/mL de dengeye ulaşmış ve denge değeri SPR: 78.4 olarak belirlenmiştir. Şekil 4.24 B'de görüldüğü gibi SPR nanosensörler için farklı AMOX derişim aralıklarında derişim-sinyal doğrusallığını tespit etmektedir. 0.1-100 ng/mL AMOX derişim aralığındaki veriler değerlendirildiğinde elde edilen derişim- ΔR grafiklerinden $y=0.7879x+0.3036$ denklemi elde edilmiştir. Elde edilen bu grafikten doğrusallık katsayısı ise (R^2) 0.999 olarak bulunmuş ve %99 doğrulukta ölçüm yapabilmektedir.

AMOX baskılanmış PHEMAGA SPR nanosensörlerin kinetik verileri 3s/m denklemi kullanılarak tayin sınırı (LOD) ve tayin limiti (LOQ) değerleri hesaplanmıştır. Bu eşitlikte (s), (ΔR) ve (m) değişkenleri sırayla nanosensör yüzeyinden denge çözeltisi geçerken alınan sinyal değeri, ölçümlere ait standart sapma değeri ve kalibrasyon grafiğinin eğimini göstermektedir. Denge çözelti için R değeri 10 ölçümün ortalaması alınarak, (ΔR) değeri ile birlikte SPR nanosensörler için 0.00094 olarak belirlenmiştir. Buna göre kalibrasyon grafiğine ait yukarıdaki denklem kullanılarak tayin sınırı (LOD) SPR:0.0036 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Tayin limitinin (LOQ) hesaplanması için ise 10s/m eşitliğinden yararlanılmış ve (LOQ) SPR:0.0119 ng/mL olarak belirlenmiştir.

4.2.2.1. Bağlanma Kinetik Analizi ve Denge İzoterm Modelleri

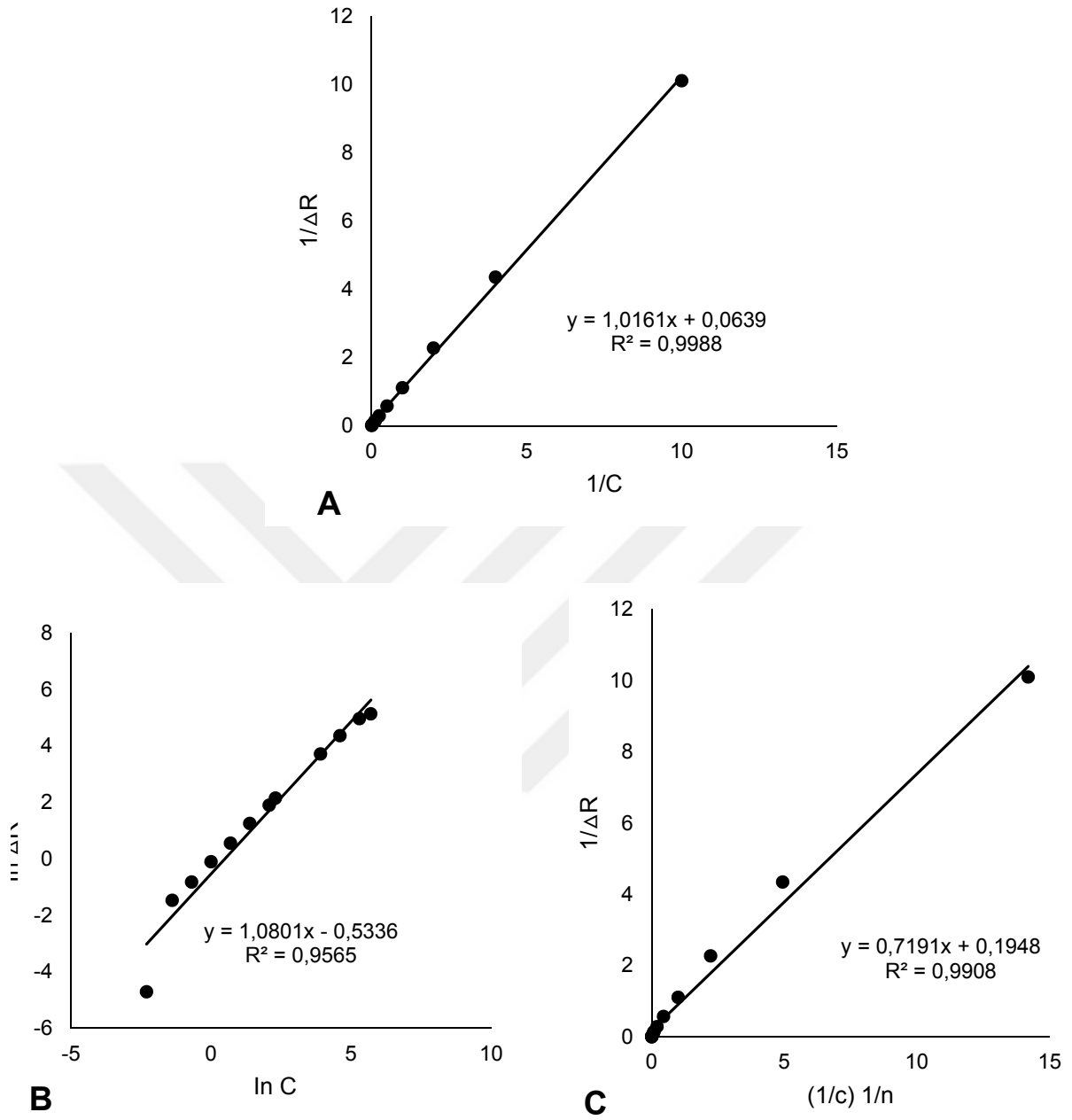
İncefilm bölümünde bahsedildiği gibi AMOX baskılanmış SPR nanosensörlerin AMOX ile arasındaki etkileşimleri bağlanma kinetik ve denge izoterm parametrelerini belirlenmiştir. SPR nanosensörlerin kinetik verileri kullanarak yalancı-birinci derece koşulları altında bağlanma kinetik analizi ve dört farklı denge izoterm modeli olan Scatchard, Langmuir, Freundlich ve Langmuir Freundlich izoterm modeli incelenmiştir. Bağlanma kinetik analizi için çizilen doğrular Şekil 4.25'de ve bu doğrulara ait denklemlerden ΔR_{maks} , K_a , K_d , K_A ve K_D değerleri hesaplanarak Çizelge 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.25. Kinetik hız sabitlerinin belirlenmesi, Denge analiz yaklaşımı (Scatchard) (A), Bağlanma kinetik yaklaşımı (B).

Çizelge 4.6. Kinetik hız sabitleri (nanopartikül).

Denge Analizi (Scatchard)	Bağlanma Kinetik Analizi
ΔR_{maks} : 553.63	k_a , ng/mL.s: 0.0559
K_A , ng/mL: 0.0016	k_d , 1/s : 0.0423
K_D , mL/ng: 625	K_A , ng/mL: 1.322
R^2 : 0.9134	K_D , mL/ng: 0.757
	R^2 : 0.967



Şekil 4.26. Adsorpsiyon modelleri: Langmuir (A), Freundlich (B), Langmuir-Freundlich (C).

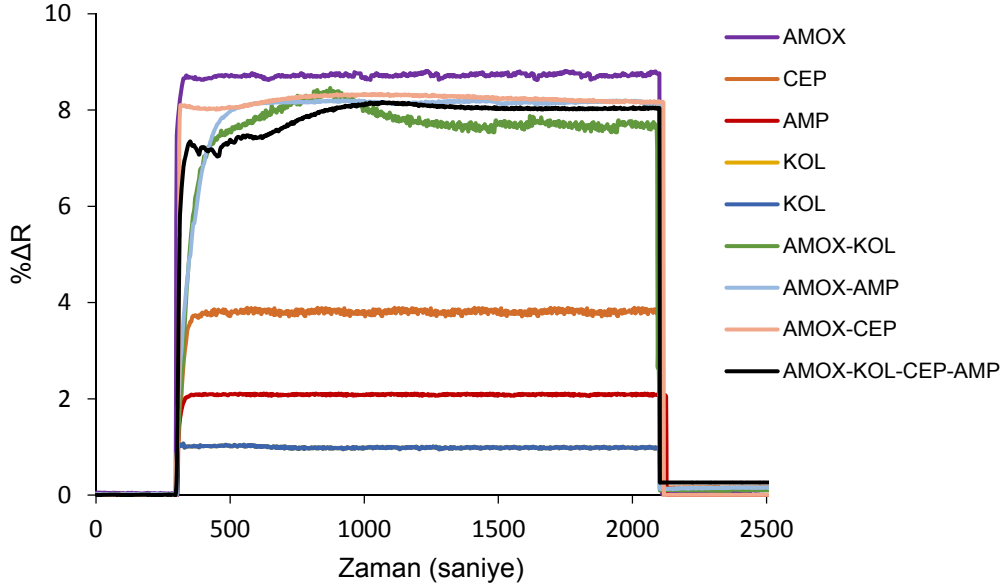
Çizelge 4.7. Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich parametreleri.

Nanopartikül	
Langmuir	ΔR_{maks} , ng/mL: 15.649 K_D , mL/ng: 0.0065 K_A , ng/mL: 15.401 R^2 : 0.999
Freundlich	ΔR_{maks} , ng/mL: 1.705 1/n: 1.0801 R^2 : 0.956
Langmuir-Freundlich	ΔR_{maks} , ng/mL: 5.133 1/n: 1.0801 K_D , mL/ng: 3.691 K_A , ng/mL: 0.271 R^2 : 0.991

AMOX baskılanmış SPR nanosensörleri ile AMOX çözeltisi arasındaki etkileşim modellerini belirlemek için Freundlich, Langmuir ve Langmuir-Freundlich isoterm modelleri uygulanmıştır (Şekil 4.26). Çizelge 4.3'de korelasyon katsayısı (R) değerleri incelendiğinde SPR nanosensör sistemleri ile AMOX arasındaki etkileşimi en iyi Langmuir izotermi modeline uyduğu gözlemlenmiştir. Langmuir izoterminden hesaplanan en yüksek sinyal değeri ΔR_{maks} 0.999 olarak elde edilmiştir. Bu sonuçlar, hazırlanan nanosensör yüzeyindeki AMOX bağlanma özelliklerinin homojen dağılımlı, tek tabakalı, eş enerjili ve en düşük yanıl etkileşimli olduğunu göstermektedir. Her üç izoterm modelinden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.7'de verilmiştir.

4.2.2.2. Yarışmalı Kinetik Analizler ve Baskılama Seçiciliğinin Belirlenmesi

Hazırlanan AMOX baskılanmış nanosensörün AMOX'e karşı seçiciliğinin belirlenmesi için yarışmalı adsorpsiyon çalışmaları Amoksisilin (AMOX), Ampisilin (AMP), Sefalekssin (CEP) ve kolesterol (KOL) biyomoleküllerinin kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir.

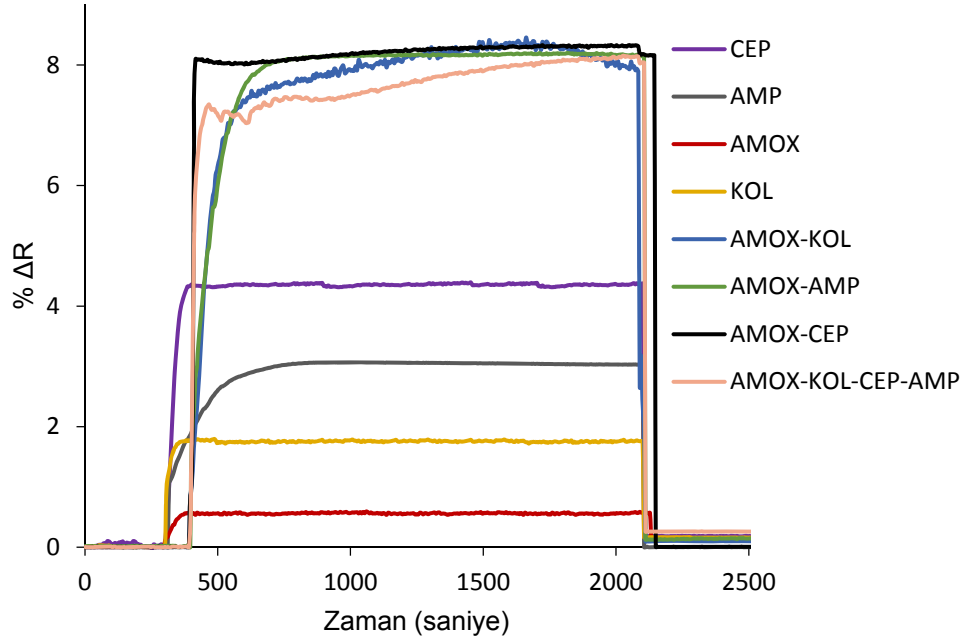


Şekil 4.27. Amoksisilin (AMOX), Ampisilin (AMP), Sefalekssin (CEP) ve kolesterol (KOL) çözeltileri ile AMOX baskılanmış SPR nanosensör arasındaki etkileşimlere ait % kırılma-zaman grafikleri.

Şekil 4.27'de AMOX baskılanmış SPR nanosensörün AMP, CEP ve KOL molekülleriyle spesifik bir etkileşime girmediği ve sinyal vermediği belirlenmiştir. Bu durum AMOX baskılanmış SPR nanosensörün AMOX molekülüne seçici olduğunu göstermektedir. İkili ve üçlü karışımlar dikkate alındığında, AMOX karışımlarının gösterdiği % ΔR kayma değerleri, tekli çözeltilere göre daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bu durum, moleküllerin karışım halinde bir yarışmacı ajan olarak davrandığı ve % ΔR kayma değerinde azalmaya sebep olduğunu göstermektedir.

AMOX baskılanmış PHEMAGA SPR nanosensörün baskılama seçiciliğini göstermek için AMOX baskılanmamış PHEMAGA SPR nanosensörler hazırlanmıştır. Amoksisilin (AMOX), Ampisilin (AMP), Sefalekssin (CEP) ve

kolesterol (KOL) biyomoleküllerinin kullanılmasıyla oluşturulan karışımlar SPR sistemine verilmiştir. Bu çözeltiler fosfat tamponunda (pH 7.0) 10 ng/mL AMOX derişimde hazırlanmıştır. Ampisilin (AMP), Sefaleksın (CEP) ve kolesterolün (KOL) bulunduğu ortamda daha az % ΔR değeri vermesinin sebebi; bu moleküllerin yarışmacı ajan olarak davranıp AMOX'nin bağlandığı bölgelere bağlanmak istemesidir.



Şekil 4.28. Amoksisilin (AMOX), Ampicillin (AMP), Sefaleksin (CEP) ve kolesterol (KOL) çözeltileri ile AMOX baskılanmamış SPR nanosensör arasındaki etkileşimlere ait % kırılma-zaman grafiklerinin karşılaştırılması.

Bütün kırılma noktası değerleri, seçicilik kat sayıları çizelge 4.4'de verilmiştir. AMOX baskılanmış PHEMAGA SPR nanosensörün baskılama seçiciliğini göstermek için AMOX baskılanmamış SPR nanosensör hazırlanmıştır (Şekil 4.28). Ampisilin (AMP), Sefaleksin (CEP) ve kolesterolün (KOL) bulunduğu ortamda daha az % ΔR değeri vermesinin sebebi; bu moleküllerin yarışmacı ajan olarak davranıp AMOX'nin bağlandığı bölgelere bağlanmak istemesidir. AMOX baskılanmış ve baskılanmamış SPR nanosensörler karşılaştırıldığında AMOX SPR sinyalinin 8.795'den 0.567'e düştüğü görülmüştür (Çizelge 4.8). Bağlı seçicilik değeri, $k' > 1$ ise baskılama işleminin etkin olduğunu göstermektedir [202].

Çizelge 4.8. AMOX'e göre Ampicillin (AMP), Sefaleksın (CEP) ve kolesterol (KOL) için seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları.

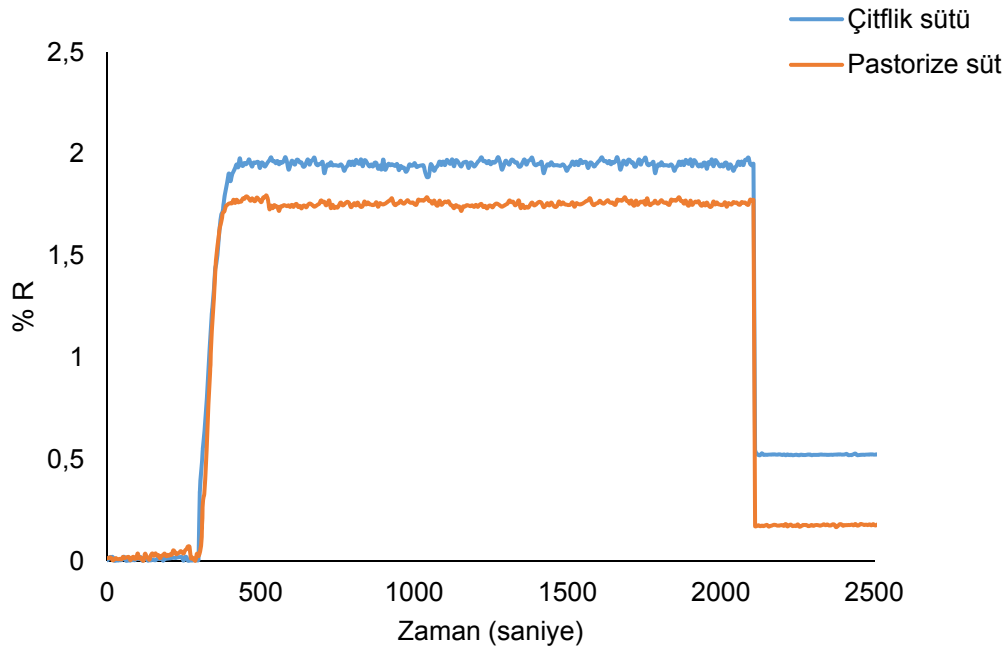
Biyomolekül	MIP		NIP		k'
	ΔR	K	ΔR	k	
AMOX	8.795	-	0.567	-	-
CEP	3.745	2.348	4.357	0.130	18.06
AMP	2.100	4.188	3.052	0.186	22.52
KOL	0.993	8.857	1.768	0.321	27.59
AMOX-AMP	8.179	1.075	8.180	0.069	15.58
AMOX-CEP	8.322	1.057	8.316	0.068	15.54
AMOX-KOL	7.589	1.159	8.384	0.068	17.04
AMOX-KOL-CEP-AMP	8.035	1.095	8.135	0.070	15.64

4.2.3. AMOX Baskılanmış SPR Nanosensör ile Gıdalardan Amoksisilin Tayini

Antibiyotikleri analiz emekteki en önemli nedenlerden biri gıda güvenliğidir. Geri kazanım sonuçları, gıda numunelerinin (süt) geliştirilen yöntemle analiz yapılarak değerlendirilmiştir. Gıdalardan AMOX tayini için geliştirilen SPR nanosensör sistemlerinin doğruluğunun belirlenebilmesi gerçek gıda kaynaklarından analizler yapılmıştır. SPR nanosensörlerin gıdalardan AMOX tayini için öncelikle çiftlik ve pastörize sütünden AMOX özütü elde edilmiştir (Çizelge 4.9). Örneklerin hazırlanması, analitlerin bozunmaya karşı korunması için az ışık altında ve buz üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Gıdalardan AMOX için market ve çiftlik süt örneklerinden AMOX tayini için özüt ve seyreltme işlemleri AMOX baskılanmış incefilm SPR nanosensörler bölümünde anlatılmıştır. Şekil 4.29'de gösterildiği üzere sisteme ilk olarak dengeleme tamponu olarak pH 7.0 fosfat tamponu verilmiştir. Daha sonra gıda örneklerinden elde edilen gıda özütleri sensör sistemlerine verilerek sensorgramları alınmış ve kırılma indisi değişiklikleri gözlemlenmiştir. Son olarak sisteme desorpsiyon çözeltisi olarak 1.0 M NaCl çözeltisi verilerek bağlanan kalıp molekül sensör yüzeyinden sökülmüştür. Sistemden geçirilen gıda örneklerine ait sensorgramlar Şekil 4.29'de verilmiştir. Şekildeki

sensorgramlardan elde edilen $\% \Delta R$ değerleri $y=0.7879x+0.3036$ denkleminin yerine konduğunda her gıdaya ait AMOX miktarları hesaplanmıştır.



Şekil 4.29. AMOX baskılanmış PHEMAGA SPR nanosensörün çiftlik ve pastörize süt içindeki AMOX miktarının belirlenmesi.

Çizelge 4.9. AMOX baskılanmış SPR nanosensörler ile belirlenen gıda örneklerinde bulunan AMOX analiz sonuçları (n=3).

Gıda Örnekleri	Eklenen AMOX Miktarı (ng/mL)	Bulunan AMOX Miktarı (ng/mL)		Geri kazanım (%)	
		İncefilm	Nanopartikül		
Çiftlik Sütü	2.0	1.99	2.11	99.5	105.5
Pastorize Süt	2.0	1.81	1.85	90.5	92.5

Çizelge 4.10. Literatürde gıda örneklerinde AMOX tayinine yönelik kullanılan tekniklerin karşılaştırılması.

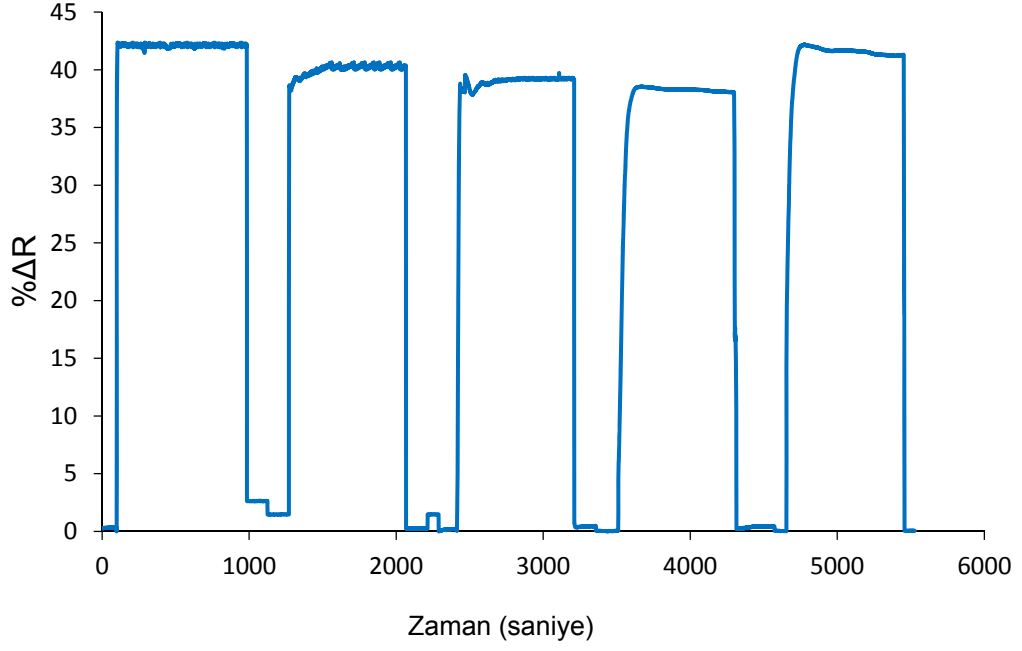
	Kullanılan teknik	Kullanılan limit	Örnek türü	Kaynak
1	Sıvı kromatografi-kütle spektroskopisi (LC-MS)	0.5 µg/kg	İnek Sütü	[203]
2	Yüzey zenginleştirilmiş raman spektroskopisi	1 µg/mL	Hayvansal gıdalar	[204]
3	Sıvı kromatografi-kütle spektroskopisi (LC-MS)	50 µg/kg	İnek eti	[205]
4	Sıvı kromatografi-elektroSPRey iyonlaştırma-kütle spektroskopisi (LC/ESI-MS/MS)	1.7 ng/g 3.5 ng/g 1.5 ng/g 1.7 ng/g	Domuz (böbrek) (Karaciğer) (Et) (Yağ)	[206]
5	Sıvı kromatografi-elektroSPRey iyonlaştırma-kütle spektroskopisi (LC/ESI-MS/MS)	2.3 ng/g 12.0 ng/g 2.2 ng/g 3.1 ng/g	Domuz (böbrek) (Karaciğer) (Et) (Yağ)	[207]
6	Mikrobiyolojik engelleme (Eclipse 100 testi)	7 µg/kg	Koyun sütü	[208]
7	Betastar Combo 3.0 hızlı tahlil tekniği	4 µg/kg	Koyun sütü	[209]
8	Manyetik moleküler baskılanmış polimer ekstraksiyonu ile birleştirilmiş HPLC	1.6-2.8 ng/mL	Süt örneği	[210]
9	Yüksek performanslı sıvı kromatografi-florsans dedektör (HPLC)	1.1-2.4 ng/mL	İnek sütü	[211]
10	Nanosensör	0.022 ng/mL	Yumurta	[212]
11	Ters faz Yüksek performanslı sıvı kromatografi (RP-HPLC)	1.2 µg/kg	Yumurta	[213]

Literatürde gıda örneklerinden AMOX tayinine yönelik kullanılan teknikler çizelge 4.10'de karşılaştırılmıştır. Literatür çalışmaları kıyaslandığında bu çalışmada elde edilen tayin alt limitlerinin diğer çalışmalara göre daha yüksek olduğunu görülmektedir (AMOX baskılanmış incefilm SPR nanosensör için sırasıyla çiftlik ve pastörize sütü için 1.99 ng/mL ve 1.81 ng/mL, AMOX baskılanmış nanopartikül SPR nanosensör içinde sırasıyla 2.11 ng/mL ve 1.85 ng/mL'dir. Bu değerler bu çalışmada hazırlanan AMOX baskılanmış incefilm ve nanopartikül SPR nanosensörlerin AMOX kaşı seçici ve hassas analiz yapılabileceğini göstermektedir.

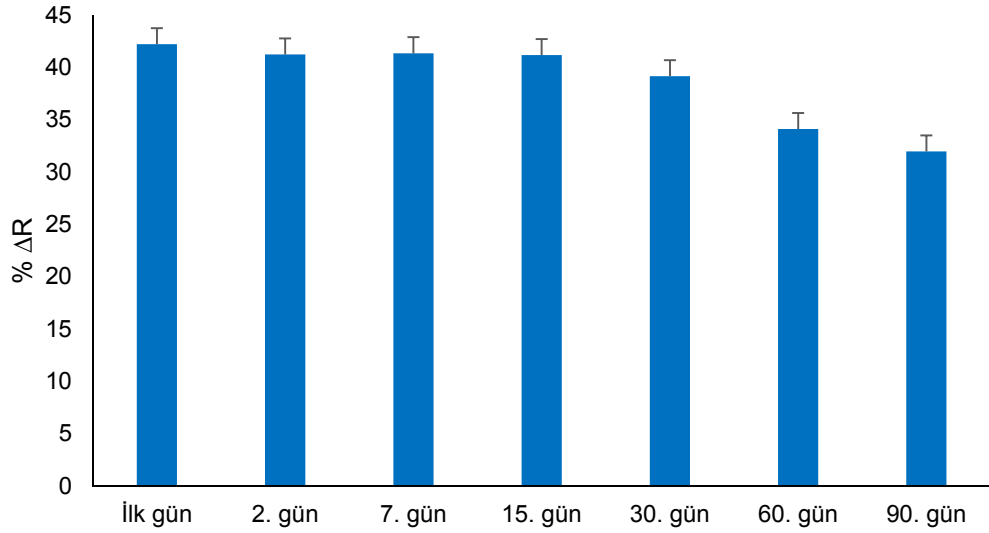
4.2.4. AMOX baskılanmış PHEMAGA SPR nanosensörün tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi

AMOX baskılanmış PHEMAGA SPR nanosensörlerin tekrar kullanılabilirliklerini incelemek amacıyla 50 ng/mL derişiminde AMOX çözeltisi 5 kez ard arda SPR nanosensör sistemlerinden geçirilmiştir. Şekil 4.30'da AMOX baskılanmış PHEMAGA (MIP) SPR nanosensör yüzeyinden sırasıyla 50 ng/mL derişimindeki AMOX çözeltisi ve desorpsiyon çözeltisi (5 kez) ardarda geçirilerek kinetik analiz gerçekleştirilmiştir. Aynı işlemin 5 kez tekrarı ile alınan sensorgramlar % kırılma indisi Şekil 4.30'da gösterilmiştir. Elde edilen sonuç yüzde olarak ifade edilerek 5 kez kullanımdan sonra da SPR nanosensörlerin verimliliği %97 olarak belirlenmiştir.

AMOX baskılanmış nanosensörler hazırlandıktan sonra farklı günlerde de tekrar kullanılabilirlikleri test edilmiştir (Şekil 4.31). 50 ng/mL AMOX varlığında ilk gün ve 90. gün sonrasında da tekrar kullanıldıklarında SPR nanosensörlerin verimliliğinde %75 olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, bize tasarlanan SPR nanosensörlerin tekrar kullanılabilirliğinin yüksek olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.30. AMOX baskılanmış PHEMAGA SPR nanosensörün aynı gün içindeki tekrar kullanılabilirliğin gösterildiği % kırılma-zaman grafiği.



Şekil 4.31. AMOX baskılanmış PHEMAGA SPR nanosensörlerin farklı günlerde tekrar kullanılabilirliği.

5. SONUÇ VE YORUM

5.1. AMOX Baskılanmış (MIP) ve Baskılanmamış PHEMAGA (NIP)

Incefilm SPR Nanosensörlerin Hazırlanması

- N-metakriloil-(L)-glutamik asidin (MAGA) monomer FTIR çalışmaları ile karakterize edilmiştir. MAGA yapısındaki doymuş C-H gerilmesi polimerik yapının spesifik bantları 2969 cm^{-1} , 1680 cm^{-1} 'de karboksil-karbonil gerilmesi, 1111 cm^{-1} 'de karbon-oksijen gerilmesi gözlemlenmiştir.
- AMOX baskılanmış PHEMAGA incefilm SPR nanosensörler sentezlenmiş ve altın yüzeylerinin karakterizasyonu için FTIR-ATR spektrofotometresi kullanılmıştır. AMOX yapısındaki $1684\text{ ve }1740\text{ cm}^{-1}$ 'de C=O gerilmesi, 1513 cm^{-1} 'de C=C gerilmesi, 1684.72 cm^{-1} 'de aromatic halkası (C-H) gerilmesi piki görülmüştür. Ayrıca amin (N-H) gurubunun gerilme piki 3480.1 cm^{-1} görünmektedir. AMOX baskılanma nedeniyle karboksilik (O-H) gurubun pikide 2964.83 cm^{-1} 1245 cm^{-1} 'deki C-C gerilmesi AMOX baskılanmış PHEMAGA incefilme AMOX'in başarılı bir şekilde baskılandığını göstermektedir.
- AMOX baskılanmış ve baskılanmamış PHEMAGA SPR nanosensörlerin ortalama yüzey kalınlığını elipsometre cihazıyla ölçülmüştür. Allil merkaptan ile modifiye edilmemiş SPR nanosensörlerin ortalama kalınlık değeri 62.65 nm , AMOX baskılanmış PHEMAGA SPR nanosensörlerin ortalama kalınlık değeri 72.8 nm ve baskılanmamış PHEMAGA SPR nanosensörlerin ortalama kalınlık değeri 67.4 nm olarak hesaplanmıştır. Elipsometri sonuçlarına göre hazırlanan AMOX baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış PHEMAGA (NIP) nanosensörlerin uygun kalınlık değerine sahip olduğu ve optik transdüser prensibi ile çalışan SPR nanosensör sistemi ile büyük bir uyum göstereceği görülmüştür.
- Modifiye edilmemiş, AMOX baskılanmış ve baskılanmamış PHEMAGA nanosensörlerin yüzey karakterizasyonu için temas açısı cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Modifiye edilmemiş, AMOX baskılanmış ve baskılanmamış PHEMAGA SPR nanosensör yüzeylerinin temas açıları sırasıyla 74.2 ± 1.07 , 62.1 ± 2.13 ve 69.6 ± 0.86 olarak

ölçülmüştür. Yüzeyin temas açısındaki azalma, yüzeyin hidrofilik özelliğinin arttığını göstermektedir. PHEMAGA hidrofilik özelleiklere sahip olduğundan dolayı, yüzeye bağlandıktan sonra yüzeyin hidrofilitesinin artmasına ve temas açısı değerinin azalmasına neden olur.

- Modifiye edilmemiş, allil merkaptan ile modifiye edilmiş, AMOX baskılanmış ve AMOX baskılanmamış SPR nanosensörlerin yüzey morfolojisi yarı temas AFM cihazı ile karakterize edilmiştir. Asidik pirana çözeltisi ile temizlenmiş SPR çipin yüzeyin pürüzlülük değeri 4.64 nm, allil merkaptan ile modifiye edilmiş SPR çip, AMOX baskılanmış SPR nanosensör yüzeylerin pürüzlülük değeri 15.19 nm ve baskılanmamış PHEMAGA nanosensörlerin yüzey pürüzlülük değeri 9.68 nm olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar; AMOX baskılanmış PHEMAGA SPR nanosensörleri yüzeye başarılı bir şekilde tutunduğunu göstermektedir.
- AMOX baskılanmış ve baskılanmamış SPR nanosensörler farklı mol oranlarında MAGA:AMOX (1:1; 4:1; 8:1; 16:1) hazırlanmasından sonra 0.01 ng/mL derişiminde AMOX ile kinetik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. AMOX baskılanmış SPR nanosensörler için baskılanmamış SPR nanosensörlere göre daha yüksek $\% \Delta R$ değerlerinin elde edilmesi amoksisiline özgü bağlanma bölgelerinin oluştuğunun bir göstergesidir. AMOX baskılanmamış PHEMAGA SPR nanosensörlerin yapısında da aynı miktarda fonksiyonel monomerin yer almasına karşın kalıp moleküle özgü bağlanma bölgeleri oluşmadığından elde edilen $\% \Delta R$ değerleri daha düşüktür. Farklı oranlarda MAGA:AMOX içeren polimerizasyon karışımları ile hazırlanan AMOX baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) PHEMAGA nanosensörler ile elde edilen $\% \Delta R$ ve baskılama faktörü ($BF: \% \Delta R_{MIP} / \% \Delta R_{NIP}$) 8:1 mol oranında (MAGA:AMOX) 15.74 olarak belirlenmiş ve tüm analizlerde bu oran kullanılarak SPR nanosensörler hazırlanmıştır.
- Optimum pH değeri belirlemek için pH 4.0-8.0 aralığında ölçümler yapılmış ve maksimum AMOX bağlanması pH 7.0 de gözlenmiştir.
- AMOX baskılanmış ve baskılanmamış PHEMAGA incefilm SPR nanosensörler ile farklı AMOX derişimlerinde (0.25-150 ng/mL) kinetik analizler yapılmıştır. Nanosensör yüzeyine AMOX çözeltisi

uygulanmasında derişimin artmasıyla birlikte % kırılma indisi değeri artmaktadır. Derişimdeki artışla birlikte kırılma indisi değeri artması çözelti ile yüzey arasındaki sürücü güç olan derişim farkının artması gösterilebilir. Elde edilen bu grafikten doğrusallık katsayısı ise (R^2) 0.999 olarak bulunmuş ve %99 doğrulukta ölçüm yapılabilmektedir.

- Hazırlanan AMOX baskılanmış PHEMAGA (MIP) SPR nanosensörler 0.25-50 ng/mL AMOX derişim aralığındaki veriler değerlendirildiğinde elde edilen derişim- ΔR grafiklerinden $y=1.2788x+0.3813$ denklemi elde edilmiştir. Elde edilen bu grafikten doğrusallık katsayısı ise (R^2) 0.999 olarak bulunmuş ve %99 doğrulukta ölçüm yapılabilmektedir.
- AMOX baskılanmış PHEMAGA SPR nanosensörlerin kinetik verileri kullanılarak tayin sınırı (LOD) ve tayin limiti (LOQ) değerleri hesaplanmıştır. Tayin sınırının (LOD) hesaplanması için $3s/m$ denklemi kullanılmıştır. Kör çözelti için R değeri 10 ölçümün ortalaması alınarak, ölçümlere ait standart sapma değeri ile birlikte SPR nanosensörler için 0.00047 olarak belirlenmiştir. Buna göre kalibrasyon grafiğine ait $y=1.2788x+0.3813$ denklem kullanılarak tayin sınırı (LOD) SPR:0.0011 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Tayin limitinin (LOQ) hesaplanması için ise $10s/m$ eşitliğinden yararlanılmış ve tayin limiti SPR:0.0037 ng/mL olarak belirlenmiştir.
- Elde edilen verilerin Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich absorpsiyon modellerine uygunluğu incelenmiştir. Korelasyon katsayı (R) değerleri incelendiğinde SPR nanosensör sistemleri ile AMOX arasındaki etkileşimi en iyi Langmuir izotermi modeline uyduğu gözlemlenmiştir. Langmuir izoterminden hesaplanan en yüksek sinyal değeri ΔR_{maks} , 0.999 olarak elde edilmiştir. Bu sonuç, hazırlanan nanosensör yüzeyindeki AMOX bağlanma özellikleri tek tabakalı, eş enerjili en düşük yanıl etkileşime sahip ve homojen dağılımlı olduğunu göstermektedir.
- Hazırlanan AMOX baskılanmış nanosensörün AMOX'e karşı seçiciliğinin belirlenmesi için yarışmalı adsorpsiyon çalışmaları Amoksisilin (AMOX), Ampisilin (AMP), Sefaleksim (CEP) ve Kolesterol (KOL) çözeltilerinin kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Yarışmalı adsorpsiyon çalışmaları için AMOX-KOL, AMOX-AMP, AMOX-CEP ve

AMOX-KOL-AMP-CEP karışım çözeltileriyle gerçekleştirilmiştir. En yüksek kırılma noktası AMOX baskılanmış SPR nanosensör ile AMOX çözeltisinden en yüksek sinyal cevabı gözlemlenmiştir. AMOX baskılanmış ve baskılanmamış SPR nanosensörler karşılaştırıldığında SPR sinyalinin 14.08'den 0.94'a düştüğü görülmüştür. Bağlı seçicilik değeri, $k' > 1$ ise baskılama işleminin etkin olduğunu göstermektedir.

- Hazırlanan AMOX baskılanmış PHEMAGA (MIP) nanosensörün etkinliği süt örnekleriyle belirlenmiştir. Çiftlik ve pastörize süt örneklerine 2 ng/mL AMOX çözeltisi eklenmiştir. Her bir derişim için elde edilen $\% \Delta R$ değerleri çiftlik ve pastörize sütü için sırasıyla 1.99 ve 1.81 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçların en önemli noktası, süt örneklerinden anitibiyotik tayinin çiftlik ve pastörize sütü için geri kazanım olarak sırasıyla %99.5 ve %90.5 olması SPR nanosensörlerin hassaslığında bir kayıp olmadığı gösterilmiştir.
- AMOX baskılanmış SPR nanosensörün tekrar kullanılabilirliğini incelemek amacıyla 25 ng/mL derişimindeki AMOX çözeltisi AMOX baskılanmış PHEMAGA SPR nanosensörlerden 5 kez ard arda geçirilerek tekrar kullanılabilirliği incelenmiştir. Aynı işlem 5 kez tekrar edilmiş ve SPR nanosensörlerin verimlilik değeri %97 olarak belirlenmiştir. AMOX baskılanmış SPR nanosensörler hazırlandıktan sonra farklı zamanlardan da tekrar kullanılabilirlikleri test edilmiştir. 25 ng/mL AMOX varlığında ilk gün ve 90. gün sonrasında farklı zaman aralıklarında tekrar kullanıldıklarında SPR nanosensörlerin verimliliğinde %78 olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, tasarlanan SPR nanosensörlerin tekrar kullanılabilirliğinin yüksek olduğunu ve endüstriyel uygulamalarda kullanılabileceğini göstermiştir.

5.2. AMOX Baskılanmış (MIP) ve Baskılanmamış PHEMAGA (NIP) Nanopartiküllerin Sentezlenmesiyle Hazırlanan SPR Nanosensörler

- Çalışmanın ikinci kısmında tayini için AMOX baskılanmış PHEMAGA (MIP) ve kontrol deneyleri için AMOX baskılanmamış PHEMAGA (NIP) nanopartiküller iki fazlı miniemülsiyon sentezlendi.

- Sentezlenen AMOX baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış PHEMAGA (NIP) nanopartüküllerin zeta-sizer ile boyut-ölçüm analizi yapılmıştır. AMOX baskılanmış partiküllerin ortalama boyutu 69.83 nm ve polidispersitesi 0.123 olarak bulunmuştur. AMOX baskılanmamış partiküller içinse bu değerler sırasıyla 66.46 nm ve 0.200 olarak bulunmuştur. AMOX baskılanmış nanopartüküllerin boyutlarındaki artış baskılanmanın başarılı olduğunu göstermektedir.
- AMOX baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış PHEMAGA (NIP) SPR nanosensörler temas açısı, atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ve elipsometre ölçümleriyle karakterize edilmiştir. Su ile yapılan temas açısı ölçümlerine bakıldığında görüldüğü gibi, modifiye edilmemiş SPR nanosensör yüzeyinin temas açısı değeri (74.2°), AMOX baskılanmış PHEMAGA SPR nanosensör yüzeyinin temas açısı değeri (62.1°)'ye düşmüştür. AMOX baskılanmamış PHEMAGA SPR nanosensörün temas açısı değeri (58.4°) olarak belirlenmiştir. Yüzeyin temas açısının önemli miktarda azalması, yüzeyin hidrofilik özelliğinin arttığını göstermektedir. MAGA monomerinin hidrofilik karakterde bir malzeme olduğundan dolayı, yüzeye hidrofilik bir polimerin tutturulması yüzey hidrofilitasını arttırmış ve temas açısı değerini düşürmüştür.
- Modifiye edilmemiş, allil merkaptan ile modifiye edilmiş ve AMOX baskılanmış PHEMAGA nanopartüküllerin sentezlenmesiyle hazırlanan SPR nanosensör yüzeylerin morfolojik karakterizasyonu AFM ile analiz edilmiştir, SPR altın yüzey için 4.64 nm, allil merkaptan ile modifiye edilmiş SPR altın yüzey için 5.16 nm ve AMOX baskılanmış PHEMAGA nanopartikül SPR nanosensör için pürüzlülük değeri 50 nm olarak bulunmuştur. Modifiye edilmemiş ve AMOX baskılanmış PHEMAGA SPR nanosensörleri yüzeylerinin pürüzlülük değerleri arasındaki farklılık AMOX moleküllerinin SPR nanosensör yüzeylerine başarılı bir şekilde baskılandığını göstermektedir.
- Elipsometri sonuçlarına göre modifiye edilmemiş SPR altın yüzeyin ortalama kalınlığı 62.65 nm, AMOX baskılanmış SPR nanosensörlerin ortalama kalınlığı 73.25 nm ve baskılanmamış SPR nanosensörlerin ortalama kalınlığı 67.30 nm olarak hesaplanmıştır. Nanosensör filmlerinin kalınlığı uygun kalınlık değerine sahip olduğu ve optik

transdüser prensibi ile çalışan SPR sistemi ile büyük bir uyum göstereceği görülmüştür.

- AMOX baskılanmış ve baskılanmamış PHEMAGA nanopartiküllerin sentezlenmesiyle hazırlanan SPR nanosensörler farklı AMOX derişiminde çözeltiler (0.1-200 ng/mL) hazırlanmıştır. 0.1-100 ng/mL AMOX derişim aralığındaki veriler değerlendirildiğinde elde edilen derişim- ΔR grafiklerinden $y=0.7879x+0.3036$ denklemi elde edilmiştir. Elde edilen bu grafikten doğrusallık katsayısı ise (R^2) 0.999 olarak bulunmuş ve %99 doğrulukta ölçüm yapabilmektedir.
- AMOX baskılanmış PHEMAGA SPR nanosensörlerin kinetik verileri $3s/m$ denklemi ile kullanılarak tayin sınırı (LOD) ve tayin limiti (LOQ) değerleri hesaplanmıştır. Denge çözelti için R değeri 10 ölçümün ortalaması alınarak, ölçümlere ait standart sapma değeri ile birlikte SPR nanosensörler için 0.00094 olarak belirlenmiştir. Buna göre kalibrasyon grafiğine ait $y=0.7879x+0.3036$ denklemi kullanılarak tayin sınırı (LOD) SPR:0.0036 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Tayin limitinin (LOQ) hesaplanması için ise $10s/m$ eşitliğinden yararlanılmış ve tayin limiti SPR:0.0119 ng/mL olarak belirlenmiştir.
- AMOX baskılanmış SPR nanosensörleri ile AMOX çözeltisi arasındaki etkileşim modellerini belirlemek için Freundlich, Langmuir ve Langmuir-Freundlich isotherm modelleri uygulanmıştır. Korelasyon katsayısı (R) değerleri incelendiğinde SPR nanosensör sistemleri ile AMOX arasındaki etkileşimi en iyi Langmuir izotermi modeline uyduğu gözlemlenmiştir. Langmuir izoterminden hesaplanan en yüksek sinyal değeri ΔR_{maks} 0.999 olarak elde edilmiştir. Bu sonuçlar, hazırlanan nanosensör yüzeyindeki AMOX bağlanma özelliklerinin homojen dağılımlı, tek tabakalı, eş enerjili ve en düşük yanıl etkileşimli olduğunu göstermektedir.
- AMOX baskılanmış PHEMAGA SPR nanosensörün baskılama seçiciliğini göstermek için AMOX baskılanmamış SPR nanosensör hazırlanmıştır. Ampisilin (AMP), Sefaleksın (CEP) ve kolesterolün (KOL) bulunduğu ortamda daha az % ΔR değeri vermesinin sebebi; bu moleküllerin yarışmacı ajan olarak davranıp AMOX'nin bağlandığı bölgelere bağlanmak istemesidir. AMOX baskılanmış ve baskılanmamış

SPR nanosensörler karşılaştırıldığında AMOX SPR sinyalinin 8.795'den 0.567'e düştüğü görülmüştür. Bağlı seçicilik değeri, $k' > 1$ ise baskılama işleminin etkin olduğunu göstermektedir.

- Hazırlanan AMOX baskılanmış PHEMAGA (MIP) nanosensörün etkinliği süt örnekleriyle belirlenmiştir. Çiftlik ve pastörize süt örneklerine 2 ng/mL AMOX çözeltisi eklenmiştir. Her bir derişim için elde edilen $\% \Delta R$ değerleri çiftlik ve pastörize sütü için sırasıyla 2.11 ve 1.85 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçların en önemli noktası, süt örneklerinden anitibiyotik tayinin çiftlik ve pastörize sütü için geri kazanım olarak sırasıyla %105.5 ve %92.5 olması SPR nanosensörlerin hassaslığında bir kayıp olmadığı gösterilmiştir.
- AMOX baskılanmış SPR nanosensörün tekrar kullanılabilirliğini incelemek amacıyla 50 ng/mL derişimindeki AMOX çözeltisi AMOX baskılanmış PHEMAGA SPR nanosensörlerden 5 kez ard arda geçirilerek tekrar kullanılabilirliği incelenmiştir. Aynı işlem 5 kez tekrar edilmiş ve SPR nanosensörlerin verimlilik değeri %97 olarak belirlenmiştir. AMOX baskılanmış SPR nanosensörler hazırlandıktan sonra farklı zamanlardan da tekrar kullanılabilirlikleri test edilmiştir. 50 ng/mL AMOX varlığında ilk gün ve 90. gün sonrasında farklı zaman aralıklarında tekrar kullanıldıklarında SPR nanosensörlerin verimliliğinde %75 olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, tasarlanan SPR nanosensörlerin tekrar kullanılabilirliğinin yüksek olduğunu ve endüstriyel uygulamalarda kullanılabileceğini göstermiştir.
- Moleküler baskılama yöntemiyle hazırlanan incefilm SPR nanosensörler için 0.25-150 ng/mL ve nanopartikül SPR nanosensörler içinde 0.1-300 ng/mL AMOX derişim aralığında süt örneklerinden AMOX tayininde başarılı bir şekilde düşük tayin alt limitlerine inilebileceği gösterilmektedir. Elde edilen analiz sonuçları ile moleküler baskılama yöntemiyle hazırlanan SPR nanosensörler ile gıdalardan AMOX tayininin, seçici, duyarlı, herhangi bir işaretlemeye ihtiyaç duymadan, diğer yöntemlere göre, düşük maliyet, hızlı ve gerçek zamanlı analiz yapabileceği gösterilmekte ve hazırlanan SPR nanosensörlerin avantajlarının literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Martins-Junior, H.A., Kussumi, T.A., Wang, A.Y., Lebre, D.T., A rapid method to determine antibiotic residues in milk using liquid chromatography coupled to electroSPRay tandem mass spectrometry, *J. Braz. Chem. Soc*, 18, 397-405, **2007**.
- [2] Tan, S.Y., Tatsumura, Y., Alexander Fleming (1881–1955): discoverer of penicillin, *Singapore Medical Journal*, 56, 366–367, **2015**.
- [3] Williams, KJ., The introduction of 'chemotherapy' using arsphenamine – the first magic bullet, *J R Soc Med*, 102, 343–348, **2009**.
- [4] Leekha, S., Terrell, C.L., Edson, R.S., General principles of antimicrobial therapy, *Mayo Clinic Proceedings*, 86, 156–167, **2011**.
- [5] Levy, S.B., Balancing the drug-resistance equation, *Trends Microbiology*, 2, 341–342, **1994**.
- [6] Witte, W., International dissemination of antibiotic resistant strains of bacterial pathogens, *Infection Genetics Evolution*, 4, 187–191, **2004**.
- [7] Booth, N.H., Toxicology of drug and chemical residues. Veterinary Pharmacology and Therapeutics, *Iowa State University Press, Ames Iowa*, 1149-1205, **1998**.
- [8] Fang, L.S.T., Tolckoff-Rubin, N.E., Rubin, R.H., Engl, N., Efficacy of single-dose and conventional AMOXicillin therapy in urinary tract infection localized by the antibody-coated bacteria technic, *The new England Journal of medicine*, 298, 413-416, **1978**.
- [9] P.R. Murray, H.F. Cantrell, R.B. Lankford., Multicenter evaluation of the in vitro activity of piperacillin-tazobactam compared with eleven selected β -lactam antibiotics and ciprofloxacin against more than 42,000 aerobic gram-positive and gram-negative bacteria., *Diagnostic Microbiology Infectious Disease*, 19, 111-120, **1994**.
- [10] Cunha, B.A., Antibiotic side effects, *Medical Clinics of North America*, 85, 149-185, **2001**.
- [11] Geddes, A.M., Klugman, K.P., Rolinson, G.N., Introduction: historical perspective and development of AMOXicillin/clavulanate, *International Journal of Antimicrobial Agents*. 30, S109–S112, **2007**.

- [12] Reeves, D.S., Bullock, D.W., *Journal of Infection*, 7, 425 – 433, **1979**.
- [13] Cundiff, J., Joe, S., AMOXicillin-clavulanic acid-induced hepatitis, *American Journal of Otolaryngology*, 28, 28–30, **2007**.
- [14] R, Baselt., *Disposition of toxic drugs and chemicals in man*, 8.baskı, Biomedical Publications, Foster City, 81–83, **2008**.
- [15] Grant, A., Briggs, A.D Use of ivermectin in marine fish farms: some concerns. Marine pollution bulletin, *Marine Pollution Bulltine* 36, 566–568, **1998**.
- [16] Silva., M.A., Ferreira, M.H., Braga, J.W., Sena, M.M., Development and analytical validation of a multivariate calibration method for determination of AMOXicillin in suspension formulations by near infrared spectroscopy, *Talanta*, 89, 342-351, **2012**.
- [17] Ji, W., Wang, L., Qian, H., Yao, W., Quantitative analysis of AMOXicillin residues in foods by surface-enhanced raman spectroscopy, *Spectroscopy Letters*, 47, 451-457, **2014**.
- [18] Li, H., Xia, X., Xue, Y., Tang, S., Xiao, X., Li, J., Shen, J., Simultaneous determination of AMOXicillin and prednisolone in bovine milk using ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 900, 59-63, **2012**.
- [19] Lugoboni, B., Gazzotti, T., Zironi, E., Barbarossa, A., Pagliuca, G., Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for quantitative determination of AMOXicillin in bovine muscle, *Journal of Chromatography B*, 879, 1980-1986, **2011**.
- [20] Pérez-Lozano, P., García-Montoya, E., Orriols, A., Miñarro, M., Ticó, J.r., Suñé-Negre, J.M., Stability evaluation of AMOXicillin in a solid premix veterinary formulation by monitoring the degradation products through a new HPLC analytical method, *Journal Of Pharmaceut. Biomed*, 42, 192–199, **2006**.
- [21] Kumar, A.S., Sornambikai, S., Deepika, L., Zen, J.M., Highly selective immobilization of AMOXicillin antibiotic on carbon nanotube modified electrodes and its antibacterial activity, *Journal of Material Chemistry*. 20, 10152-10158, **2010**.
- [22] Rezaei, B., Damiri, S., Electrochemistry and adsorptive stripping voltammetric determination of AMOXicillin on a multiwalled carbon

- nanotubes modified glassy carbon electrode, *Electroanalysis*, 21, 1577-1586, **2009**.
- [23] Arnold, M.A., Meyerhoff, M.E., Recent Advances in the Development and Analytical Applications of Biosensing Probes, *Critical Reviews Of Analytic. Chemistry*, 20,149–196,**1988**.
- [24] Belkin, S., Microbial whole-cell sensing systems of environmental pollutants, *Current Opinion in Microbiology*, 6, 206–212, **2003**.
- [25] Eggins, B.R., *Chemical Sensors and Biosensors*. John Wiley, Chichester, **2002**.
- [26] Wilson, G.S., Gifford, R., Biosensors for real-time in vivo measurements *Biosens, Bioelectron*, 20, 2388–2403, **2005**.
- [27] Wilson, J.S., *Sensor Technology Handbook*, Elsevier, Amsterdam/Boston. **2005**.
- [28] Schubert, F., Wollenberger, U., Scheller, F.W., Müller, H.G., Artificially Coupled Reactions with Immobilized Enzymes: Biological Analogs and Technical Consequences, *Bioinstrumentation and Biosensors*, Wise, D.L., New York, **1991**
- [29] Sassolas, A., Blum, L.J., Leca-Bouvier B.D., Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors, *Biotechnology Advances* 30,489-571, **2011**.
- [30] Nambiar, S., Yeow, J.T.W., Conductive polymer-based sensors for biomedical applications, *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 1825–1832, **2011**.
- [31] Amine, A., Mohammadi, H., Bourais, I., Palleschi, G., Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 1405–1423, **2006**.
- [32] Karyakin, A.A., Ulasova, E.A., Vagin, M.Yu., Karyakina, E.E., *Sensor*, 1, 16–24. **2002**.
- [33] Shruthi, GS., Amitha, C.V., Mathew, B.B., Biosensors: a modern day achievement, *Journal of Instrumentation Technology*, 2, 26-39. **2014**.
- [34] Homola, J., Present and future of surface plasmon resonance biosensors, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377, 528—539, **2003**.

- [35] Yan, H., Row, K.H., Characteristic and Synthetic Approach of Molecularly Imprinted Polymer, *International Journal Of Molecular Science*, 7, 155–178, **2006**.
- [36] Whitcombe, M.J., Kirsch, N., Nicholls, I.A., Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years 2004–2011, *Journal Of Molecular Recognition*, , 27, 297–401, **2014**.
- [37] Kryscio, D.R., Peppas, N.A., Critical review and perspective of macromolecularly imprinted polymers, *Acta Biomaterilia*, 8, 461–473, **2012**.
- [38] Chen, L., Xu, S., Li, J., Recent advances in molecular imprinting technology: current status, challenges and highlighted applications, *Chemical Society Reviews*, 40, 2922–2942, **2011**.
- [39] Aminov, R.I., A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future, *Frontiers in Microbiology*, 1, 134, **2010**.
- [40] Kempe, M., Verachtert, B., *Cartridges with molecularly imprinted recognition elements for antibiotic residues monitoring in milk cream pure and applied biochemistry*, *Lunds University Centre for Chemistry and Chemical Engineering Getingevagen*, Lund, Sweden, 1-10, **2000**.
- [41] Rollins, KE., Varadhan, K.K., Neal, K.R., Lobo, D.N., *World journal of surgery*, **2016**.
- [42] Flowers, C. R., Seidenfeld, J, Bow, E. J., Karten, C., Gleason, C., Hawley, D K., Kuderer, N. M., Langston, A. A., Marr, K. A., Antimicrobial prophylaxis and outpatient management of fever and neutropenia in adults treated for malignancy: american society of clinical oncology clinical practice guideline, *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 31, 794–810, **2013**.
- [43] Pangilinan, R., Tice, A., Tillotson, G., Topical antibiotic treatment for uncomplicated skin and skin structure infections: review of the literature, *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 7, 957–965, **2009**.
- [44] Lipsky, B. A., Hoey, C., Topical Antimicrobial Therapy for Treating Chronic Wounds, *Clinical Infectious Diseases*, 49, 1541–1549, **2009**.
- [45] Finberg, R.W., Moellering, R.C., Tally F.P., Craig, W.E., Pankey, G.A., Dellinger, E.P., West. M.A., Joshi, M., Linden, P.K., Rolston, K.V., Rotschafer, J.C., Rybak, M.J., The Importance of Bactericidal Drugs:

- Future Directions in Infectious Disease, *Clinical Infectious Disease*, 39, 1314–1320, **2004**.
- [46] Nussbaum, F., Brands, M., Hinzen, B., Weigand, S., Häbich, D., Antibacterial natural products in medicinal chemistry—exodus or revival?, *Angewandte Chemie International Edition*, 45, 5072–5129, **2006**.
- [47] Dougherty, T.J., Pucci, M.J., *Antibiotic Discovery and Development*. SPRinger, 800, **2011**.
- [48] William Andrew Publishing., *Pharmaceutical Manufacturing Encyclopedia*, 3. Baskı, Elsevier Science, 305, **2013**.
- [49] Luria, S.E., Delbrück, M., Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance, *Genetics*, 28, 491–511, **1943**.
- [50] Topp, E., Chapman, R., Devers-Lamrani, M., Hartmann, A., Marti, R., Martin-Laurent, F., Sabourin, L., Scott, A., Sumarah, M., Accelerated biodegradation of veterinary antibiotics in agricultural soil following long-term exposure, and isolation of a sulfamethazine-degrading sp, *Journal Of Environmental Quality*, 42, 173–178, **2013**.
- [51] Andersson, D.I., The biological cost of mutational antibiotic resistance: any practical conclusions?, *Current Opinion in Microbiology*, 9, 461–5, **2006**.
- [52] D'Costa, V.M., King, C.E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W.W., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G.B., Poinar, H.N., Wright, G.D., Antibiotic resistance is ancient, *Nature*, 477, 457–461, **2011**.
- [53] Alekshun, M.N., Levy, S.B., Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance, *Cell*, 128, 1037–50, **2007**.
- [54] Larson, E., Community factors in the development of antibiotic resistance, *Annual Review Of Public Health*, 28, 435–447, **2007**.
- [55] Hawkey, P.M., The growing burden of antimicrobial resistance, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1–9, **2008**.
- [56] Ahaduzzaman, Md., Hassan, M., Alam, M., Azizulislam, S.K.M., Uddin, I., Antimicrobial resistance pattern against staphylococcus aureus in environmental effluents, *Research Journal for Veterinary Practitioners*, 2, 13-16, **2014**.

- [57] Hassan, M.M., Amin, K.B., Ahaduzzaman, M., Alam, M., Faruk, M.S.A., Uddin, I., Antimicrobial resistance pattern against e. coli and salmonella in layer poultry, *Research Journal for Veterinary Practitioners*, 30-35, **2014**.
- [58] Sabuncu, E., David, J., Bernède-Bauduin, C., Pépin, S., Leroy, M., Boëlle ,P.Y., Watier, L., Guillemot, D., Significant reduction of antibiotic use in the community after a nationwide campaign in france, 2002–2007, *PLoS Medicine*, 6, p1000084, **2009**.
- [59] Yola, M.L., Eren, T., Atar, N., Molecular imprinted nanosensor based on surface plasmon resonance: application to the sensitive determination of AMOXicillin, *Sensors And Actuators B* 195, 28–35, **2014**.
- [60] Lara, F.J., Olmo-Iruela, D.M., Cruces-Blanco, C., Quesada-Molina, C., García-Campaña, G.C., Advances in the determination of β -lactam antibiotics by liquid chromatography, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*38, 52–66, **2012**.
- [61] Kaur, S. P., Rao, R., Nanda, S., AMOXicillin: a broad spectrum antibiotic, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3, 30-37, **2011**.
- [62] Subhas, C.M., Harsha, R., Dinesha, R., Thammanna, G.S.S., Antibacterial activity of coleus aromaticus leaves, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2, 63-66, **2010**.
- [63] Chulavatnatol, S., Charles, B.G., Determination of dose-dependent absorption of AMOXycillin from urinary excretion data in healthy subjects, *British Journal of Pharmacological Society*, 38, 274-277, **1994**.
- [64] Amin, A.S., El-Ansary, A.L., Issa, Y.M., Colorimetric determination of AMOXycillin in pure form and in pharmaceutical preparations, *Talanta*, 41, 691-694, **1994**.
- [65] Dayan, A.D., Allergy to antimicrobial residues in food: assessment of the risk to man, *Veterinary Microbiology*, 35, 213–216, **1993**.
- [66] Ang, C.Y.W., Liu, F.F., Lay, J.O.Jr., Luo, W., McKim, K., Gehring, T., Lochmann, R., Liquid chromatographic analysis of incurred AMOXicillin residues in catfish muscle following oral administration of the drug), *Journaşl of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1673–1677, **2000**.

- [67] Messer, J. W., Leslie, J. E., Houghtby, G. A., Peeler, J. T., Barnett, J. E., Bacillus stearothermophilus disc assay for detection of inhibitors in milk: collaborative study, *Association of Official Analytical Chemists*, 65, 1208-1214, **1982**.
- [68] Charm, S. E., Chi, R. K., Rapid screening assay for beta-lactam antibiotics in milk: collaborative study, *Association of Official Analytical Chemists*, 65, 1186-1192, **1982**.
- [69] Senyk, G. F., Davidson, J. H., Brown, J. M., Halestead, E.R., Sherbon, G.W., Comparison of rapid tests used to detect antibiotic residues in milk, *Journal of Food Protection*, 53, 158-164, **1990**.
- [70] Beltran, A., Marcé, R.M., Cormack, P.A.G., Sherrington, D.C., Borrull, F., Selective solid-phase extraction of AMOXicillin and cephalixin from urine samples using a molecularly imprinted polymer, *Separation Science*, 31, 2868-2874, **2008**.
- [71] Fuwei, W., Jinghua, Y., Ping, D., Shenguang, G., Molecular Imprinting-Chemiluminescence Sensor for the Determination of AMOXicillin, *Analytical Letters*, 43, 1033-1045, **2010**.
- [72] Szultka, M., Krzeminski, M., Walczak, J., Jackowski, M., Buszewski, B., Pharmacokinetic study of AMOXicillin in human plasma by solid-phase microextraction followed by high-performance liquid chromatography–triple quadrupole mass spectrometry, *Biomedical Chromatography*, 28, 255-264, **2014**.
- [73] Santos, D.P., Bergamini, M.F., Zanoni, M.V.B., Voltammetric sensor for AMOXicillin determination in human urine using polyglutamic acid/glutaraldehyde filmens, *Sensors and Actuators B: Chemical B*, 133, 398-403, **2008**.
- [74] Ojani, R., Raoof, J.B., Zamani, S., A novel voltammetric sensor for AMOXicillin based on nickel–curcumin complex modified carbon paste electrode, *Bioelectrochemistry*, 85, 44-49, **2012**.
- [75] Brahman, K.B., Dar, R.A., Pitre, K.S., Conducting polymer film based electrochemical sensor for the determination of AMOXicillin in micellar media, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 176, 307-314, **2013**.
- [76] Chowdhury, T.R., Shaikh, A.A., Akter, H., Neaz, M.M., Bakshi, P.K., Saleh Alahmad, A.J., Highly sensitive detection of AMOXicillin based on

- gold nanoparticle-modified ITO electrodeecs, *ECS Solid State Letters*, 3, 14-16, **2013**.
- [77] Ensafi, A.A., Allafchian, A.R., Rezaei, B., Multiwall carbon nanotubes decorated with FeCr₂O₄, a new selective electrochemical sensor for AMOXicillin determination, *Journal of Nanoparticle Research*, 14: 1244, **2012**.
- [78] Kissinger, P.T., Biosensors—a perspectiveiosens, *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 2512–2516, **2005**.
- [79] Lazcka, O., Del Campo, F.J., Munoz, F.X., Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors, *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 1205–1217, **2007**.
- [80] Thévenot, D.R., Toth, K., Durst, R.A., Wilson, G.S., Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification, *Pure and Applied Chemistry*, 71, 2333-2348, **1999**.
- [81] Buerk, D.G., *Biosensors: Theory and applications*, Crc Press, **1995**.
- [82] Geshaber, D., MacKenzie, R., Vörös, J., Reimhult, E., Electrochemical biosensors - sensor principles and architectures, *Sensors*, 8, 1400-1458, **2008**.
- [83] Grieshaber, D., Mac Kenzie, R., Voeroes, J., Reimhult, E., Electrochemical biosensors - sensor principles and architectures, *Sensors*, 8, 1400-1458, **2008**.
- [84] Sadana, A., *Binding and Dissociation Kinetics for Different Biosensor Applications Using Fractals*, 8. Baskı, 219-242, **2006**.
- [85] Liu, G., Lin, Y., Electrochemical Sensor for Organophosphate Pesticides and Nerve Agents Using Zirconia Nanoparticles as Selective Sorbents, *Analitical Chemistry*, 77, 5894-5901, **2005**.
- [86] Monosik, R., Stredansky, M., Strudik, E., Biosensors - classification, characterization and new trends, *Acta Chimica Slovaca*, 5, 109-120, **2012**.
- [87] Kitova, A.E., Alferov, V.A., Ponamoreva, O.N., *Mikrobnye biokatalizatory i perspektivy razvitiya fermentnykh tekhnologii v pererabatyvayushchikh otraslyakh APK* (Microbial biocatalysts and outlooks for the development of enzyme technologies in processing sectors of agribusiness), Moscow, Pishchepromizdat, 255–262, **2014**.

- [88] Reshetilov, A.N., Kitova, A.E., Alferov, V.A., Ponamoreva, O.N., *Biotehnologiya-2003: Tezisy dokladov seminara-prezentatsii innovatsionnykh nauchno-tekhnicheskikh proektov* (Biotechnology 2003: workshop and presentation of innovative research and development projects), Pushchino, Moscow oblast, 64–65, **2003**.
- [89] Evtyugin, G.A., Budnikov, G.K., Nikol'skaya, E.B., Rossiiskii khimicheskii zhurnal, *Russian Chemical Reviews*, 68, 1041–1064, **1999**.
- [90] Park, Je-K., Yee, H.-J., Lee, K. S., Lee, W.-Y., Shin, M.-C., Kim, T.-H., and Kim, S.-R., Determination of breath alcohol using a differential-type amperometric biosensor based on alcohol dehydrogenase, *Analytica Chimica Acta*, 390, 83–91. **1999**.
- [91] Eggibs, B., *Chemical Sensors and Biosensors*, New York: Wiley, **2002**.
- [92] Vo-Dinh, T., Tromberg, B.J., Griffin, G.D., Ambrose, K.R., Sepaniak, M.J., Gardenhire, E.M., *Applied Spectroscopy*, 41, 735–738, **1987**.
- [93] Korotkaya, E. V., Analysis of the energy efficiency of the fast freezing of blackcurrant berries, *Foods and Raw Materials*, 2, 2308-4057, **2014**.
- [94] Borgmann, S., Schulte, A., Neugebauer, S., Schuhmann, W., *Advances in Electrochemical Science and Engineering*. Edited by Alkire, Kolb, D.M., Lipkowski, J., WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim ISBN: 978-3-527- 32885-7, **2011**.
- [95] Labuda, J., Brett, AMO., Evtugyn, G., Fojta, M., Mascini, M., Ozsoz, M., Palchetti, I., Paleček, E., Wang, J., Electrochemical nucleic acid-based biosensors Concepts, terms, and methodology (IUPACTechnical Report), *Pure Applied Chemistry*, 82, 1161-1187, **2010**.
- [96] Mohanty, S.P., Kougianos, E., Biosensors: A Tutorial Review, *IEEE Potentials*, 25, 35-40, **2006**.
- [97] Lui, C., Cady, N.C., Batt, C.A., Nucleic acid-based detection of bacterial pathogens using integrated microfluidic platform systems *Sensors*, 9, 3713–3744, **2009**.
- [98] Clark, L.C., Lyons, C., Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 102, 29-45, **1962**.

- [99] Thevenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A., Wilson, G. S., Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification, *Biosensors & Bioelectronics*, 16, 121–131, **2001**.
- [100] Zhang, X., Ju, H., Wang, *Electrochemical Sensors, Biosensors and Their Biomedical Applications*, Academic Press is an imprint of Elsevier, **2008**.
- [101] Koyun, A., Ahlatcioglu, E., Ipek, Y.K., Biosensors and their principles.in: KARA, S., Editor. *A Roadmap of Biomedical Engineers and Milestones, Rijeka, Intech*, 115-142, **2012**.
- [102] Arora, P., Sindhu, A., Dilbaghi, N., Chaudhury, A., Biosensors as innovative tools for the detection of food borne pathogens, *Biosensors and Bioelectronics*, 28,1–12, **2011**.
- [103] Kuila, T., Bose, S., Khanra, P., Mishra, A.K., Kim, N.H., Lee, J.H., Recent advances in graphene-based biosensors, *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 4637-4648, **2011**.
- [104] Velasco-Garcia, M.N., Optical biosensors for probing at the cellular level: A review of recent progress and future prospects, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20, 27-33, **2009**.
- [105] Hiep, H.M., Endo, T., Kerman, K., Chikae, M., Kim, D-K., Yamamura, SH., Takamura, Y., Tamiya, E., A localized surface plasmon resonance based immunosensor for the detection of casein in milk, *Science and Technology of Advanced Materials*, 8, 331–338, **2007**.
- [106] Janshoff, A., Galla, H.J., Steinem, C., Piezoelectric mass-sensing devices as biosensors—an alternative to optical biosensors?, *Angewandte. Chemie. International edition*,. 39, 4004-4032, **2000**.
- [107] Tombelli, S., Minunni, M., Mascini, M., Piezoelectric biosensors: Strategies for coupling nucleic acids to piezoelectric devices, *Methods*, 37, 48-56, **2005**.
- [108] Antonelli, M.L., Spadaro, C., Tornelli, R.F., A microcalorimetric sensor for food and cosmetic analyses: l-Malic acid determination, *Talanta*, 74, 1450-1454, **2008**.
- [109] Bhand, S.G., Soundararajan, S., Surugiu-Warnmark, I., Milea, J.S., Dey, E.S., Yakovleva, M., Danielsson, B., Fructose-selective

- calorimetric biosensor in flow injection analysis, *Analitica Chimica Acta*, 668, 13-18, **2010**.
- [110] Turner, A., Karube, I., Wilson, G., *Biosensors: Fundamentals and Applications*, Oxford University Press, **1987**.
- [111] Collings, A.F., Caruso, F., Biosensors: recent advances, *Reports on Progress in Physics*, 1397-1445, **1997**.
- [112] Tothill, E.I., Biosensors for cancer markers diagnosis, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20, 55–62, **2009**.
- [113] Wang, J., Electrochemical glucose biosensors, *Chemical Reviews*, 108, 814-825, **2008**.
- [114] Touhami, A., Biosensors and nanobiosensors: design and applications, *Nanomedicine*, One Central Press, London UK ISBN 978-1-910086-01-8, **2014**.
- [115] Luo, X., Morrin, A., Killard, A.J., Smyth, M.R., Application of nanoparticles in electrochemical sensors and biosensors, *Electroanalysis*, 18, 319-326, **2006**.
- [116] Flickyngerova, S., Ovadekova, R., Novotny, I., Tvarozek, V., Labuda, J., Breternitz, V., Knedlik, Ch., Preparation of nanostructured thin-film interfaces applicable in biosensors, *Vacuum*, 82, 303—306, **2008**.
- [117] Huang, L., Guo, Y., Porter, AL., *Science and Innovation Policy, in Atlanta Conference*, Atlanta, Georgia, USA, 1-10, **2009**.
- [118] Chen, J., Miao, Y., He, N., Wu, X., Li, S., Nanotechnology and biosensors, *Biotechnology Advances*, 22, 505-518, **2004**.
- [119] Belluzo, M.S., Ribone, M.E., Lagier, C.M., Assembling amperometric biosensors for clinical diagnostics, *Sensors*, 8, 1366-1399, **2008**.
- [120] Malhotra, B.D., Chaubey, A., Biosensors for clinical diagnostics industry, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 91, 117-127, **2003**.
- [121] Dzyadevych, S.V., Arkhypova, V.N., Soldatkin, A.P., Elskaya, A.V., Martelet, C., Jaffrezic-Renault, N., Amperometric enzyme biosensors: Past, present and future, *IRBM*, 29, 171-180, **2008**.
- [122] Castillo, M., Alonso, M.C., Riu, J., Reinke, M., Klöter, G., Dizer, H., Fischer, B., Hansen, P.D., Barceló, D., Identification of cytotoxic compounds in European wastewaters during a field experiment, *Analytica Chimica Acta*, 426, 265-277, **2001**.

- [123] Rodriguez-Mozaz, S., Marco, M.P., De Alda, M.J.L., Barcelo, D., Biosensors for environmental applications, Future development trends, *Pure and Applied Chemistry*, 76, 723-752, **2004**.
- [124] Somerset, V., *Environmental Biosensors*, 1. Baskı, InTech, Rijeka, ISBN: 978-953-307-486-3, **2011**.
- [125] Ramanaviciene, A., Ramanavicius, A., Molecularly imprinted polypyrrole-based synthetic receptor for direct detection of bovine leukemia virus glycoproteins, *Biosensor and Bioelectronics*, 20, 1076–1082, **2004**.
- [126] Sener, G., Uzun, L., Say, R., Denizli, A., Use of molecular imprinted nanoparticles as biorecognition element on surface plasmon resonance sensor, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 160, 791–799, **2011**.
- [127] Englebienne, P., Hoonacker, A.V., Verhas, M., Spectrosc, J., Surface plasmon resonance: principles, methods and applications in biomedical sciences, *Journal of Spectroscopy*, 17, 255–273, **2003**.
- [128] <https://www.sensiqtech.com/technology/SPR-principles/> 07 Eylül tarihinde girilmiştir.
- [129] Wood, R. W., XLII. On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum, *Philosophical magazine*, 4, 396-402, **1902**.
- [130] Wood, R. W., XXVII. Diffraction gratings with controlled groove form and abnormal distribution of intensity, *Philosophical magazine* 23, 310-317, **1912**.
- [131] Rayleigh, L., On the dynamical theory of gratings *Proceedings of Royal Society A*, 79, 399-416, **1907**.
- [132] Ritchie, R. H., Plasma losses by fast electrons in thin films, *Physical Review*, 106, 874, **1957**.
- [133] Pines, D., Bohm, D., A collective description of electron interactions: III. coulomb interactions in a degenerate electron gas, *Physical Review* 92, 609-626, **1953**.
- [134] Kretschmann, E., Reather, H., Radiative decay of non radiative surface plasmons excited by light, *Z. Naturforsch*, 23, 2135-2136, **1968**.

- [135] Otto, A., Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection, *Zeitschrift für Physik A Hadrons and nuclei*, 216, 398-410, **1968**.
- [136] Liedberg, Bo., Nylander, Claes., Lunström, I., Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing, *Sensors and Actuators*. 4, 299–304, **1983**.
- [137] Pockrand, I., Swalen, J.D., Gordon, II., Philpott, M.R., Surface plasmon spectroscopy of organic monolayer assemblies, *Surface Science*, 74, 237-244, **1978**.
- [138] Peterlinz, K. A., Georgiadis, R., Two-color approach for determination of thickness and dielectric constant of thin films using surface plasmon resonance spectroscopy, *Optics Communications*, 130, 260-266, **1996**.
- [139] Zhang, L., Uttamchandani, D., Optical chemical sensing employing surface plasmon resonance, *Electronic Letters*, 23, 1469-1470, **1988**.
- [140] Cullen, D.C., Brown, R.G.W., Lowe, C.R., Detection of immuno-complex formation via surface plasmon resonance on gold-coated diffraction gratings, *Biosensors*, 3, 211-225, **1987**.
- [141] Lawrence, C.R., Geddes, N.J., Furlong, D.A., Sambles, J.R., Surface plasmon resonance studies of immunoreactions utilizing disposable diffraction gratings, *Biosensors and Bioelectronics*, 11, 389-400, **1996**.
- [142] Flanagan, M.T., Pantell, R.H., Surface plasmon resonance and immunosensors, *Electronic Letters*, 20, 968-970, **1984**.
- [143] D'Orazio, P., Biosensors in clinical chemistry — 2011 update, *Clinica Chimica Acta*, 412, 1749–1761, **2011**.
- [144] Schasfoort, R.B.M., Tudos, A.J., *Handbook of Surface Plasmon Resonance*; RSC, Cambridge, UK, **2008**.
- [145] Patching, S.G., Surface plasmon resonance spectroscopy for characterisation of membrane protein–ligand interactions and its potential for drug discovery, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1838, 43–55, **2014**.
- [146] Helmerhorst, E., Chandler, D.J., Nussio, M., Mamotte, C.D., Real-time and label-free bio-sensing of molecular interactions by surface plasmon resonance: a laboratory medicine perspective, *The Clinical Biochemist Reviews*, 33, 161–173, **2012**.

- [147] Wang, X., Zhan, S., Huang, Z., Hong, X., Review: advances and applications of surface plasmon resonance biosensing instrumentation, *Instrumentation Science & Technology*, 41, 574–607, **2013**.
- [148] Kihm, K.D., Surface plasmon resonance reflectance imaging technique for near-field (~100 nm) fluidic characterization, *Experiments in Fluids*, 48, 547–564, **2009**.
- [149] Maier, S.A., *Plasmonics: Fundamentals Applications*, SPRinger, New York, NY, USA, **2007**.
- [150] Kihm, K.D., Cheon, S., Park, J.S., Kim, H.J., Lee, J.S., Kim, I.T., Yi, H.J., Surface plasmon resonance (SPR) reflectance imaging: Far-field recognition of near-field phenomena, *Optics and Lasers in Engineering*, 50, 64–73, **2012**.
- [151] Dastmalchi, B., Tassin, P., Koschny, T., Soukoulis, C.M., A new perspective on plasmonics: confinement and propagation length of surface plasmons for different materials and geometries, *Advanced Optical Materials*, 4, 177–184, **2016**.
- [152] SensiQ., *Overview of Surface Plasmon Resonance*, Coomon, Revision A.02
- [153] Biacore, A.B., *Biacore Sensor Surface Handbook*, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden, **2003**.
- [154] Scarano, S., Mascini, M., Turner, A.P.F., Minunni, M., Surface plasmon resonance imaging for affinity-based biosensors, *Biosensors and Bioelectronics*, 25, 957–966, **2012**.
- [155] Mariani, S., Minunni, M., Surface plasmon resonance applications in clinical analysis, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406, 2303–2323, **2014**.
- [156] Lofas, S., Johnsson, B., A novel hydrogel matrix on gold surfaces in surface plasmon resonance sensors for fast and efficient covalent immobilization of ligands, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communication*, 1526-1528, 21, **1990**.
- [157] Sjolander, S., urbaniczky, C., Integrated fluid handling system for biomolecular interaction analysis, *Analytical Chemistry*, 63, 2338-2345, **1991**.

- [158] Karlsson, R., Michaelsson, A., Mattsson, L., *Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system*, *Journal of Immunological Methods*, 229-240, **1991**.
- [159] Safsten, P., Klakamp, S.L., Drake, A.W., Karlsson, R., Myszk, D.G., Screening antibody-antigen interactions in parallel using Biacore A100, *Analytical Biochemistry*, 353, 181-190, **2006**.
- [160] Lutfi, Y. M., Eren, T., Atar, N., Molecular imprinted nanosensor based on surface plasmon resonance: Application to the sensitive determination of AMOXicillin, *Sensors and Actuators B*, 195, 28–35, **2014**.
- [161] Sigh, P., SPR Biosensors: Historical perspectives and current challenges, *Sensors and Actuators B*, 229, 110–130, **2016**.
- [162] Locharoenrat, K., Sano, H., Mizutani, G., Phenomenological studies of optical properties of Cu nanowires, *Science and Technology of Advanced Materials*, 8, 277–281, **2007**.
- [163] Rich, R.L., Myszk, D.G., Higher-throughput, label-free, real-time molecular interaction analysis, *Analytical Biochemistry*, 361, 1–6, **2007**.
- [164] Granqvist, N., Yliperttula, M., Välimäki, S., Pulkkinen, P., Tenhu, H., Viitala, T., Control of the morphology of lipid layers by substrate surface chemistry, *Langmuir*, 30, 2799–2809, **2014**.
- [165] Jussila, H., Albrow-Owen, T., Yang, H., Hu, G., Aksimsek, S., Granqvist, N., Lipsanen, H., Howe, R.C.T., Sun, Z., Hasan, T., New approach for thickness determination of solution-deposited graphene thin Films, *American Chemical Society Omega*, 2, 2630-2638, **2016**
- [166] Korhonen, K., Granqvist, N., Ketolainen, J., Laitinen, R., Monitoring of drug release kinetics from thin polymer films by multi-parametric surface plasmon resonance, *International Journal of Pharmaceutics*, 494, 531–536, **2015**.
- [167] Lofgreen, J.E., Ozin, G.A., Controlling morphology and porosity to improve performance of molecularly imprinted sol–gel silica, *Chemical Society Reviews*, 43, 911–933, **2014**.
- [168] Chen, L., Wang, X., Lu, W., Wu, W., Li, J., Molecular imprinting: perspectives and applications, *Chemical Society Reviews*, 45, 2137-2211, **2016**.

- [169] Shimizu, K.D., Stephenson, C.J., Molecularly imprinted polymer sensor arrays, *Current Opinion in Chemical Biology*, 14, 743-750, **2010**.
- [170] Schirhagl, R., Bioapplications for molecularly imprinted polymers, *Analytical Chemistry*, 86, 250–261, **2013**.
- [171] Li, S., Cao, S., Whitcombe, M.J., Piletsky, S.A., Size matters: Challenges in imprinting macromolecules, *Progress in Polymer Science*, 39, 145–163, **2014**.
- [172] Whitcombe, M.J., Chianella, I., Larcombe, L., Piletsky, S.A., Noble, J., Porter, R., Horgan, A., The rational development of molecularly imprinted polymer-based sensors for protein detection, *Chemical Society Reviews*, 40, 1547–1571, **2011**.
- [173] Svenson J., Nicholls, I.A., On the thermal and chemical stability of molecularly imprinted polymers, *Analytica Chimica Acta*, 435, 19-24, **2001**.
- [174] Holthoff, E.L., Brigh, F.V., Molecularly templated materials in chemical sensing, *Analytica Chimica Acta*, , 594, 147-161, **2007**.
- [175] YANG, G., ZHAO, F., Molecularly imprinted polymer grown on multiwalled carbon nanotube surface for the sensitive electrochemical determination of AMOXicillin, *Electrocimica Acta*. 174, 33-40, **2015**.
- [176] Umpleby, R.J., Bode, M., Shimizu, K.D., Measurement of the continuous distribution of binding sites in molecularly imprinted polymers, *Analyst*, 125, 1261-1265, **2000**.
- [177] Fuchs, Y., Soperra, O., Haupt, K., Photopolymerization and photostructuring of molecularly imprinted polymers for sensor applications--a review, *Analytica Chimica Acta*, 717, 7-20, **2012**.
- [178] Zhang, Z., Li, J., Song, X., Ma, J., Chen, L., Hg²⁺ ion-imprinted polymers sorbents based on dithizone–Hg²⁺ chelation for mercury speciation analysis in environmental and biological samples, *RSC Advanced*, 4, 46444–46453, **2014**.
- [179] Gladis, J.M., Rao, T.P., Effect of porogen type on the synthesis of uranium ion imprinted polymer materials for the reconcentration/separation of traces of uranium, *Microchimica Acta*, 146, 251–258, **2004**.

- [180] Wulff, G., Sarhan, A., The use of polymers with enzyme-analogous structures for the resolution of racemates, *Angewandte Chemie-international Edition*, 11, 341, **1972**.
- [181] Arshady, R., Mosbach, K., Synthesis of substrate-selective polymers by host-guest polymerization, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 182, 687-692, **1981**.
- [182] Greene, N.t., Morgan, S.I., Shimizu, K.d., Molecularly imprinted polymer sensor arrays, *Chemical Communications*, 10, 1172-1173, **2004**.
- [183] Walsh, R., Osmani, Q., Hughes, H., Duggan, P., McLoughlin, P., synthesis of imprinted beads by aqueous suspension polymerisation for chiral recognition of antihistamines, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 879, 3523–3530, **2011**.
- [184] He, J., Lv, R., Cheng, J., Li, Y., Xue, J., Lu, K., Wang, F., Preparation and characterization of molecularly imprinted microspheres for dibutyl phthalate recognition in aqueous environment, *Journal of Separation Science*, 33, 3409-3414, **2010**.
- [185] Wang, B., Wang, Y., Yang, H., Wang, J., Deng, A., Preparation and characterization of molecularly imprinted microspheres for selective extraction of trace melamine from milk samples, *Microchimica Acta*, 174, 191–199, **2011**.
- [186] Suryanarayanan, V., Wu, Ch-T., Ho, K.Ch., Molecularly Imprinted Electrochemical Sensors, *Electroanalysis*, 22, 1795–1811, **2010**.
- [187] Wang, Y., Cao, Y., Fang, C., Gong, Q., Electrochemical sensor for parabens based on molecular imprinting polymers with dual-templates, *Analytica Chimica Acta*, 673, 145–150, **2010**.
- [188] Figueiredo, L., Emy, G.L., Santos, L., Alves, A., Applications of molecularly imprinted polymers to the analysis and removal of personal care products: A review, *Talanta*, 146, 754–765, **2016**.
- [189] Balamurugan, K., Gokulakrishnan, K., Prakasam, T., Preparation and evaluation of molecularly imprinted polymer liquid chromatography column for the separation of ephedrine enantiomers, *Arabian Journal of Chemistry*, S528-S536, **2011**.
- [190] Tang, K., Gu, X., Luo, Q., Chen, S., Wu, L., Xiong, J., Preparation of molecularly imprinted polymer for use as SPE adsorbent for the

- simultaneous determination of five sulphonylurea herbicides by HPLC, *Food Chemistry*, 150, 106–112, **2014**.
- [191] Ramamoorthy, M., Ulbricht, M., Molecular imprinting of cellulose acetate-sulfonated polysulfone blend membranes for Rhodamine B by phase inversion technique, *Journal of Membrane Science*, 217, 207–214, **2003**.
- [192] Delaney, T.L., Zimin, D., Rahm, M., Weiss, D., Wolfbeis, O.S., Mirsky, V.M., Capacitive detection in ultrathin chemosensors prepared by molecularly imprinted grafting photopolymerization, *Analytical Chemistry*, 79, 3220–3225, **2007**.
- [193] Lok, C.M., Son, R., Application of molecularly imprinted polymers in food sample analysis – a perspective, *international food research journal*, 16, 127–140, **2009**.
- [194] Wulff, G., Sarhan, A., German patent application, DE-A 2242796, *Journal of Chemical Society Abstracts*, 83, 60300w, **1974**.
- [195] Wulff, G., Sarhan, A., Zabrocki, K., Enzyme-analogue built polymers and their use for the resolution of racemates, *Tetrahedron Letters*, 44, 4329–4332, **1973**.
- [196] Olsen, J., Martin, P., Wilson, I.D., Molecular imprints as sorbents for solid phase extraction: potential and applications, *Analytical Communications*, 35, 13H–14H, **1998**.
- [197] Gizem E., Berillo, D., Hedström, M., Mattiasson, B., Microcontact-BSA imprinted capacitive biosensor for real-time, sensitive and selective detection of BSA, *Biotechnology Reports*, 3, 65-72, **2014**.
- [198] Ramström, O., Skudar, K., Haines, J., Patel, P., Brüggemann, A., Food analyses using molecularly imprinted polymers, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2105–2114, **2001**.
- [199] Wulff, G., Gross, T., Schönfeld, R., Enzyme models based on molecularly imprinted polymers with strong esterase activity, *Angewandte Chemie International Edition*, 36, 1962-1964, **1997**.
- [200] Chen, J., Shinde, S., Koch, M.H., Eisenacher, M., Galozzi, S., Lerari, T., Barkovits, K., Subedi, P., Krüger, R., Kuhlmann, Sellergren, B., Helling,

- S., Marcus, K., Low-bias phosphopeptide enrichment from scarce samples using plastic antibodies, *Scientific Reports*, 11438, **2015**.
- [201] Zhang, X., Chen, L., Xu, Y., Wang, H., Zeng, Q., Zhao, Q., Ren, N., Ding, L., Determination of β -lactam antibiotics in milk based on magnetic molecularly imprinted polymer extraction coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal Of Chromatography B*, 878, 3421-3426, **2010**.
- [202] Zhang, L., Cheng, G., Fu, C., Molecular selectivity of tyrosine-imprinted polymers prepared by seed swelling and suspension polymerization, *Polymer International.*, 51, 687-692, **2002**.
- [203] Li, H., Xia, X., Xue., Tang., xiao,x., li, j., shen, j., Simultaneous determination of AMOXicillin and prednisolone in bovine milk using ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 900, 59-63, **2012**.
- [204] Ji, W., Wang, Li., Qian, He., Yao, W., Quantitative Analysis of AMOXicillin Residues in Foods by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, *Spectroscopy Letters*, 47, 451-457, **2014**.
- [205] Lugoboni, B.,Gazzotti, E.,Zironi, E., Barbarossa, A., Pagliuca, G., Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for quantitative determination of AMOXicillin in bovine muscle, *Journal of Chromatography B*, 879, 1980-1986, **2011**.
- [206] Reyns, T., Cherlet, M., De Baere, S., De Backer, P., Croubles, S., Rapid method for the quantification of AMOXicillin and its major metabolites in pig tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with emphasis on stability issues, *Journal of Chromatography B*, 861, 108-116, **2008**.
- [207] De Baere, S., Cherlet, M., Baert, K., De Backer., Quantitative Analysis of AMOXycillin and Its Major Metabolites in Animal Tissues by Liquid Chromatography Combined with ElectroSPRAY Ionization Tandem Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*, 74, 1393-1401, **2002**.
- [208] Montero, A., Althaus, R.L., Molina, A., Berruga, I., Molina, M.P., Detection of antimicrobial agents by a specific microbiological method (Eclipse100®) for ewe milk, *Small Ruminant research*, 57, 229-237, **2005**.

- [209] Pazzola, M., Piras, G., Noce, A., Dettori, M.L., Vacca, G.M., Evaluation of the rapid assay Betastar Combo 3.0 for the detection of Penicillin, AMOXicillin, Cefazolin and Oxytetracycline in individual sheep milk, *Small Ruminant research*, 124, 127-131, **2015**.
- [210] Zhanga, X., Chena, L., Xua, Y., Wanga, H., Zenga, Q., Zhaoa, Q., Renb, N., Dingb, L., Determination of β -lactam antibiotics in milk based on magnetic molecularly imprinted polymer extraction coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 878, 3421-3426, **2010**.
- [211] Luo, W., Hansen, E.B., Ang, C.Y.W., Deck, J., Freeman, P.J., Thompson, H.C., Simultaneous determination of AMOXicillin and ampicillin in bovine milk by HPLC with fluorescence detection, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1264-1268, **1997**.
- [212] Yola, M.L., Eren, T., Atar, N., Molecular imprinted nanosensor based on surface plasmon resonance: Application to the sensitive determination of AMOXicillin, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 195, 28-35, **2014**.
- [213] Xie, K., Jia, L., Xu, D., Guo, H., Xie, X., Huang, Y., Chen, X., Bao, W., Dai, G., Wang, J., Simultaneous determination of AMOXicillin and ampicillin in eggs by reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection using pre-column derivatization, *Journal of Chromatographic Science*, 1-5, **2012**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı-Soyadı : Sona FAALNOURİ

Doğum Yeri : İnan

Medeni Hali : Bekar

E-Posta : sona.faalnouri@gmail.com

Adresi : Konutkent mahallesi, oyak 3, 39/3, çankaya/Ankara

Eğitim

Önlisans : Tabriz Üniversitesi/İnan

Lisans : Azad İslami Üniversitesi-Urimiyeye Ünitesi/İnan

Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi/Ankara

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce (Çok iyi)

Farsça (Anadil)

Azerice (Çok iyi)

İş Deneyimi

-

Deneyim Alanları

-

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

-

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

- 10.Ulusal Afinite Teknikleri Kongresi-Ayvalık/2016
- XVII.Kromatografi Kongresi-Çorum/2017





HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 05/01/2018

Tez Başlığı / Konusu: **AMOKSİSİLİN BASKILANMIŞ YÜZEY PLAZMON REZONANS NANOSENSÖRLER**

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 130 sayfalık kısmına ilişkin, 03/01/2018 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %9'dur.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/~~dâhil~~
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

05.01.2018

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: SONA FAALNOURİ

Öğrenci No: N14226601

Anabilim Dalı: BİYOMÜHENDİSLİK

Programı: YÜKSEK LİSANS

Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Prof. Dr. Adil DENİZLİ