

**DİKLOFENAK BASKILANMIŞ YÜZEY PLAZMON
REZONANS TEMELLİ BİYOSENSÖRÜN HAZIRLANMASI**

**PREPARATION OF SURFACE PLASMON RESONANCE
BASED BIOSENSORS DICLOFENAC IMPRINTED**

KIVILCIM ÇAKTÜ GÜLER

PROF. DR. ADİL DENİZLİ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2014

Kıvılcım ÇAKTÜ GÜLER'in hazırladığı '**Diklofenak Baskılanmış Yüzey Plazmon Rezonans Temelli Biyosensörünün Hazırlanması**' adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **NANOTEKNOLOJİ VE NANOTİP ANABİLİM DALI**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Adil DENİZLİ

Başkan ve Danışman

.....

Prof. Dr. Serap ŞENEL

Üye

.....

Prof. Dr. Sinan AKGÖL

Üye

.....

Prof. Dr. Handan YAVUZ ALAGÖZ

Üye

.....

Doç. Dr. Eylem ÖZTÜRK GÜVEN

Üye

.....

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

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

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 üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

20/09/2014

Kıvılcım ÇAKTÜ GÜLER

ÖZET

DİKLOFENAK BASKILANMIŞ YÜZEY PLAZMON REZONANS TEMELLİ BİYOSENSÖRÜN HAZIRLANMASI

Kıvılcım ÇAKTÜ GÜLER

Doktora, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Adil DENİZLİ

Eylül 2014, 96 sayfa

Sunulan çalışmanın amacı, diklofenak (DFC) tayini için DFC baskılanmış yüzey plazmon rezonans (SPR) sensörün hazırlanmasıdır. Bu amaçla, SPR biyosensör, alil merkaptan ile modifiye edilmiş ve alil gruplarının bağlanması sağlanmıştır. İlk basamakta, DFC ile metakrilik asit (MAA) monomeri arasında ön kompleks oluşturulmuş ve hazırlanan bu kompleks, SPR altın çip yüzeyinde UV ışığı altında polimerleştirilmiştir. Elde edilen DFC baskılanmış SPR çip FTIR-ATR, elipsometre, atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ve temas açısı ölçümleri alınarak karakterize edilmiştir. DFC baskılanmamış çip elde etmek amacıyla, DFC kullanılmadan yeni bir çip yapılmış ve bu çipin karakterizasyonu için elipsometre, AFM ve temas açısı ölçüm aleti kullanılmıştır. DFC baskılanmış SPR sensörlerin duyarlılığını belirlemek için farklı derişimlerde hazırlanan DFC çözeltileri kullanılmıştır. Farklı derişimlerdeki DFC çözeltileri bağlanma kinetiklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Langmuir adsorpsiyon modeli hazırlanan sensör için en uygun adsorpsiyon modeli olarak bulunmuştur. DFC baskılanmış SPR sensörün seçiciliğini göstermek için DFC ve karbamazepin yarışmalı adsorpsiyonu araştırılmıştır. SPR çipin baskılama seçiciliğinin belirlenmesi için DFC baskılanmamış SPR sensör hazırlanmıştır. DFC baskılanmış SPR sensörün tekrar

kullanılabilirliğine bakmak için ip, aynı DFC derişimi kullanılarak 10 kez SPR sisteminde kullanılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Diklofenak (DFC), yüzey plazmon rezonans (SPR), sensör.

ABSTRACT

PREPARATION OF SURFACE PLASMON RESONANCE BASE BIOSENSORS DIKLOFENAC MOLECULAR IMPRINTED

Kıvılcım ÇAKTÜ GÜLER

**Doctor of Philosophy, Division of Nanotechnology and
Nanomedicine**

Supervisor: Prof. Dr. Adil DENİZLİ

September 2014, 96 pages

The aim of this study is the preparation of diclofenac (DFC) imprinted surface plasmon resonance sensor for detecting DFC. For this reason, SPR biosensors were modified with allyl mercaptane and the orientation of allyl groups was ensured. In the first step, the precomplex was prepared using DFC and methacrylic acid (MAA) monomer and prepared complex with crosslinker, EGDMA was polymerized on the golden surface of SPR under UV light. DFC imprinted SPR chip was characterized with FTIR-ATR, ellipsometry, atomic force microscopy (AFM) and contact angle measurements. A new chip was prepared without DFC in order to obtain DFC nonimprinted SPR sensor and the chip was characterized with ellipsometry, AFM and contact angle measurements. DFC sensing ability of DFC imprinted SPR sensor was investigated from DFC solutions with different concentrations. DFC solutions with different concentrations were used to determine the adsorption kinetics. Langmuir adsorption model was found as the most suitable model for DFC imprinted SPR chip. Competitive adsorptions of DFC and carbamazepine were investigated to show the selectivity of DFC imprinted

SPR sensor DFC nonimprinted SPR sensor was prepared to determine imprinting selectivity of DFC imprinted SPR sensor. DFC imprinted SPR chip was investigated 10 times with same concentrations of DFC solution in order to show reuse of the chip.

Keywords: Diclofenac DFC, surface plasmon resonance (SPR), sensor.

TEŞEKKÜR

2007 yılından bu yana eşsiz bilgi birikimini ve laboratuvar olanaklarını koşulsuzca paylaşan, maddi ve manevi desteğini bonkörce sunan, değerli danışman hocam Prof. Dr. Adil Denizli'ye

Yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca her başım sıkıştığında kapısını çaldığım; büyük sabır ve deneyimleriyle yol gösteren kıymetli hocam Prof.Dr. Handan YAVUZ ALAGÖZ'e

Doktora tez çalışmalarım süresince bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen Doç.Dr. Lokman UZUN' a ve Yrd. Doç. Dr. Fatma Yılmaz'a

Tez ve akademik çalışmalarım süresince güler yüz ve yardımseverliliğiyle her aradığımda ulaştığım sevgili Dr. Nilay BERELİ'ye ve Dr. Deniz TÜRKMEN'e, karakterizasyon çalışmalarımda büyük bir sabırla yardımına koşan Dr. Erkut YILMAZ'a

Her ihtiyaç duyduğumda yardımlarıyla yanımda olan Alper Türkoğlu'na, Fatma Kartal'a, Gülsu Şener'e ve Kemal Çetin'e

Çalışmalarım sırasında sundukları güler yüz ve sıcak laboratuvar ortamı için Dr. Müge Andaç, Dr. Gözde Baydemir'e Daryoush Majidi, Dr. Işık Perçin, Dr. Cemil Aydoğan, Dr. Ali Derazshamshir, Dr. Engin Bayram, İlker Koç, Ahmet Demirçelik, Bahar Ergün, Canan Armutçu, Duygu Çimen, Ilgım Göktürk, Sevgi Aslıyüce, Yeşeren Saylan, Emel Tamahkar, Recep Üzek, Esmâ Sarı, Kadir Erol, Kazım Köse, Mehmet Emin Çorman, Sabina Hüseyinli, Dilara Saçlıgil'e,

2010'dan bu yana yalnız mesaimi değil sevincimi, hüznümü, en güzel doğum günlerimi paylaştığım, ailemden kmlerce uzakta bile aile sıcaklığıyla ablalığıyla yanımda olan ve hem bilimsel hem de günlük hayatta çok şey öğrendiğim, yegane ortakçım Yrd. Doç. Dr. H. Aysun Mercimek'e

Kim zaman aynı oda da, kimi zaman aynı evde ama hep ortak ruhla hareket ettiğim Çiğdem Acioğlu'na

Kocaman kalbiyle , ablalığıyla, geniş kütüphanesiyle ne olursa olsun yanımda olan Yrd. Doç. Dr. Ayşenur Özşavli'ya

İki yıldır bizlerle birlikte yaşları küçük ancak becerileri ve yürekleri kocaman bilim adamı adayı canım lab grubu öğrencilerime

Bütün yaşamım boyunca iyi ve kötü günlerimde hep yanımda olup maddi ve manevi desteklerini esirgmeden bugünlere gelmemde büyük emekleri olan fedakar anne ve babama; mutlu ve eğlenceli çocukluğumun mimarları olan saygıdeğer anneannem ve dedeme; varlığıyla mutluluk kaynağım biricik kardeşime, ikinci ailem olarak verdikleri emekler ve destekleri için kayınvalidem ve kayınpederime

Doktora çalışmalarım boyunca yeterince zaman ayıramasam da, bana gösterdiği anlayış, sunduğu sevgi ile yanımda olan ve hayatıma girdiği günden bu yana dünyamı değiştirip benim sakin ruhum olan değerli ve yegane eşime

Sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.....

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER.....	x
ŞEKİLLER.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Nanoteknoloji.....	5
2.1.1. Nanoteknolojinin Uygulama Alanları	5
2.1.1.1 Tıp ve Sağlık Alanında Nanoteknoloji.....	5
2.1.2.2. Çevresel ve Tarımsal Uygulamalarda Nanoteknoloji.....	5
2.1.2.3. Tekstil Sanayinde Nanoteknoloji	6
2.1.2.4. Uzay ve Havacılıkta Nanoteknoloji.....	6
2.1.2.5. Biyoteknolojide Nanobiyoteknoloji	7
2.2. Biyosensörler	8
2.2.1. Biyosensörlerin Sınıflandırılması.....	8
2.2.1.1 Tanıma Elemanlarına Göre Biyosensörler.....	8
2.2.1.1.1. Enzimler.....	9
2.2.1.1.2. Antikorlar.....	9
2.2.1.1.3. Mikroorganizmalar	10
2.2.1.2. Dönüştürücülerine Göre Sınıflandırma	10
2.2.1.1.1. Optik Sensörler.....	10
2.2.1.1.2. Elektrokimyasal Sensörler	10
2.2.1.1.3. Piezoelektrik Sensörler	11
2.3. Yüzey Plazmon Rezonans	11
2.3.1. Yüzey Plazmon Rezonans Teorisi.....	12
2.3.2. Yüzey Plazmon Rezonans Biyosensörler.....	17
2.4. Moleküler Baskılanmış Polimerler	20

2.4.1. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Özelliklerini Etkileyen Faktörler	21
2.4.1.1. Fonksiyonel Monomer	22
2.4.1.2. Baskılanacak Kalıp Molekülün Özellikleri	23
2.4.1.3. Çapraz Bağlayıcılar	24
2.3.1.4. Çözücüler	25
2.3.1.5 Başlatıcılar.....	26
2.4.2. Kovalent Baskılama	26
2.4.3 Kovalent Olmayan Baskılama	27
2.4.4. Moleküler Bakılamanın Uygulama Alanları	30
2.4.5. Moleküler baskılama Tekniğiyle Hazırlanan Nanofilmler	30
2.5. Su Kirliliği.....	30
2.5.1. Su Kirleticileri.....	31
2.5.1.1. Mikroorganizmalar ve Hastalık Yapıcı Canlılar	31
2.5.1.2. Organik Maddelerden Kaynaklardan Kirlilik	32
2.5.1.3. Endüstriyel Atıklar	32
2.5.1.4. Radyoaktivite	32
2.5.2.3. Hormonlar	32
2.5.2.4. İlaçlar.....	32
2.6. Diklofenak.....	35
3. Materyal ve Yöntemler.....	39
3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	39
3.2. Metakrilik Asit –Diklofenak (MAAD) Önkompleksinin Karakterizasyonu	40
3.3. Yüzey Plazmon Rezonans Çip Altın Yüzeyinin Allil Merkaptan ile Yüzey Modifikasyonu.....	40
3.4. Diklofenak Baskılanmış PMAAD ve Diklofenak Baskılanmamış PMAAD Nanofilmlerin Hazırlanışı	40
3.5. Kalıp Molekül Diklofenanın Uzaklaştırılması	41
3.6. SPR Sensörlerin Karakterizasyonu	41

3.6.1. Elipsometre Ölçümleri.....	42
3.6.2. Temas Açısı Ölçümleri	43
3.6.3. FTIR-ATR Spektrofotometre Analizi	44
3.6.4. Atomik Kuvvet Mikroskopisi	44
3.7. Yüzey Plazmon Rezonans Sistemi ile Plazmon Ölçümleri	44
3.8. DFC Baskılanmış SPR Nanosensörle Kinetik Analizleri.....	44
3.10. SPR Çipin Baskılama Seçiciliğinin Belirlenmesi	46
3.11.DFC Baskılanmış Sensörün Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi.....	47
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	48
4.1. MAA-Diklofenak Ön Kompleksin Hazırlanması	48
4.2. SPR Sensörlerin Yüzey Karakterizasyonu	49
4.2.1. Elipsometre Analizi	49
4.2.2. Atomik Kuvvet Mikroskobu Analizi	51
4.2.3. FTIR-ATR Analizi	53
4.2.4. Temas Açısı Ölçümleri	56
4.3. SPR Nanosensörlerle Kinetik Analizler	56
4.4. Denge İzoterm Modelleri	72
4.5. Yarışmalı kinetik analizler.....	77
4.6. DFC baskılanmış sensörün baskılama seçiciliğinin belirlenmesi.....	80
4.7.DFC baskılanmış SPR sensörün tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi.....	84
5. YORUM	85
6. KAYNAKLAR	87
7. ÖZGEÇMİŞ	96

ÇİZELGELER

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Moleküler baskılanmış polimer sentezinde kullanılan bazı fonksiyonel monomerler	23
Çizelge 2.2. Moleküler baskılanmış polimerin hazırlanmasında kullanılan çapraz bağlayıcılar.....	25
Çizelge 2.3. Sucul ortamda bulunan bazı ilaçlar	34
Çizelge 2.4. Etken madde olarak Diklofenak içeren piyasa ürünleri.....	37
Çizelge 4.1. Boş SPR çipinin yüzeyi, Diklofenak baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensör yüzeylerinin temas açıları.....	56
Çizelge 4.2 Kinetik hız sabitleri	72
Çizelge 4.3. Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich parametreleri.....	75
Çizelge 4.4. Diklofenağa göre karbamazepin için seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları.....	83

ŞEKİLLER

		<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1.	Nano boyuttaki bazı ilgili örnekler	4
Şekil 2.2.	Dielektirik sınırlarında gerçekleşen toplam iç kırınım	13
Şekil 2.3.	Hava, cam ve yüzey plazmonları için dağılıma eğrileri.....	15
Şekil 2.4.	Gümüş ve altına ait yüzey plazmon eğrileri	16
Şekil 2.5.	Tipik bir SPR biyosensör sensorgramının şematik gösterimi.....	18
Şekil 2.6.	Moleküler baskılama tekniğinin basamakları	21
Şekil 2.7.	Yaygın olarak kullanılan başlatıcılar.....	26
Şekil 2.8	Kovalent baskılamanın şematik gösterimi].....	27
Şekil 2.9	Non-kovalent baskılamanın şematik gösterimi	28
Şekil 2.10.	Non- kovalent baskılama mekanizmasının farklı derecelerde bağlanma özellikleri.....	28
Şekil 2.11	İlaç kalıntılarının çevreye yayılma profili.....	34
Şekil 2.12	Diklofenak sodyumun kimyasal şekli.....	35
Şekil 3.1.	Allil merkaptan ile yüzey modifikasyonu ve allil gruplarının bağlanması.....	41
Şekil 3.2.	Nanofilm EP3 elipsometre cihazı.....	43
Şekil 3.3.	Krüss DSA100 temas açısı cihazı.....	44
Şekil 3.4.	GenOptics SPRiLab sistemi.....	46
Şekil 3.5.	Karbamazepinin şekli.....	47
Şekil 4.1.	DFC: MAA monomer oranının belirlenmesi; DFC: MAA monomerinin mol oranları (1:7; 1:8; 1:9; 1:10, 1:11).....	48
Şekil 4.2.	DFC tanıma bölgelerine sahip nanofilmin elipsometrik ölçümde alınan 3 boyutlu görüntüsü	50
Şekil 4.3.	Boş altın yüzey temas açısı ölçüm fotoğrafı	51
Şekil 4.4.	DFC baskılanmış SPR çiplerin yüzey temas açısı fotoğrafları.....	52
Şekil 4.5.	DFC baskılanmamış SPR çiplerin yüzey temas açısı fotoğrafları	52
Şekil 4.6.	SPR çipindeki nanofilmin FTIR-ATR spektrumu	53
Şekil 4.7.	Boş altın yüzey (a), diklofenak baskılanmış SPR sensör yüzeyi (b) ve diklofenak baskılanmamış SPR sensör yüzeyi (c) temas açısı fotoğrafları.....	55

Şekil 4.8.	Değişik derişimlerde diklofenak çözeltilerinin SPR sensörlere uygulanması ile elde edilen % kırılmaya karşılık zaman grafikleri: (a) 0.005 µg/mL; (b) 0,01 µg/mL; (c) 0.025 µg/mL; (d) 0.05 µg/mL; (e) 0.1 µg/mL; (f) 0.5 µg/mL; (g) 1.0 µg/mL; (h) 2.0 µg/mL; (ı) 3.0 µg/mL; (i) 5.0 µg/mL (j) 10.0 µg/mL	66
Şekil 4.9.	Diklofenak çözeltileri ile SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait % kırılma zaman grafiği	66
Şekil 4.10.	Farklı derişimlerdeki diklofenak çözeltilerinden elde edilen zamana karşı ΔR derişimlerini gösteren grafikler: (a) 0.005 µg/mL; (b) 0,01 µg/mL; (c) 0.025 µg/mL; (d) 0.05 µg/mL; (e) 0.1 µg/mL; (f) 0.5 µg/mL; (g) 1.0 µg/mL; (h) 2.0 µg/mL; (ı) 3.0 µg/mL; (i) 5.0 µg/mL (j) 10.0 µg/mL	65
Şekil 4.11.	Farklı derişimlerdeki diklofenak çözeltileri ve SPR sensör arasındaki etkileşimlere	69
Şekil 4.12.	Diklofenak baskılanmış SPR nanosensör ve ΔR arasındaki ilişki.....	72
Şekil 4.13.	Kinetik hız sabitlerinin belirlenmesi. (a) Denge analiz yaklaşımı (Scatchard); (b) Bağlanma kinetik yaklaşımı	73
Şekil 4.14.	Adsorpsiyon modelleri. (a) Langmuir; (b) Freundlich; (c) Langmuir-Freundlich	75
Şekil 4.15.	Diklofenak ve kabzaminin tekli ve ikili çözeltileri ile SPR sensör arasındaki % ΔR -zaman grafikleri.....	78

Şekil 4.17.	Diklofenak ve karbamapazin çözeltileri ile diklofenak baskılanmamış SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait kırılma-zaman grafikleri.....	81
Şekil 4.18.	Diklofenak ve karbamapazin çözeltileri ile diklofenak baskılanmamış SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait ΔR -zaman grafikleri.....	82
Şekil 4.19.	Diklofenak baskılanmış SPR sensörün tekrar kullanılabilirliği.....	84

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

nm	Nanometre
μm	Mikrometre
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
pg	Pikogram
ng	Nanogram
mg	Miligram
g	Gram
ml	Mililitre
μl	Mikrolitre

Kısaltmalar

MAAD	Metakrilik asit diklofenak kompleksi
SPR	Yüzey plazmon rezonans

1.GİRİŞ

1959 yılında Richard Feynman'ın "Aşağılarda daha çok yer var" adlı konuşmasıyla, maddenin daha küçük ölçeklerde kontrol edilip kullanılma fikriyle nanoteknolojinin temelleri atılmış oldu. 100 nm'den küçük malzeme, araç ve sistemlerin kullanılması, oluşturulması ve çalıştırılmalarını kapsayan nanoteknoloji son yıllarda hızla gelişen bilim dalı olarak karşımıza çıkmaktadır. Nanoteknolojinin bu denli hızlı gelişmesinin nedenlerinden biri elde edilen ürünlerin, klasik yığın malzemelerde gözlenmeyen ancak teknolojiye ihtiyaç duyulan pek çok fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olmalarıdır. Nano boyutlara inildikçe malzemelerin kazandığı eşsiz özellikleri sayesinde, sağlık, temiz enerji, katalizör, sensör, polimer, elektrot, bilgi depolama, boya, süper akışkanlar, ulusal güvenlik gibi birçok alanda nanoteknolojik ürünler tercih edilmektedir.

Biyosensörler, biyomoleküller arasındaki özgün etkileşimleri temel alan biyomoleküllerin sabit özelliklerinin yanı sıra, farklılıklarını da anında ve yüksek hassasiyette saptamaya yarayan optik, elektrokimyasal, piezoelektrik vb. yapıdaki aletlerdir. Biyosensörler, tanıyıcı bölüm, tanıyan ile tanınan arasındaki etkileşimi elektrik sinyaline dönüştüren çevirici bölüm ve elektronik bölüm olmak üzere üç ana bileşenden oluşur. Geleneksel analitik tekniklerle karşılaştırıldığında biyosensörler, hızlı ve gerçek zamanlı tespit, düşük maliyet, taşınabilirlik, basit kullanım, örnek hazırlama işleminin kolaylığı gibi birçok özelliğe sahiptir. Sahip olduğu bu avantajlardan ötürü biyosensörler sağlık alanında (tanı ve teşhiste), çevresel analizlerde, eczacılık, gıda, kimya, madencilik ve savunma sanayii gibi alanlarda sıklıkla kullanılmaktadır [1].

Yüzey plazmon rezonans (SPR), moleküllerin etkileşimlerinin incelenmesinde kullanılan bir yöntemdir. SPR biyosensörleri, sensör yüzeyindeki ve çözeltideki moleküllerin etkileşimlerini molekülleri etiketlemeye gerek kalmadan, kompleks oluşumu ve ayrılmaları, kırılma indisindeki değişimlere bağlı olarak ölçerek belirler. Etkileşimler gerçek zamanlı olarak izlenebilir ve bağlanan ligandın miktarı belirlenip ayrılma (koff) ve bağlanma sabitleri (kon) yüksek duyarlılıkla ölçülebilir. SPR yöntemi son yıllarda biyosensör uygulamalarında yerini almış, protein, oligonükleotit, faj, viral partiküller ve hatta canlı hücrelerin de bulunduğu farklı biyolojik sistemlerdeki etkileşimleri çalışmak için kullanılmaktadır [2].

Moleküler baskılama tekniği, çapraz bağlı polimer matriks içerisinde kalıp molekülün boyut ve Őekliini tanıma özelliğine sahip boŐluklar oluşturulması temeline dayanmaktadır. Kalıp molekülünün desorpsiyon yöntemiyle uzaklaştırılması, sabit pozisyonlardaki fonksiyonel monomer grupların açığa çıkmasını sağlanarak, kalıp moleküle eŐlenik bir yapı oluşturmaktadır. Moleküler baskılama tekniğinde kalıp molekülü olarak, aminoasitler, hormonlar gibi biyolojik moleküllerin yanı sıra, çeşitli kirleticiler, ilaçlar ve, mikroorganizmalar kullanılmaktadır. Moleküler baskılanmış malzemeler, kalıp molekülü için eşsiz bir seçiciliğe sahip olmalarının yanı sıra mekanik strese, organik çözücülere, suya, ısıya ve farklı pH aralıklarına karşı dirençli bir yapıya sahiptirler [3].

İlaçlar, evresel sulardaki varlıkları nedeniyle son zamanlarda dikkat çeken önemli kirleticilerdir. Bu ilaçlara en tipik örnek olan diklofenak steroid olmayan önemli bir anti- inflammatuar bir ilaçtır. Diklofenak romatizmal ağrılarda ve akut yaralanmalarda ağrı kesici olarak sıklıca kullanılmaktadır. Yüksek dozda alınımı ve düşük biyo-çözünürlüğe sahip olması yeraltı ve içme sularında, atık su arıtım fabrikalarının çıkış suyunda yüksek miktarda bulunmasına neden olmuştur. Bu molekülün düşük derişimlerde bile toplum ve evre üzerinde ki etkisi oldukça fazladır.

Bu alıŐma kapsamında diklofenak tanıma bölgelerine sahip SPR sensörler hazırlanmıştır. SPR yüzeyinde diklofenak tanıma bölgeleri hazırlamak için metakrilik asit (MAA) monomer olarak kullanılmıştır. Hazırlanan SPR çiplerinin yüzeyinin karakterizasyonu atomik kuvvet mikroskobu (AFM), elipsometre, temas açısı ve FTIR-ATR spektrofotometre analizleri ile yapılmıştır. SPR sensörün kararlılığı, seçiciliği ve tekrar kullanılabilirliği incelenmiŐtır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nanoteknoloji

İnsanoğlunun yaşam kalitesini arttırmak, gündelik hayatını kolaylaştırmak, zaman ve para tasarrufu sağlamak amacıyla teknoloji alanında her geçen gün yeni gelişmelerle karşılaşmaktayız. Son yıllarda hızla gelişen teknoloji alanlarında biri de nanoteknoloji olmuştur. Nanoteknoloji, kimya, fizik, biyoloji, mühendislik, eczacılık, tıp ve veterinerlik gibi farklı disiplinler için araştırma konusu olmuştur.

Nanoteknoloji kavramı, Yunancada “cüce” anlamına gelen nano ile teknoloji kelimelerinin birleşiminden oluşmaktadır. Nano ile tanımlanan ifadeler, herhangi bir ölçünün milyarda birini ifade etmek için kullanılır. Nanometre ise metrenin milyarda birini ($1\text{nm} = 10^{-9}$) ifade etmektedir. Bu büyüklükte yaklaşık olarak ard arda dizilmiş 5-10 atom boyutundadır. Daha da somut ifade etmek gerekirse karınca başının genişliği bir milyon nanometre, insan saç telinin kalınlığı 100.000 nanometre, biyolojik hücrelerin çapı 1.000 nanometre, DNA molekülleri 2.5 nanometredir [4,5]. Şekil 1’de nanometre boyutunu anlatan örnekler verilmiştir.



Şekil 2.1. Nano boyuttaki bazı ilgili örnekler.

Nanoteknoloji, 1-100 nm arasında atom ve moleküler seviyede çalışarak, değişen fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip malzemelerin ve yapıların moleküler düzeyde işlenmesi, oluşturulması ve manipüle edilmesi olarak tanımlanmaktadır. Nanoteknolojinin son 15 yılda hızla gelişmesinin nedeni nano boyutlara inildikçe maddenin kazandığı yeni kimyasal ve fiziksel özellikler sanayi ve teknolojiye ihtiyaç duyulan özellikler olmasıdır. Bu özellikler arasında esneklik, ısı ve elektrik iletkenliği, manyetik ve optik özelliklerinde önemli ölçüde azalma ve artma yer almaktadır. Bu farklı özellikleri ortaya çıkaran nedenlerden biri parçacık boyutu küçüldükçe malzemede yüzey-hacim oranlarının artmasıdır. Diğer bir nedeni ise nano boyutlara

inildikçe valans ve iletim bantlarındaki durum yoğunluklarının değişmesine neden olan kuantum boyut etkileridir [6,7].

2.1.2. Nanoteknolojinin Uygulama Alanları

Yeni gelişen bir bilim dalı olmasına rağmen günlük hayatımızda sıklıkla karşılaştığımız ürünlerin pek çoğu nanoteknolojiyle üretmektedir. Nanoteknolojik ürünlerin yüksek hassasiyet, alışıldandan farklı özellikler sergileyerek, daha dayanıklı ve hafif olmaları aynı zamanda da az enerji ve malzeme kullanılarak üretilmiş olmaları teknolojinin her alanından sıklıkla tercih edilme nedeni olmuştur. Günümüzde nanoteknolojik ürünlerin uygulama alanlarını şu şekilde sıralayabiliriz.

2.1.2.1. Tıp ve Sağlık Alanında Nanoteknoloji

Tıp ve sağlık alanında nanoteknolojinin en büyük hedefleri arasında biyolojik sistemlerin korunması, tedavisi, tanı ve teşhislerinin yanı sıra etkin görüntüleme sistemlerinin geliştirilmesinde ve tüm bunları moleküler seviyede üretilmiş cihaz ve nano-yapılardan yararlanılarak yapılması gelmektedir. Nanoteknoloji ürünü olan yapıların en büyük avantajı 1-100 nm aralığında olmalarıdır. Bu sayede biyolojik sistemlerde çalışma şansı artmıştır. Örneğin ilaç taşıma sistemleri hem hücre yüzeyinde hem de hücre içiyle etkileşebilmelidir. Bu nedenle nano-ilaç taşıma sistemleri; sadece nanometre boyutlarındaki kemoterapik ilaçları taşımamalı aynı zamanda da, hücre içerisine girip tek seferde ilacı yaymalıdır. İlaç taşıma sistemlerinin yanı sıra nanorobotik sistemlerin üretimi, yapay doku ve organ üretimi, implant yapılarının tasarlanması nanoteknolojinin soluk bulunduğu yeni alanlar arasındadır [8,9]

2.1.2.2. Çevresel ve Tarımsal Uygulamalarda Nanoteknoloji

Nanoteknolojik yaklaşımlarla elde edilen ürünler sağlıktan sonra en yaygın olarak çevresel uygulamalarda karşımıza çıkmaktadır. Literatüre yeşil nanoteknoloji olarak girmiş uygulamalar bulunmaktadır. Bu uygulamaların başında su ve toprak örneklerindeki mikrobiyal, kimyasal ve ilaç kirleticilerinin analizleri için kullanılan sensörler gelmektedir. Geleneksel analiz yöntemlerine oranla hızlı cevap vermesi, daha ucuza mal olması, düşük derişimlerde dahi cevap vermesi bu sensörlerin tercih nedenleri olmuştur. Nanopartiküller gibi çeşitli nanomalzemeler kullanılarak atık

suların iyileştirilmesi ve su arıtım sistemlerinde etkin arıtım oluşumunun sağlanması hedeflenmektedir.

Hassas tarım uygulamalarında küresel uydu konumlandırma sistemleri ve uzaktan algılama cihazları sayesinde yerel çevre koşullarının belirlenerek tohumlama, sulama, hasat için uygunluğunun ölçülmesi, yeni ilaç ve gübrelerle bitkilerin sağlıklı ve daha verimli olmasının sağlanması, daha besleyici ve hastalık direnci yüksek bitkileri eldesi, yüksek kalite ve güvenlikte hayvansal ürünlerin eldesi nanoteknolojinin zirai alanlarda uygulanma noktalarını oluşturmaktadır [10].

2.1.2.3. Tekstil Sanayide Nanoteknoloji

Pek çok alanda olduğu nanoteknoloji tekstil alanında da karşımıza çıkmaktadır. Peki nanoteknoloji giydiğimiz bir elbisede ne işe yarar, neyi hedefler? Tekstilde en büyük hedef kırışmaz, hava alabilen, kir tutmayan, antimikrobiyal olan, mekanik, kimyasal, ışık ve ısıya karşı dayanıklı olan giysi ve diğer tekstil ürünlerini elde etmektir. Goodweave Textiles Co. Ltd üreticileri tarafından üretilen nano-gümüş antibakteriyel ve deodorantlı ayakkabı tabanları sayesinde terleyen ve aşırı koku çıkaran mantar oluşumuna yatkın ayaklara sahip bireyler için elzem ve pratik çözüm getirmiştir. Gümüş parçacıklarındaki anti-bakteriyel ve anti-fungal özelliklerden yararlanılarak üretilen bu tabanlıklar kaşıntı mantar ve kötü koku oluşumunu engellemektedir [8].

2.1.2.4. Uzay ve Havacılıkta Nanoteknoloji

Her geçen gün uzay araştırmalarıyla ilgilenen bilim insanı sayısı ve devletin bu alan için ayırdığı bütçe artmaktadır. Yapılan çalışmalarının kalitesini arttıracak gelişmeler sunan nanoteknolojiden uzak durmak uzay ve havacılık çalışmalarında neredeyse imkansız hale gelmiştir. Özellikle enerji depolamada, mekanik sistemlerde ve sensörlerde kullanım alanı bulan karbon nanotüpler bu alanda en çok tercih edilen nanoteknolojik ürün olmuştur. Sağladığı üstün özelliklerden dolayı Boeing 787 ve Airbus A380 gibi ticari uçaklarda karbon nanotüplerin kullanım oranı her geçen yıl artacaktır. Karbon nanotüplerin hafifliği, termal özelliği, manevra kabiliyeti gibi özellikleri sayesinde yeni nesil uçakların, rotorlu uçakların, insansız hava araçlarının ve füzelerin pek çok gereksinimini karşılayacaktır. Karbon nanotüpler özellikle uçak gövdesinde ve elektrik devrelerinde şuan kullanılan materyallerin yerini alacaktır.

Ayrıca karbon nanotüplerin uçaklardaki potansiyel uygulama alanlarının arasından uçak buzlanmasının önlenmesi, yıldırımdan koruma, itme ve güvenli görüş sistemleri yer almaktadır [11].

2.1.2.5. Biyoteknolojide Nanoteknoloji

Nanobiyoteknoloji, nanoteknolojinin ve biyoteknolojinin araştırma ve uygulama alanlarının çakışmasıyla son yıllarda ortaya çıkan yeni bir çalışma alanıdır. Nanobiyoteknolojinin temel amaçlarından biri moleküler biyoloji çalışmalarında biyolojik sistemlerin çalışma prensiplerini ile ilgili önemli bulguları ortaya koymaktır. Böylece mikro ve nano ölçekli üretim yöntemleri kullanılarak biyolojik ve biyomedikal cihazların küçültülmesini ve yeni cihazların üretiminin biyoteknoloji endüstrisine gelecekte yeni bir şekil kazandırması hedeflenmektedir. Ayrıca nanobiyoteknolojinin hedeflediği araştırma ve üretim alanlarının arasında nano-biyomoleküler cihazlar ve analiz yöntemleri nano ölçekli hücre biyolojisi ve hücre–yüzey etkileşimleri de bulunmaktadır. Hücrelerin büyüklükleri mikrometre ölçeğinde olsa da, hücrelerin çevresiyle etkileşimi ve bu çevrenin elemanları nanometre ölçeğindedir. Bu etkileşimleri ve hücreleri tek tek incelemek, onlar üzerinde bütünlüklerini bozmayacak müdahalelerde bulunabilmek ve tıbbi/biyolojik çıktıları en üst düzeyde hassas teknolojik gelişme seviyesine ulaşmak için yapılacak çalışmalarda nanometrik ölçekte olması gerekmektedir. İleri fizik ve mühendislik araştırmaları sayesinde her geçen gün alet ve cihazlar kullanılarak canlı hücreleri nanometre düzeyinde gözlemlemek ve ölçümler yapmak mümkün olmaktadır. Ayrıca her geçen gün nano ve mikro ölçekte ölçüm yapabilen yeni aletler uygulamalar eklenmektedir. Örneğin birçok proteini kapsayan analizlerin yanı sıra hücre işlevlerini, ilaç etkilerini eş zamanlı incelemek ve farklı ilaçların canlı hücre işlevine etkilerini görüntülemek artık yapılabirlik sınırları arasındadır. Bu ve benzeri çalışmalarda nano-parçacıklar, nano-üretim sonucu elde edilmiş aletler ve moleküler tasarım bilgileri kullanılmaktadır. Ayrıca hücre biyolojisi, ileri fizik ürünü mikroskoplar ve ölçüm cihazları ile araştırılabilmektedir. Örneğin atomik kuvvet mikroskobu kullanılarak DNA üzerindeki dizisel değişiklikler nanometre çözünürlüğünde gözlenebilmektedir [12,13]. Her geçen gün gelişecek ve ilerleyecek olan nanoteknoloji sayesinde nanobiyoteknoloji uygulamalarına verilecek örnekler artacaktır. Bugün hayal edilmesi güç olan bazı şeylerin gelecekte nanoteknoloji ve nano-ürünler sayesinde imkansız olmaktan kurtulacaktır.

2.2. Biyosensörler

Fiziksel olguları elektriksel sinyale dönüştüren cihazlara sensör denilmektedir. Mekanik duyu organları da diyebileceğimiz bu sensörler çalışma şekillerine ve dönüştürücü adı verilen yapılarına göre sınıflandırmak mümkündür. Bu sınıflandırmaya örnek olarak termal, mekanik, kimyasal, akustik, radyoaktif sensörler ve biyosensörler verilebilir.

Biyosensörler, Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) terminolojisine göre, "kimyasal bir bileşiğe karşı verilen biyolojik yanıtı optik, termal ya da elektriksel sinyallere dönüştüren cihazlar" olarak tanımlanmıştır. Bu tanımlı biraz daha açacak olursak; biyosensörler hedef analitlerin denetmek amacıyla yapısında biyolojik bir duyargacı bulunan ve bir fizikokimyasal çeviriciyle birleştirilmiş analitik cihazlardır. Biyosensörün amacı, analiz edilecek maddenin miktarıyla orantılı olarak elektrik sinyali üretmektir [14,15].

Biyosensör sistemlerinin bileşenlerini üç ana başlık altında toplayabiliriz. Bu bileşenlerden ilki tanıma özelliğine sahip biyoajanlar, bir diğeri tanıma bölgesi ile incelenen analitin etkileşmesi sonucu oluşan fizikokimyasal sinyalleri elektronik sinyallere dönüştürebilen çevirici ve üçüncü olarak da elektronik bölümlerdir [14].

Hızla gelişen teknolojiye biyosensörler pay almıştır. İlk yapılan biyosensörden bu yana hem analizi yapılan analitlerin sayısı hem de biyosensörlerin çeşitliliği hızla artmaktadır. Bu artış aynı zamanda biyosensörlerden elde edilen başarıya da bağlıdır. Bugün, vücut sıvılarındaki analizlerden tutun da gıdalar ve çevre kimyasal bileşiklerin, toksinlerin veya patojenlerin analit olarak kullanıldığı analizlerin çoğu biyosensörlerle gerçekleştirilmektedir. Etkin bir biyosensörde bulunması gereken özellikleri şöyle sıralayabiliriz [16].

- **Duyarlılık:** Biyosensörün analit derişimindeki değışime verdiği cevaptır. Duyarlılık yüksek ise analitteki birim değışim sensörün ekranında hemen belli olur.
- **Seçicilik:** Biyosensörün sadece tespiti istenilen analite özgün olması, analite yapısal olarak yüksek benzerlikleri olan başka moleküllere cevap vermemesidir.

- **Ölçüm aralığı:** Biyosensörün ölçebildiği analit miktarıdır. Bir biyosensör hazırlanırken, analitin bulunduğu ortamdaki en düşük ve en yüksek konsantrasyon değerleri belirlenmelidir. Tespit aralığında olmayan analit derişimleri için doğru ölçümler alınamaz.
- **Ölçüm süresi:** Biyosensörün analitin varlığını tespit ettiği süredir. Bu sürenin kısalığı geleneksel yöntemler karşısında kazanılmış bir üstünlüktür.
- **Kararlılık:** Birkaç tekrarlı yapılan analizlerde biyosensörün verdiği cevapların (sinyal) birbirleriyle örtüşmesidir.
- **Raf ömrü:** Biyosensörlerin diğer analiz cihazları karşısında gösterdiği üstünlüklerde biri de tekrar kullanılabilirliğinin yüksek olmasıdır. Her kullanımında yaptığı analizlerin doğru sonuç vermesi, kullanıcılarına ticari anlamda da avantaj sunmaktadır [11,12].

2.2.1.Biyosensörlerin Sınıflandırılması

2.2.1.1. Tanıma Elemanlarına Göre Biyosensörler

2.2.1.1.1. Enzimler

Tarihteki ilk biyosensör çalışmalarına baktığımızda enzim biyosensörü olan ve 1962'de Clarrk ve Lyons ve 1967'de Updike ve Hick tarafından hazırlanan glukoz tayinine yönelik glukoz oksidaz enzim elektrotları karşımıza çıkmaktadır. Hazırlanan biyosensörde enzimlerinin bilinen en iyi biyoreseptör olmaları ve analitlere olan özgünlüğü kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Günümüzde ilerleyen enzim çalışmaları ve keşfedilmeyi bekleyen enzimler, yeni enzim biyosensörlerinin müjdecisi olacaktır. Ancak unutulmamalıdır ki enzim çalışmalarında olduğu gibi biyosensörlerde de enzimleri kullanırken ortamın pH, ısı, iyonik şiddet ve diğer çevre koşullana dikkat edilmelidir [17,18,19].

2.2.1.1.2. Antikorlar

Glikoprotein olan antikorlar kan proteinlerinin %20'sini oluştururlar ve immünoglobulinler diye de adlandırılırlar. Y şeklinde olup iki adet antijen tanıma bölgesine sahiptirler. Her antikorun kendine özgü antijen tanıma bölgeleri vardır. Bu tanıma bölgelerine kovalent olmayan ancak güçlü bir şekilde geçici olarak bağlanırlar [20,21]

Kullanım amaçlarına bağı olarak antikorların modifiye edilebilmeleri sahip oldukları diğer bir avantajdır. Üretim şekillerine göre poliklonal ve monoklonal olmak üzere ikiye ayrılırlar. Rekombinant antikorlar, antikorların antijene bağlanma bölgelerindeki domainleri genetik olarak manipüle edilen yapılardır. Üstelik rekombinant antikorları üretmekte daha ucuz ve hızlıdır.

Antikor temelli biyosensörler kullanılarak, HIV, Hepatit B, Hepatit C, Ebola, EBV, Rubeola, Measles, *Salmonella typhimurium*, botulinum toksinlerinin tespitinde ve tanımlanmasında kullanılmaktadır. Benhar ve arkadaşları, tek zincirli antikorla kapladıkları karbon elektrotlu elektrokimyasal biyosensör ile *Listeria monocytogenes* ve MtKatG enzimi eksprese eden *M. tuberculosis*'i tesbit etmişlerdir [22,23].

2.2.1.1.3. Mikroorganizmalar

Mikroorganizmalar, genellikle zehirli kimyasalların veya kendi varlıklarının tespitinde sıklıkla kullanılabilir. Gıda, su, toprak ve vücut sıvıları gibi örneklerin çoğunda rastlanması ve tespitine ihtiyaç duyulması mikrobiyal kaynaklı biyosensörlerin geliştirilmesini sağlamıştır. Genetik modifikasyonlardaki uyumu bu sensörlerin hazırlanmasındaki önemli avantajlar arasındadır [24,25].

2.2.1.2. Dönüştürücülerine Göre Sınıflandırma

2.2.1.2.1. Optik Sensörler

Optik biyosensörler, dönüştürücü sistem olarak optik lifler üzerine uygun bir yöntemle molekülün immobilize edilmesiyle hazırlanan ölçüm aygıtlarıdır. Ortamda meydana gelen fizikokimyasal ya da kimyasal değişimi sinyal, ışık yansımaları, saçılımı ya da yayımı sonucu meydana gelir. Örneğin optik lifin üzerine enzim immobilizasyonu ile hazırlanan optik esaslı enzim sensörleri temelde absorpsiyon, floresans, biyoluminesans gibi temel ilkeler çerçevesinde işlev görürler [17].

2.2.1.2.2. Elektrokimyasal Sensörler

Elektrokimyasal sensörler sanayi, trafik, çevre ve medikal görüntüleme, metabolizmanın araştırılması ve biyolojik süreçlerin kontrolünde sıklıkla kullanılan sensörlerdir. Bu sensörler örnekleme ihtiyacı duymadan kimyasalların *in situ* ölçümünde gerçek zamanlı bilgi veren güçlü aletlerdir. Kullanılan elektrota bağlı

olarak elektrokimyasal sensörler -30°C ile 1600°C arasındaki sıcaklıklarda kullanılabilirler. Elektrokimyasal sensörler kendi aralarında amperometrik veya potansiyometrik modda kullanılırlar [26].

2.2.1.2.3. Piezoelektrik Sensörler

Piezoelektrik materyalleri ve yüzey akustik dalga cihazları kütle değişimine karşı son derece hassastır. Eğer biyoreseptörde tanıma reaksiyonu sonrasında kütle artışı oluyor ise, bu tip dönüştürücüler için uygundur. Mesela kuvars kristal mikroterazi (QCM) adı da verilen piezoelektrik silikon kristalleri hali hazırda pikogramlık kütle değişimlerini bile hissedebilmektedirler. QCM sensörleri çevre için büyük risk taşıyan 17β östradiolün tayininde yapılmıştır [27].

2.3. Yüzey Plazmon Rezonans

1902 yılında Wood ilk kez yüzey plazmon olgusunu ortaya koyarken, polarize ışığın bir kırılım düzenleyici yüzeyinden bir aynaya yansıttığı zaman aynada karanlık ve aydınlık bantlar oluştuğunu tespit etmiştir. Bu çalışmanın ardından Lord Rayleigh ve Fano bu teorinin gelişimine katkıda bulunsalar da yüzey plazmon rezonans olgusu tam olarak 1968 yılında tam olarak anlaşılmıştır. 1968 yılında Otto [28], Kretschmann ve Raether [29] tarafından yüzey plazmonların oluşumun rapor etmişlerdir. Yüzey plazmon rezonans ile ilgi meydana gelen gelişmeler, yüksek seçicilikte sensörlerin hazırlanmasını mümkün kılmıştır. SPR temelli ilk biyosensör Liedberg ve arkadaşları tarafından hazırlanmıştır. Bu çalışmanın ardından, bu konu ile ilgili yapılan çalışmaların sayısı her geçen gün artmaktadır [30,31]. Yüzey plazmon rezonans, metal yüzeye yakın kırılma indisindeki değişimi ölçerek basit ve doğrudan ölçüm yapan bir tekniktir.

Yüzey plazmon yönteminde geçirgen ve farklı kırılma indisli iki ortam arasında (cam prizma ve çözelti) ince bir metal film kullanılır. Metal film genellikle altın veya gümüştür. Kritik bir açının üzerinde düzlem polarize ışık, yüksek kırılma indisli bir ortama girdiğinde (cam prizma) toplam iç yansımaya uğrar. Bu koşullarda kendiliğinden sönümlü dalga adı verilen ışık, metal filmin içine nüfuz eder. Belli bir kırılma açısında bu dalga, metal yüzeydeki serbest elektronların yüzey plazmonları oluşturmasına sebep olur ve yansıyan ışığın yoğunluğu düşer. Bu olaya yüzey plazmon rezonans denir ve sadece rezonans açısı denilen belli bir açıda gözlenir.

Rezonans açısı yüzeye analit eklenmesiyle değişir. Bu değişim yüzeyin hedef molekülüne göre modifiye edilmesiyle bu moleküle seçici olması sağlanır. Bu durumda da SPR biyosensörlerin temelini oluşturmaktadır.

2.3.1. Yüzey Plazmon Rezonans Teorisi

Yüzey plazmon rezonansın (SPR) teorisi, enerji taşıyan ışık fotonunun metalin elektronları ile birleşmesi veya enerji transferi ilkesine dayanmaktadır. Birleşmenin (veya enerji transferinin) gerçekleştiği ışığın geliş açısı her metal ve metal yüzeyinin çevresine göre değişmektedir. Işık fotonları ve metal yüzeyindeki elektronlar arasında bir eşleşme ve/veya rezonans yakalandığında enerji transferi gerçekleşir. Bu enerji transferi, metal filmin alt yüzeyinden yansıyan ışığın miktarının ölçülmesiyle belirlenebilir. Her ışık birçok açıda yansırken, ışığın bir bölümü rezonans açısında absorplanmaktadır.

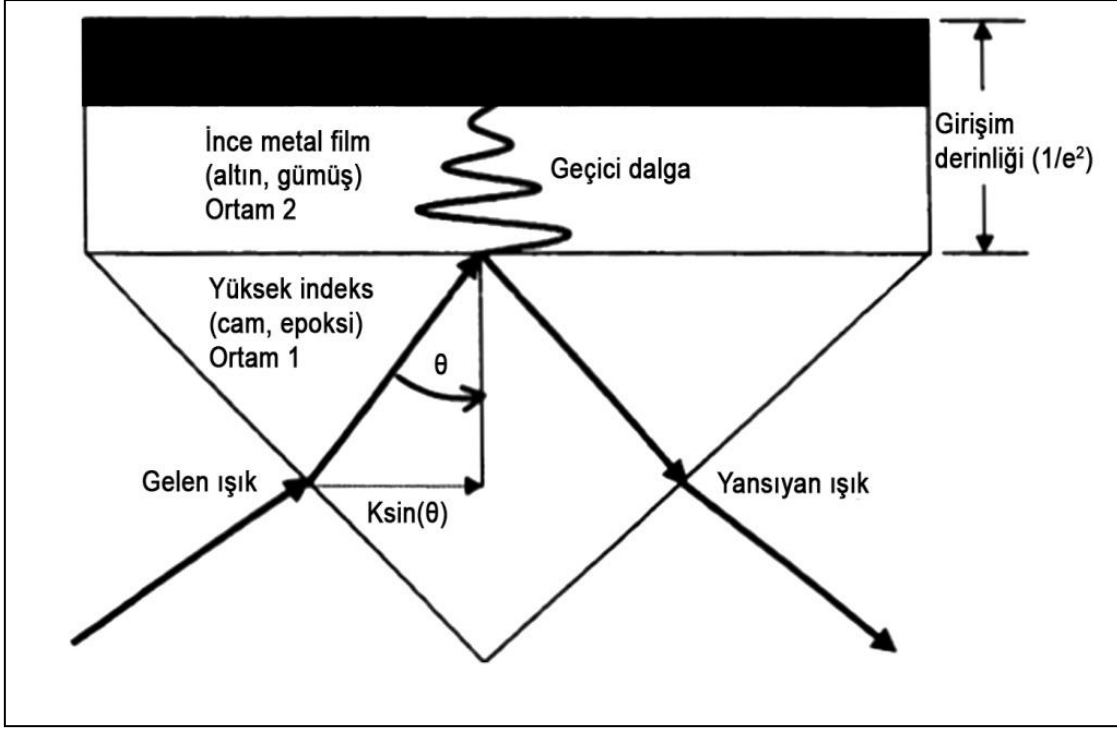
Kretschmann prizma yapısı, SPR prizmalarının hazırlanmasında en sık kullanılan tasarımdır. Şekil 2.2 görüldüğü gibi, metal film yüzeyindeki yük yoğunluk salınımı uyaran ışık demetinin toplam iç kırılması ile oluşan ve kendiliğinden sönümlü dalganın kullanıldığı bir yaklaşım vardır. Bu elektron salınımları, yüzey plazmonları olarak adlandırılmaktadır. Geçici alanın girişim derinliği ışığın dalga boyuna, ışığın geldiği ortam ile çevresinin kırınım açısı indekslerinin oranına ve fotonun parlaklığına bağlıdır. Enerji alanı yüzeyden uzaklaştıkça üstel olarak azalmaktadır. Bundan dolayı, girişim derinliği aniden düşmektedir.

Girişim derinliği aşağıdaki eşitlikle tanımlanmaktadır:

$$d_p = \frac{\lambda}{4\pi \sqrt{\eta_1^2 \sin^2 \theta - \eta_2^2}} \quad (2.1)$$

Burada;

- η_1 ve η_2 , birinci ve ikinci ortamın kırınım açısı indeksi,
- θ , ışığın metal yüzeye geliş açısıdır.



Şekil 2.2. Dielektrik sınırlarda gerçekleşen toplam iç kırınım.

Metal yüzeye uygun p-polarize ışık, metal film ile birleşmek için prizmanın içerisine girer. Sadece p-polarize ışık plazmon oluşumuna sebep olmaktadır. Bunun nedeni sadece bu polarizasyonun metal film normaline uygun elektrik alan vektör salınımına sahip olmasıdır. Bu özellik, metal yüzeyindeki elektron plazmalarının transvers manyetik (TM) dalgası olarak adlandırılmaktadır [28,29]. Oysa s-polarize, transvers elektrik (TE) polarizasyonu yüzey plazmonlarını oluşturamamaktadır. Çünkü s-polarize ışığın elektrik alan vektörü, metal filme paralel olarak oluşmaktadır. Salınımların dalga vektörü (K_{sp}) aşağıdaki eşitlikle tanımlanır:

$$K_{sp} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_m \epsilon_s}{\epsilon_m + \epsilon_s}} \quad (2.2)$$

Burada;

- ω , salınımın frekansı,
- c , ışık hızı,

- ϵ_s , metal yüzeyine temas eden örnek ortamının dielektrik fonksiyonu,
- ϵ_m , metalin dielektrik fonksiyonudur.

Gelen ışığın bir bileşenine ait dalga vektörü aşağıdaki eşitlikle tanımlanır:

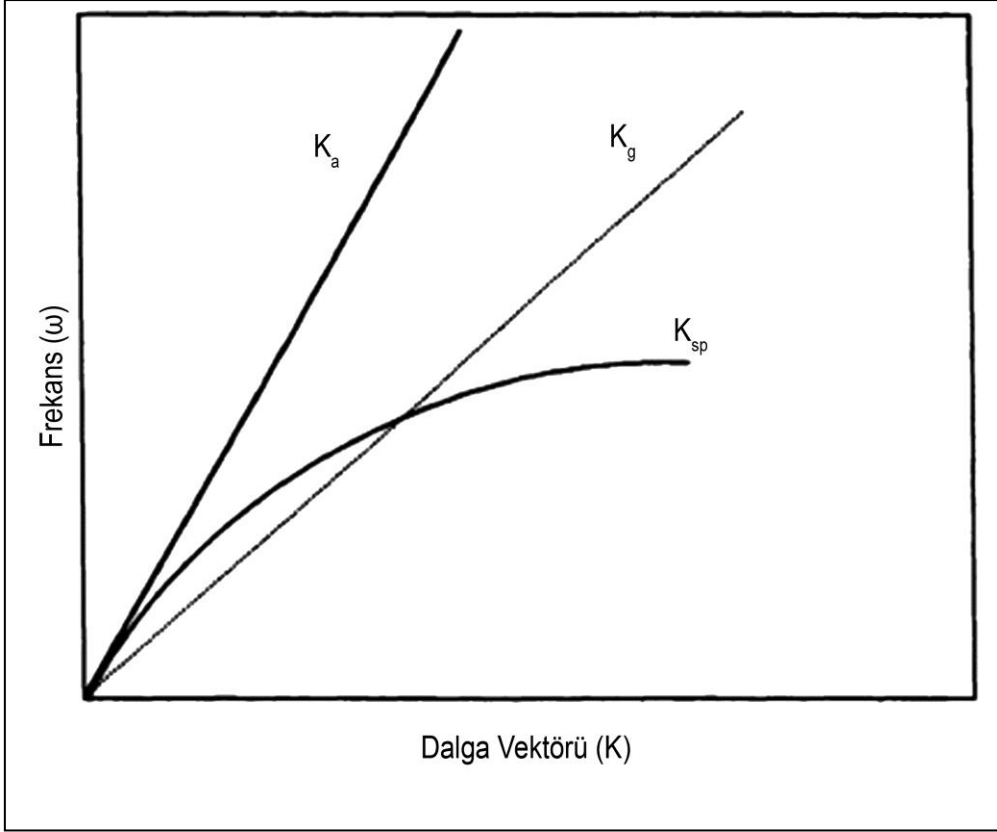
$$K_x = \frac{\omega}{c} \eta_p \sin \theta \quad (2.3)$$

Burada;

- θ , ışığın metal film yüzeyine geliş açısı,
- η_p , prizmanın kırınım açısıdır.

Metal filmin üst yüzeyinde salınan ve toplanan yüzey plazmonları, p-polarize ışığı absorplar ve toplam iç kırınımına uğrayan ışığın parlaklığını (I_r) değiştirir. Bu nedenle, I_r 'e karşı geliş (veya kırınım) açısı (θ_r) grafiğe geçirildiğinde açısal parlaklık profili elde edilir. Bu profile ait grafikte, rezonans açısında keskin bir azalma gözlenir.

Bu olayın gerçekleşmesi, yüksek kırınım indeksine sahip bir prizma gerektirmektedir. Bu tip bir prizmaya gereksinim, havadaki ışık yayılması ile yüzey plazmonların üretilmemesinden kaynaklanmaktadır. Yüzey plazmon rezonans sırasında, gelen ışığın ve yüzey plazmonun dalga vektörleri eşit olmalıdır. Fakat Şekil 2.6'da görüldüğü gibi, ışığın havadaki ($K_a: \omega/c$) ve metalin plazmonundaki (K_{sp}) dağılma eğrisi kesişmemektedir. Bundan nedenle, dalga vektörü ve frekansı eş zamanlı olarak karşılaştırılmasına imkân yoktur. Bunun tersine; K_{sp} ve cam yüzeyin (K_g) dağılma eğrilerinin kesişmektedir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Hava, cam ve yüzey plazmonları için dağılıma eğrileri.

Yüzey plazmon dalga vektörü, metal filme yakın bölgedeki ortamın kırınma indeksi ile ilişkilidir. Bundan dolayı, K_{sp} eşitliği şu şekilde basitleştirilebilir:

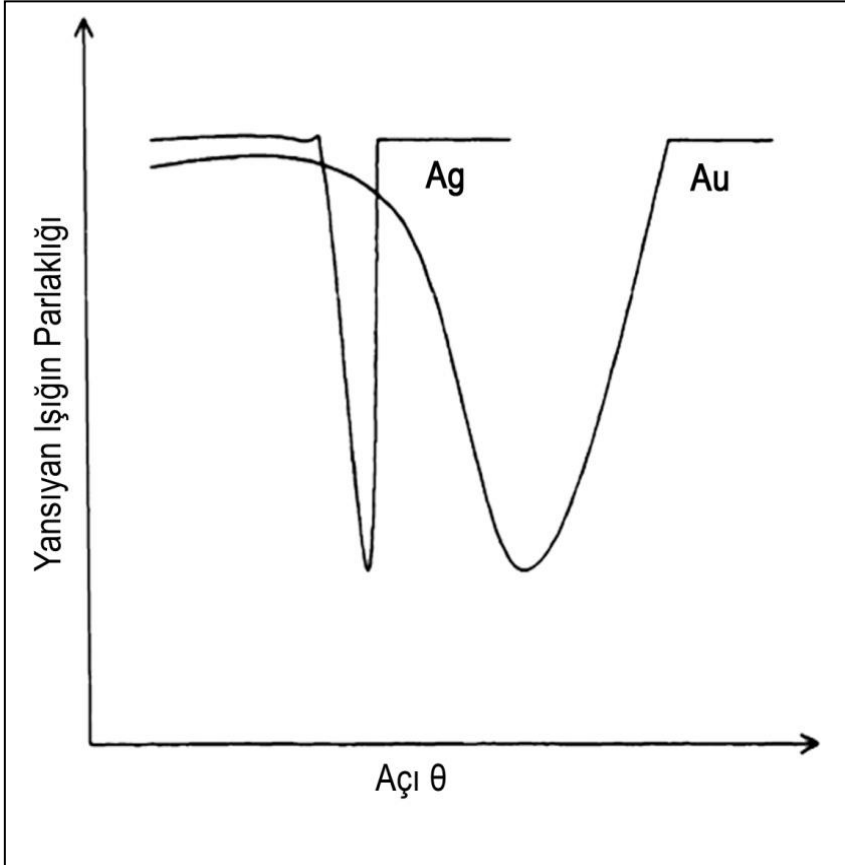
$$K_{sp} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\eta_m^2 \eta_s^2}{\eta_m^2 + \eta_s^2}} \quad (2.4)$$

Bu formülde;

- η_m , metalin,
- η_s , örneğin kırınım indeksleridir.

Kompleks kırınım indeksi teriminin karmaşık bileşeni, absorpsiyon ile ilişkilidir. Yüzey plazmon rezonansın profili, seçilen metale göre değişiklik göstermektedir. Çünkü her metal, dielektrik geçirgenlik gibi farklı özgül optik özelliklere sahiptir. Şekil 2.4'de altın ve gümüş film için, yansıyan ışığın parlaklığına karşı gelen ışığın açısını gösteren

eğriler verilmiştir. Gümüş daha keskin bir rezonans pikine sahiptir. Bu rezonans piki, metal filmdeki yüzey plazmon salınımlarının kendiliğinden azalması nedeniyle olmaktadır. Tüm yüzey plazmon metalleri, uyarılma ışığının elektrik alanının saçılmasına bağlı olarak bu salınımları azaltma eğilimindedir. Birçok metal yüzey plazmon üretebilir. Yüzey plazmon rezonans için kullanılacak olan metal, uygun açılı ışıkla rezonansa girebilecek iletkenlik bandı elektronlarına ve sensör olarak kullanılabilmek için gerekli kimyasal modifikasyonlar için uygun özelliklere sahip olmalıdır. Altın belirtilen iki temel özelliğe birden sahip olan nadir metallere biridir. Bu özelliklere sahip olan diğer metallere göre uygulaması oldukça kolaydır. Örnek olarak, indiyum gibi bazı elementler çok pahalıdır; sodyum gibi elementler oldukça reaktiftir; bakır, alüminyum gibi bazılarının yüzey plazmon cevapları çok geniştir veya gümüş gibi bazı elementler oksitlenmektedir [32].



Şekil 2.4 Gümüş ve altına ait yüzey plazmon eğrileri.

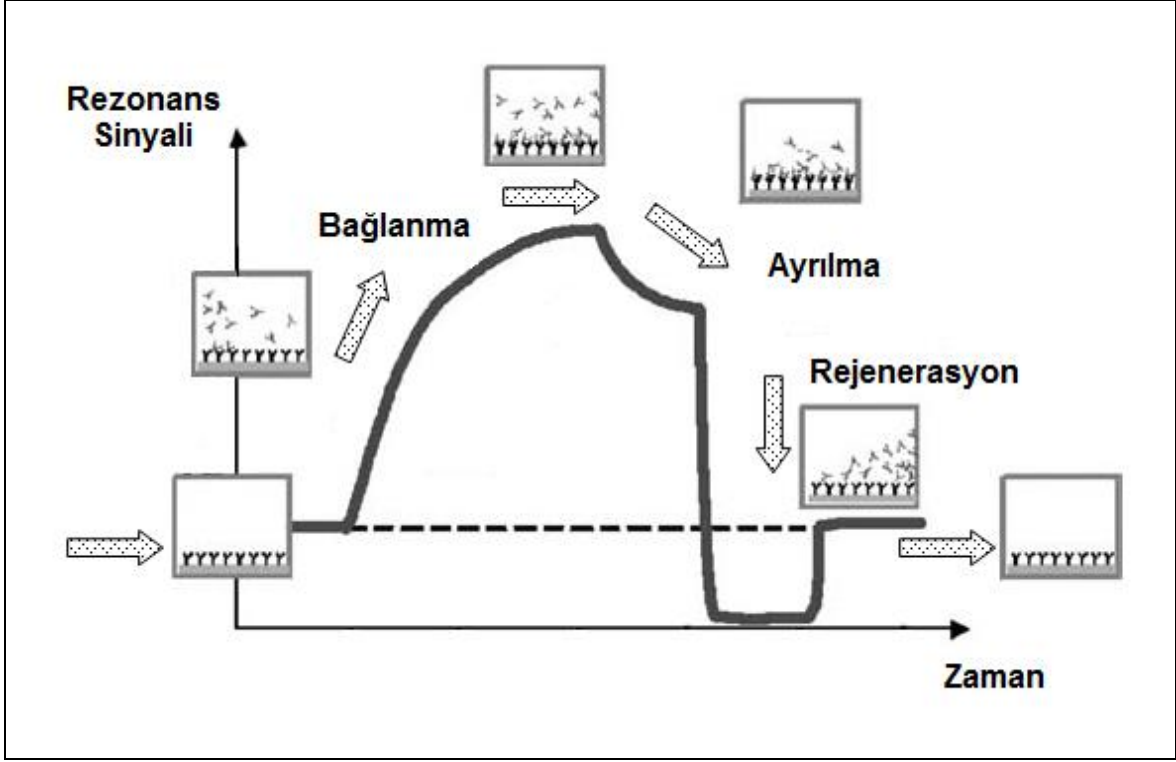
Yüzey plazmon rezonansın (SPR) analitik bir cihaz olarak kullanılması, plazmon alanı aralığındaki çevrenin kimyasal bileşimindeki değişimin sebep olduğu ışığın rezonans açısındaki kaymanın ölçülmesine dayanmaktadır. Kimyasal bileşenlerdeki değişim

absorplanan ışığın geliş açısında kaymaya neden olmaktadır. Açık kaymasının büyüklüğü, nicel olarak kimyasal değişimle ilgilidir. Bir sensörde, ince metal film üzerine substrat bağlanmış bir prizma (genel olarak cam ve plastik) üzerine uygulanır. Daha sonra özel bir analite (hormon, ilaç, tümör belirteci vb.) özgül moleküller metal film üzerine spesifik olmayan bir şekilde adsorplanır. Sensöre analit içeren örnek uygulandığında gerçekleşen etkileşim (antibadi ve analit bağlanması gibi) gelen ışığın rezonans açısındaki kaymanın ölçüldüğü metal yüzeyindeki kimyasal bileşen değişimine neden olur. Rezonans açısındaki kaymanın boyutu, örnek içerisindeki analitin miktarı ile orantılıdır. Moleküller arasındaki ilişki oldukça özgül olduğundan dolayı diğer moleküller sensör tarafından ölçülemez ve çapraz-reaktivite gözlenmemektedir.

2.3.2. Yüzey Plazmon Rezonans Biyosensörler

SPR temelli biyosensörler, herhangi bir işaretlemeye ihtiyaç duymadan biyomoleküllerin etkileşimlerini ölçebilirler. Bu özellikleri nedeniyle, moleküler etkileşimlerin anlaşılması için bu cihazların önemi artmıştır. Etkileşimleri eş zamanlı, doğrudan ölçülebilmek; kinetik, termodinamik parametrelerin, derişimin veya ligandlarla analitler arasındaki etkileşimlerin belirlenebilmesini sağlamaktadır. SPR temelli biyosensörlerin hızlı cevap süresi ve yüksek seçiciliği vardır. Enzim veya radyoizotop yöntemleri gibi diğer tekniklerle karşılaştırıldığında SPR biyosensörler sahip oldukları bu özelliklerden dolayı, protein-protein, antibadi-antijen, reseptör-ligand etkileşimlerinden düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin tanımlanmasına kadar değişen çok çeşitli biyomoleküler mekanizmaların anlaşılmasında kullanılabilir [33].

SPR biyosensörler, metal yüzeyinde biyo-tanımayı sağlayacak bölgelerin oluşturulmasıyla elde edilir. Biyo-tanımayı sağlamak için antibadiler [34] ya da nanopartiküller kullanılabilir [26,35]. Hedef molekülü içeren çözelti biyosensörle etkileştiğinde hedef molekül sensör yüzeyine bağlanır ve yüzeyin yoğunluğunun artmasına neden olur. Yüzeydeki yoğunluk artışı yüzeyin kırılma indisinin artmasına neden olur. Kırılma indisindeki bu artış ise rezonans açısının kayması ile sonuçlanır. Bu etki zamana bağlı olarak incelenirse Şekil 2.5'dekine benzer bir sensorgram elde edilir. Şekil 2.8'de görüldüğü gibi, yüzeye analit bağlanması ile rezonans açısı artmaktadır. Desorpsiyon çözeltisinin sisteme verilmesiyle analit, yüzeyden ayrılmaya başlar ve belli süre sonra sinyal tekrar eski seviyesine döner.



Şekil 2.5 Tipik bir SPR biyosensör sensorgramının şematik gösterimi.

Yaşam bilimlerinde ve farmasötik çalışmalarda makromoleküllerin ve onların etkileşimlerinin araştırılması için SPR biyosensörlerden yararlanılmaktadır. Ayrıca SPR biyosensörler çevresel kirleticilerin tespitinde [36,37], gıda teknolojisinde [38,39,40] hastalıkların teşhisinde [41,42,43] kullanılmaktadır.

C. Parvum su ve gıda yoluyla bulaşan ve ishale neden olan protozoan bir parazittir. Klorlanmış sularda daha çok bulunan parazitin oositleri halk sağlığı için tehdit unsurudur. 2005 yılında Kang ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada parazit olan *C. Parvum* oositlerini tespit amaçlı modifiye edilmiş SPR biyosensörleri hazırlamışlardır. Hazırladıkları SPR biyosensör, 1×10^2 ile 1×10^6 oosit/ml aralığında tespit özelliğine sahiptir. Ayrıca, hızlı ve spesifik cevaplar vermesiyle bu tarz analizler için SPR sensörlerinin üstünlüğünü ortaya koymuştur [44].

SPR sensörlerine en çok ihtiyaç duyulan alanlardan bir diğeri de gıda araştırmalarıdır. Son yıllarda yazılı ve görsel haberlerde gıdaların için de var olmaması gereken kimyasalların olduğu ve bunların özellikle günlük tükettiğimiz

gıdalar olduğu konulu pek çok haber yayınlanmaktadır. Özellikle, hayvanlara öngörülenden daha yüksek dozlarda antibiyotik verilmesi, kesilme süresinden önce hayvanların kesilmesi veya bekleme süresinden önce ürünlerin tüketime sunulması hayvansal gıdalarda antibiyotik kalıntı riskini arttıran faktörler arasındadır. Toksisitesi ve hayvan kaynaklı gıdalarda bulunma ihtimalinden dolayı kloremfenikolün (CAP) gıda üreten hayvanlarda kullanımı Avrupa Birliğince yasaklanmıştır. Ancak hayvan yetiştiricileri CAP'a kolay eriştiklerinden ve ucuz olmasından dolayı illegal olarak kullanılmaktadırlar. CAP'ın düşük konsantrasyon düzeyinde tayininin yapılması oldukça zordur.

CAP'ın kantitatif tayinleri sınırlı sayıda laboratuvarında yüksek maliyet gerektirmektedir. Bu durum SPR biyosensörleri için yeni bir araştırma yaratmış oldu. 2010 yılında Kara ve arkadaşları tarafından yapılan bu çalışmada moleküler baskılama tekniği kullanılarak hazırlanan SPR sensörler hazırlanmıştır. Hazırlanan bu sensörün seçiciliğini belirlemek için florfenikol (FAP) ve tiyamfenikol (TAP) antibiyotikleri yarışmacı bileşen olarak seçilmiştir. Her iki antibiyotiğe göre 8 kat üstünlük gösteren bu sensörlerin tayin limitini 0,04 µg/kg olarak bulmuşlardır. CAP'nın tayini için hazırladıkları bu biyosensör piyasadaki en ucuz, hızlı cevap veren ve seçici sensör olmuştur [45].

Sağlık alanında da SPR biyosensörlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Çünkü hızlı ve ucuz analizin yanı sıra güvenilir cevaplara en çok sağlık alanında ihtiyaç duyulmaktadır. Sağlık alanındaki teşhislerin çoğu düşük biyomarker seviyesine inilemediği için de gerçekleşmemektedir. Bu biyomarkere kadar biri de miyoglobindir. Miyoglobin düzeyindeki artış başta iskelet kası harabiyeti olmak üzere kas erimesi (masküler distrofi) ve polimiyozitis gibi kas hastalıklarında yükselir. Miyoglobinin fazla miktarda bulunması böbreklere zehirli etki yapar. Kanda çok fazla miktarda miyoglobin bulunan bir kişide böbrek yetmezliği nedeniyle miyoglobinin tam olarak uzaklaştırılması imkânsızdır. Bu nedenle kandaki miyoglobin seviyesinin izlenmesi böbrek fonksiyonlarının değerlendirilmesi açısından önemlidir. Bu amaçla Osman ve arkadaşları tarafından hazırlanan SPR biyosensörlerin yüzeyinde miyoglobin tanıma bölgeleri bulunmaktadır. Bu sayede kandan miyoglobin tespitini hedeflemişlerdir. Yaptıkları deneyde hazırladıkları biyosensörünün seçiciliğini kontrol etmek için sitokrom c ve lizozimi yarışmacı ajan olarak seçmişlerdir. Bu biyosensörün sitokrom c'ye göre 10,68 kat ve lizozime göre 6,71 kat daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

Düşük derişimlerdeki biyomarkerları bile hızlı ve özgün cevap veren SPR sensörleri kullanılarak hem zamandan hem de maddi açıdan tasarruf edilmesi sağlanacaktır [46].

2.4. Moleküler Baskılanmış Polimerler (MIP)

İlk kez 1972 yılında Günter Wulff ve çalışma grubu tarafından tanımlanan moleküler baskılama yöntemi, ilgilenilen analit için seçici tanıma bölgelerine sahip sentetik polimerlerin hazırlanmasında kullanılan yüksek seçicilik göstermesi nedeniyle saflaştırma teknikleri arasında en ümit veren yöntemdir. Wulff ve arkadaşları sentetik polimerlerde fonksiyonel grupların üç boyutlu yapılarının düzenlenmesiyle oldukça seçici bağlanma bölgeleri elde etmek amacıyla kullanılmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalarda istenilen enzim tepkimelerinin substratlarını, ürünlerini veya geçiş analoglarını kalıp molekül olarak kullanarak bu yöntemle "YAPAY ENZİM" elde edilebileceğini de göstermiştir [47]. Antikor gibi biyoreseptörler yüksek seçicilikleri nedeniyle spesifik antijenlerini saflaştırmada kullanılan popüler ligandlardır. Ancak, yüksek seçiciliğe sahip olan bu moleküller ve protein yapıları ortamlardaki asidik şartlarda, yüksek sıcaklıklarda ya da proteolitik aktivite sonucunda hızla denatüre olur. Antikor/antijen ya da enzim/substrat gibi biyolojik sistemlerin tanıma mekanizmasını polimerik yapılara aktaran tekniğe "moleküler baskılama" denilmektedir.

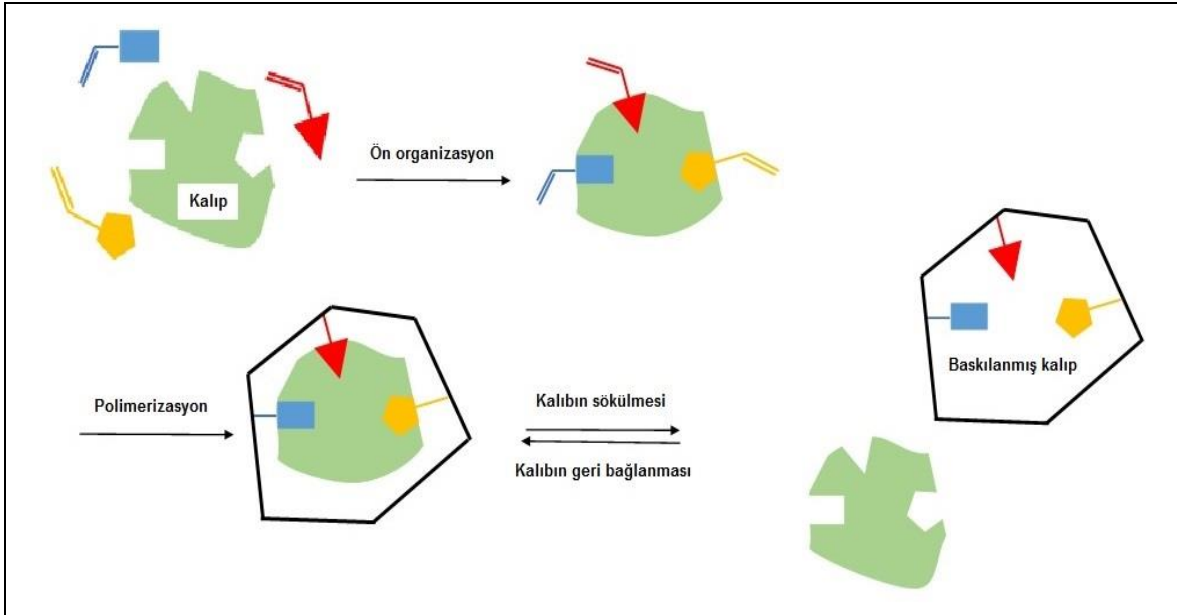
Moleküler baskılanmış polimerler (MIP); eşsiz molekül tanıma bölgelerine sahip, kolay hazırlanabilen ve üstünlüklerine göre de ucuz yapılardır. Ayrıca moleküler baskılanmış polimerlerin sahip olduğu yüksek mekanik dayanıklılık, ısıya ve basınca olan dirençleri, fiziksel sağlamlıkları, asitler, bazlar, metal iyonları ve organik çözücüler gibi ekstrem şartlarda yüksek kararlılıkları onları dayanıklı kılan diğer üstün özellikleridir [50].

Moleküler baskılama yöntemi temelde üç basamaktan oluşmaktadır (Şekil 2.6):

1) Ön-kompleksleşme: Uygun fonksiyonel gruba sahip ve polimerleşebilen monomerler kalıp molekülle (hedef, analit) kovalent ya da kovalent olmayan etkileşimlerle bağlanarak kompleks oluşturur. Bu basamakta kalıp etrafında fonksiyonel monomerin bağlandığı bir yapı oluşumu söz konusudur. Bu etkileşimde hedef molekülün üç boyutlu yapısı ve kimyasal özellikleri önemlidir.

2) Polimerizasyon: Monomer-analit kompleksi, uygun bir çapraz bağlayıcı ve başlatıcı kullanılarak fonksiyonel monomer üzerinden polimerleştirilir.

3) Analit molekülünün uzaklaştırılması: Seçici kavitelerin oluşturulması için hedef molekülün uzaklaştırılması gerekir. Bunun için uygun çözücü veya çözücü karışımları kullanılarak polimerik yapıdan molekülü uzaklaştırılır. Baskılanan molekülün polimerden uzaklaştırılması sonucunda polimerde baskılanan moleküle kimyasal ve topolojik (büyüklük, şekil ve üç boyutlu yapı) olarak seçici bellekler elde edilir ve bir karışımda baskılanan molekül polimere seçici olarak tekrar bağlanabilir [51].



Şekil 2.6. Moleküler baskılanmış tekniğinin basamakları

2.4.1. Moleküler baskılanmış polimerlerin özelliklerini etkileyen faktörler

Moleküler baskılanmış polimerlerin beklenen başarıyla işlevini yerine getirmesinde polimerin matriksin yapısı oldukça etkilidir. Kaviteğin özgül yapısı polimer zincirinin düzenlenişine ve düşük moleküler ağırlıklı kalıplara bağlıdır. Polimerin sertliği kaviteğin kalıp molekül uzaklaştıktan sonra şekillerini korumasında etkilidir. Bu da çapraz bağlayıcının yüksek oranda kullanılması ile gerçekleşir. Optimum spesifiklik ve seçiciliğe sahip polimerler uygun monomer ve çapraz bağlayıcı seçimi ile elde edilir.

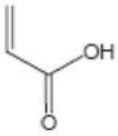
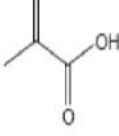
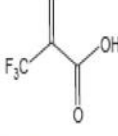
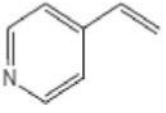
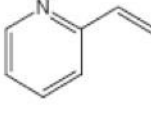
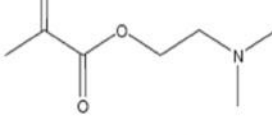
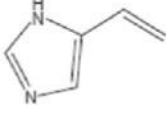
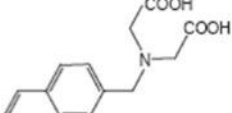
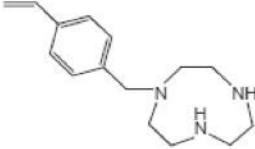
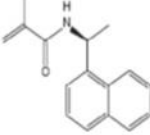
Matriks yapısı ve konfigurasyonu, kullanılan kalıp molekül, çapraz bağlanmanın derecesi gibi matriksin karakteristik özelliklerini belirleyen etkenler yeniden bağlanma üzerinde oldukça etkilidir. Polimer matriksteki fonksiyonel monomerin polimerin yapısına rastgele girmesi, polimerin özgüllüğünü azaltır. Polimerizasyon sırasında kalıp ve monomer arasındaki etkileşim oldukça kuvvetli olmalıdır. İdeal olan kovalent etkileşimlerdir. Fakat desorpsiyonda yaşanan sıkıntılar ve yavaş bağlanma kinetiği kovalent etkileşimlerin tercih edilmesini engellemektedir. Moleküler baskılanmış polimerlerin en ideali desorpsiyon ve tekrar bağlanma için ılımlı koşulların olduğu non-kovalent bağlanmadır.

Moleküler baskılanmış polimerlerin özelliklerini etkileyen faktörleri şu şekilde sıralayabiliriz [46].

2.4.1.1. Fonksiyonel Monomerler

Bağlanma bölgelerindeki bağlanma etkileşimlerinden fonksiyonel monomerler sorumludur. Fonksiyonel monomerin ve kalıp molekülün fonksiyonel gruplarının uyumu baskılama etkinliğinin artırılması ve kompleks oluşumu için oldukça önemlidir. Kalıp molekül ve fonksiyonel monomer arasındaki sterik ve elektronik etki sayesinde kopolimerizasyon gerçekleşir. Asidik, bazik ve nötral özelliklere sahip yaygın olarak kullanılan bazı fonksiyonel monomerler vardır. Asidik yapıya sahip olan fonksiyonel monomerlere örnek olarak metakrilik asit (MAA), p-vinilbenzoik asit, akrilik asit (AA), 2-(triflorometil)-akrilik asit (TFMAA), akriloamido-(2-metil)-propan sülfonik asit (AMPSA) verilebilir. 4-vinil piridin (4-VP), 2-vinil piridin (2-VP), 4-(5)-vinilimidazol, 1-vinil imidazol, allilamin, N,N'-dietil aminoetil metakrilamit (DEAEM) bazik özelliğe sahipken; akrilamit, metakrilamit, 2-hidroksi metakrilat (HEMA), akrilonitril (AN), metilmetakrilat (MMA), stiren, etilstiren ise nötral özelliğe sahip fonksiyonel monomerlerdir. En yaygın olarak kullanılan fonksiyonel monomerler ve monomerlerin yapısal formülleri Tablo 2.1 de verilmiştir [52, 53].

Çizelge 2.1. Moleküler baskılanmış polimer sentezinde kullanılan bazı fonksiyonel monomerler

Asidik fonksiyonel monomerler	 Akrilik asit	 Metakrilik asit	 Triflorometil akrilik asit
Bazik fonksiyonel monomerler	 4-vinilpiridin	 2-vinilpiridin	 N,N-dimetilaminoetil metakrilat
Metallerle şelat oluşturabilen fonksiyonel monomerler	 5-vinilimidazol	 4-vinilbenzil iminodiasetik asit	 1-(4'-vinilbenzil)-1,4,7-triazacyclon
Şiral fonksiyonel monomerler	 (S)-(-)-N-metakroil-1-naftiletilamin		

2.4.1.2. Baskılanacak Kalıp Molekülün Özellikleri

Fonksiyonel monomer ile etkileşerek moleküler tanıma bölgelerinin sayısını ve kalitesini etkileyen kalıp molekül, moleküler bakılama işlemlerinde merkezi bir öneme sahiptir. Tüm moleküllerin kalıp molekül olarak kullanılması imkânsızdır. Moleküler baskılanmış polimerler, çoğunlukla serbest radikal polimerizasyonu ile sentezlenmektedir. Bu nedenle, polimerizasyon gerçekleştirilebilmesi için, kalıp molekül polimerizasyon koşullarında kimyasal olarak inert olmalıdır. Kalıp molekül radikalik reaksiyonlara katılıyorsa ve polimerizasyon koşullarında dayanıklı değil ise alternatif baskılama yöntemleri kullanılmalıdır. Kalıp molekülde olması gereken özellikleri şu şekilde sıralayabiliriz.

- Kalıp molekülün polimerleşebilir gruplar taşıması gerekir.
- Serbet radikal polimerizasyonu yavaşlatacak veya engelleyecek grupları ya da kalıntıları (tiyol, hidrokinon kalıntıları gibi) içermemelidir.
- Kalıp molekül polimerizasyonun gerçekleştirildiği sıcaklıklarda ya da UV ışığına karşı duyarlı olmamalıdır.

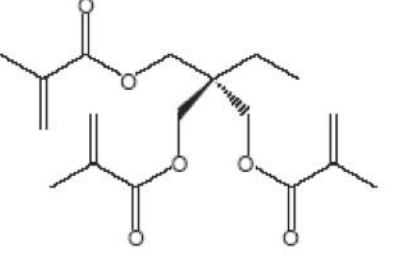
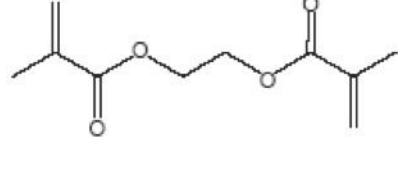
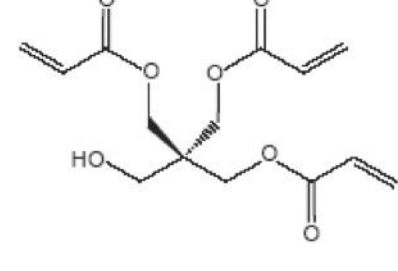
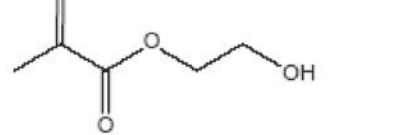
İlaçlar, aminoasitler, karbonhidratlar, proteinler, nükleotid bazlar, hormonlar, pestisitler, koenzimler ve iyonlar baskılanacak molekül olarak kullanılabilir. Ancak baskılanacak molekül olarak iyonlar seçilmişse polimerik malzemenin seçiciliği, baskılanmış iyonun yüküne, boyutuna, koordinasyon sayısına ve geometrisine bağlıdır [46].

2.4.1.3. Çapraz Bağlayıcılar

Çapraz bağlayıcıların üç temel görevi vardır. Bunlar; polimer matriksin jel tipi, makrogozenekli ya da mikrojel toz gibi morfolojinin belirlenmesi, polimer matrikse mekanik dayanıklılık kazandırılması ve baskılanmış polimer bölgelerin kararlılığının sağlanmasıdır. Polimerizasyon açısından bakıldığında yeterli mekanik dayanıklılığa sahip makro gözenekli malzemeler elde etmek için genellikle yüksek çapraz bağlanma oranları kullanılmakta ve hazırlanan polimerlerde çapraz bağlanma oranı %80'i aşmaktadır. Aynı zamanda yüksek oranda çapraz bağlanma polimerin çözülmesini önleyerek kolayca kullanımını sağlamaktadır. Ancak unutulmamalıdır ki çapraz bağlayıcı ile fonksiyonel monomer oranı oldukça önemlidir. Eğer mol oranları çok küçükse, kalıp moleküllerin bağlanma bölgeleri birbirine çok yaklaşır, hedef molekülün bağlanma bölgeleri komşu bölgeler tarafından kapatılır ve etkin bir sonuç elde edilmez. Çok büyük mol oranlarında, çapraz bağlayıcının fonksiyonel monomerlerle ya da kalıp molekülle kovalent olmayan etkileşimlere girmesi sonucu baskılamanın etkinliği yine azalmaktadır [46].

Moleküler baskılanmış polimerler hazırlanırken sıklıkla tercih edilen bazı çapraz bağlayıcılar bulunmaktadır. Çapraz bağlayıcıların çoğu ticari olarak üretilmektedir. Organik çözücülerde moleküler baskılama için etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) ve divinil benzen (DVB) suda ise N,N metilen bisakrilamid yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcılardır. Diğer çapraz bağlayıcılar Çizelge 2.2'de verilmiştir [46, 54].

Çizelge 2.2. Moleküler baskılanmış polimerlerin hazırlanmasında kullanılan çapraz bağlayıcılar

Çapraz bağlayıcılar	Adı	Özellik
	Trimetilolpropan trimetakrilat	Hidrofobik
	Etilen glikol dimetakrilat	Hidrofobik
	Penta eriotritol triakrilat	Hidrofilik
	2-hidroksi-etil-metakrilat	Hidrofilik

2.4.1.4. Çözücüler

Monomer-kalıp etkileşimlerinin yanı sıra, polimerizasyon öncesi kullanılan çözücü, elde edilen polimerin spesifik yüzey alanı ve gözenek çapı gibi morfolojik özellikleri üzerinde önemli rol oynar. Genel olarak düşük yüzey alanı ve düşük gözeneklilik tekrar bağlanma deneylerinde, hedef yapının gözeneklerden yavaş difüzyonu nedeniyle zayıf hedef tanımına yol açar. Uygun çözücünün önceden tahmin edilmesi güçtür çünkü ön polimerizasyon aşamasında çözücü, kalıp-monomer etkileşimlerini kararlı hale getirirse bile gerekli morfolojideki polimerin elde edilmesini sağlamayabilir.

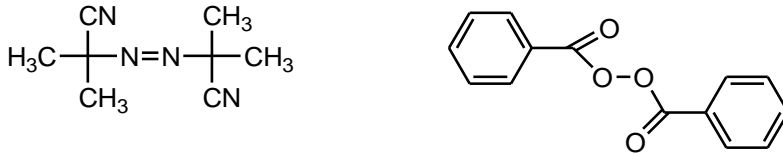
Düşük dielektrik sabite sahip kloroform ve toluen gibi çözücüler monomer ve kalıp arasındaki hidrojen bağlarını ve/veya elektrostatik etkileşimleri kararlı hale

getirdiğinden tercih edilmekte ve polimerizasyon işlemi sırasında büyüyen zincirlerin de çökmesini sağlanmaktadır. Yüksek dielektrik sabite sahip (asetonitril gibi) çözücüler kullanıldığında, elde edilen polimerler genellikle kalıba düşük afinite gösterirler. Su ve metanol gibi protik çözücüler hem polimerizasyonu hem de kalıp-monomer etkileşimlerini böldüğünden tavsiye edilmezler.

Moleküler baskılanmış polimer hazırlandığında serbest bağlanma bölgelerinin ortaya çıkması için kalıbın uzaklaştırılması gereklidir. Bu basamak genellikle polimer kalıp-monomer etkileşimlerini kıran bir çözücüyle sürekli olarak yıkanarak veya Soxhlet ekstraksiyonuyla yürütülür [54].

2.4.1.5. Başlatıcılar

Kompleksleşmenin hidrojen bağı ile gerçekleştiği durumlarda düşük polimerizasyon sıcaklığı tercih edilir ve bu şartlarda düşük sıcaklıklarda etkili olan başlatıcılar tercih edilir. Azobisisobutironitril (AIBN), benzoilperoksit (BPO), azobisdimetilvaleronitril (ABDV), 4,4'-azo-(4-siyanovalerik asit) yaygın olarak kullanılan başlatıcılardır [52]. Şekil 2.7'te yaygın olarak kullanılan başlatıcılar verilmiştir.



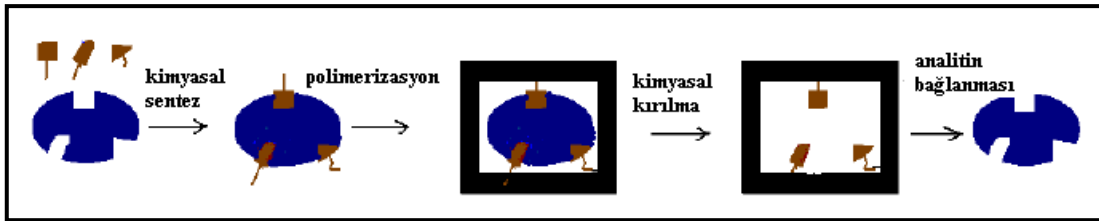
Şekil 2.7. Yaygın olarak kullanılan başlatıcılar

Moleküler baskılama yöntemi fonksiyonel monomer ile kalıp molekül arasında oluşan bağı kovalent ya da kovalent olmamasına göre ikiye ayırılır.

2.4.2. Kovalent Baskılama

Polimerizasyon işleminden önce fonksiyonel monomer ile kalıp molekül birbirlerine kovalent bağlarla bağlanmaktadır. Kalıp-monomer kompleksi ester, asetal/ketal, Schiff bazı, metal koordinasyonu vb. gibi tersinir kovalent bağlanma ile oluşmaktadır. Polimerizasyon işleminden sonra kovalent bağlar kırılmakta ve kalıp, polimerden uzaklaştırılmaktadır. Hedef molekül, baskılanmış polimerle etkileştirildiğinde aynı kovalent bağ yeniden oluşur (Şekil 2.8). Spesifik ve homojen bağlanma bölgeleri elde etmek için

baskılama işlemi esnasında uygun kalıp-monomer kompleksleri elde etmek gerekmektedir. Kovalent baskılamada kullanılan fonksiyonel monomer, çapraz bağlayıcı ve kalıbın oranları, non-kovalent baskılamaya göre daha farklı kullanılmaktadır. Kovalent baskılamada kullanılan kalıp sayısı, oldukça sınırlıdır ve polimerleşebilen monomerlerle tersinir kovalent etkileşimlerinin sayısı da azdır. Ayrıca kalıp ve fonksiyonel monomer arasındaki kovalent bağın kırılma işlemi, çoğunlukla asit hidrolizini gerektirmektedir [55, 56, 57]



Şekil 2.8. Kovalent baskılamanın şematik gösterimi

Avantajları:

1. Monomer-kalıp molekül kompleksi oldukça kararlıdır ve stokiyometrik oranlarda gerçekleşir.
2. Polimerizasyon koşulları (yüksek sıcaklık, yüksek veya düşük pH ve polar çözücüler gibi) istenildiği gibi uygulanabilir, çünkü konjugatlar kovalent bağlarla oluşturulmuştur ve oldukça kararlıdır [58,54].

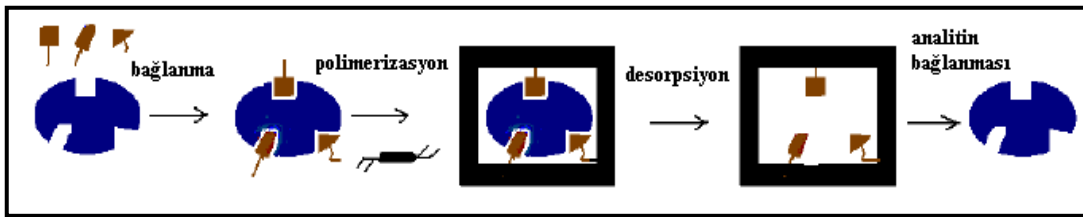
Dezavantajları:

1. Monomer-kalıp molekül konjugatının sentezinde sık sık sorunlar çıkabilir ve sentez işlemi pek ekonomik değildir.
2. Hedef molekülün polimere tersinir olarak bağlanma sayısı sınırlıdır.
3. Kovalent bağ oluşumu nedeniyle bağlanma kinetikleri yavaştır.
4. Polimerizasyondan sonra hedef molekülü uzaklaştırmak zordur [53, 55] .

2.4.3. Kovalent Olmayan Baskılama

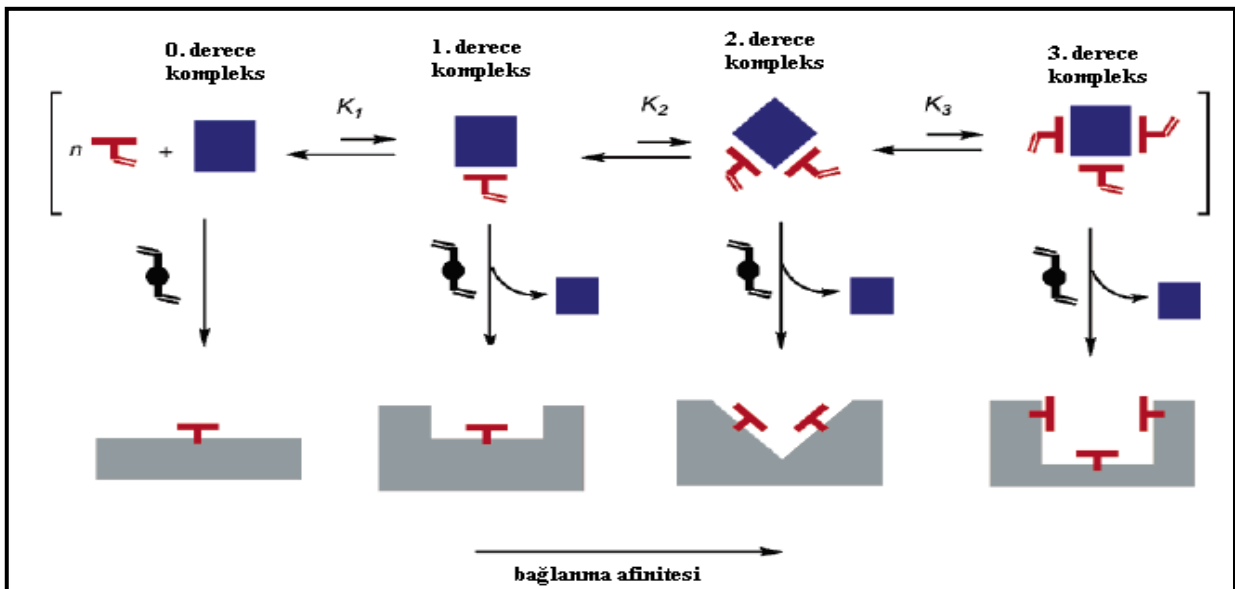
Fonksiyonel monomer ile kalıp molekülün bağlanması non-kovalent (hidrojen bağı ve koordinasyon bağı oluşumu gibi) etkileşimlerle gerçekleşir. Kalıp molekül polimerizasyondan sonra uygun çözücülerle polimerden uzaklaştırılır. Hedef molekül ile baskılanmış polimerler non-kovalent etkileşimlerle bağlanır (Şekil 2.7). Non-kovalent baskılama, kalıbın uzaklaştırma işleminin basitliği ve polimerde çok sayıda afinitesi yüksek

bölgeler oluşturması nedeniyle moleküler baskılanmış polimerlerin hazırlanmasında günümüzde sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir. Bu yaklaşım esnasında kalıp ve monomer arasında bağlanma gerçekleşerek özel bağlanma bölgeleri oluşur ve ardından çapraz bağlayıcı ile kopolimerizasyon gerçekleşir. Non-kovalent etkileşimde kalıp molekül olarak, hidroksil, karboksil, amino ve amit gibi polar grupları olan bileşikler seçilmelidir. Baskılanmış moleküller, non-kovalent etkileşimler (hidrofobik, hidrojen bağı ve metal koordinasyonu gibi) yoluyla polimerle hem baskılama işlemi hem de tekrar bağlanma ile etkileşmektedir [55, 56, 57,59 60,61].



Şekil 2.9 Non-kovalent baskılamanın şematik gösterimi

Non-kovalent baskılamada ön polimerizasyon işlemi esnasında kalıp molekül ile fonksiyonel monomerin kompleksleşmesi, farklı derecelerde meydana gelir. Bu durum farklı bağlanma afinitelerine sahip farklı bağlanma bölgeleri oluşturur (Şekil 2.10) [62].



Şekil 2.10. Non-kovalent baskılama mekanizmasının farklı derecelerde bağlanma özellikleri.

Non-kovalent baskılama, fonksiyonel monomerlerle non-kovalent etkileşime girebilme yeteneğine sahip olan, biyolojik bileşikler de içeren çok sayıda bileşik olmasından dolayı

moleküler baskılama için kovalent baskılama yöntemine göre daha çok gelecek vaat etmektedir [57].

Avantajları:

1. Kovalent monomer-kalıp konjugatının sentezine gerek yoktur. Sentez oldukça basittir.
2. Kalıp molekülün uzaklaştırılması doğrudan basit bir çözücü ekstraksiyonu ile gerçekleşir.
3. Kalıp molekül, polimerizasyondan sonra polimerden kolayca uzaklaştırılır; çünkü non-kovalent etkileşimler daha zayıftır.
4. Hedef molekülün tekrar bağlanma kinetiği hızlıdır.
5. Non-kovalent baskılama, kovalent baskılama metoduna göre daha kolaydır ve kovalent bağlanmaya göre daha yüksek afiniteye sahip bağlanma bölgeleri oluşmaktadır [54].

Dezavantajları:

1. Non-kovalent etkileşimleri arttırmak amacıyla uygulanabilecek polimerizasyon koşulları sınırlıdır.
2. Fonksiyonel monomerler, bağ oluşum dengesini arttırmak amacıyla fazlaca kullanılır ve non-spesifik bağlanma bölgelerinin oluşumuna neden olabilir [54].

Moleküler baskılamanın her iki tipinde de kalıp molekül uzaklaştırıldıktan sonra kalıp molekülü boyut, büyüklük ve fonksiyonel grubuyla tanıyan üç boyutlu bir malzeme oluşur. Bu baskılanmış polimerik matrikste moleküler “hafıza” yaratır [57].

Günümüzde MIP, çoğunlukla non-kovalent baskılamayla hazırlanmaktadır. Yaygın olarak da metakrilik asit gibi metakrilik monomerler ve kloroform, toluen, tetrahidrofuran ve asetonitril gibi gözenek yapıcı çözeltilerde hazırlanan farklı çapraz bağlayıcılar (çoğunlukla etilen glikol dimetakrilat) kullanılmaktadır [63, 64, 65].

Görüldüğü gibi her iki yöntemin de birbirlerine göre üstünlükleri vardır. Yöntemin seçimi, hedef molekülün çeşidine, yapısına, seçiciliğin derecesine, zamana ve maliyete göre değişmektedir.

Moleküler baskılama yönteminin kullanıldığı ilk yıllarda temel kavramların gelişmesi ve baskılanmış polimerlerin optimize edilmesi, kovalent etkileşimlerle gerçekleştirilmiştir [59]. Non-kovalent etkileşimler, uygulamadaki kolaylıkları nedeniyle giderek daha cazip hale

gelmiştir. Baskılanmış polimerler temeline dayanan en etkin katalitik sistemlerde günümüzde kovalent ve stokiyometrik non-kovalent etkileşimler kullanılmaktadır.

2.4.4. Moleküler Baskılama Tekniğinin Uygulama Alanları

- i. Afinite esaslı katı faz ekstraksiyonu (SPE)
- ii. Kapiler elektroforez (CE) ve kapiler elektrokromatografi (CEC)
- iii. Sıvı kromatografisi
- iv. Biyolojik reseptörleri taklit eden yapılar
- v. Biyolojik sensörler
- vi. Katalitik aktiviteye sahip polimerler veya yapay enzim olarak
- vii. Seçimli difüzyonu sağlamak üzere tasarlanmış membran yapımı
- viii. Ağır metal iyonlarının atık sulardan uzaklaştırılması ve ağır metal detoksifikasyonunda kullanılmaktadır.

2.4.5. Moleküler Baskılama Tekniğiyle Hazırlanan Nanofilmler

Moleküler baskılama tekniği günümüze kadar protein [66] ve biyomolekül hatta enantiyomerlerin ayrılması içinde kullanılmış, başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Yaşanan bu gelişmelerle birlikte hızla gelişen nanoteknoloji alanında da moleküler baskılama tekniği kullanılarak kimyasal sensörler geliştirilmiştir. Nano boyuttaki filmlerin baskılanmış olduğu sensörlerde, baskılama bölgeleri yüzeye yakındır ya da yüzeydedir ve yüzey/hacim oranı yüksek ve bağlanma kinetikleri hızlıdır. Ayrıca hedef moleküle olan duyarlılığın ve seçiciliğin artması gibi avantajları da mevcuttur. Bu özelliklerini de göz önünde bulundurarak bu nanofilmler elektrokimyasal elektrot [66], kuvars kristal mikroterazi çip (QCM) ve yüzey plazmon rezonans (SPR) çiplerinin yüzeyinde sıklıkla sentezlenmektedirler. Nanofilmleri hazırlamak için döndürmeli kaplama (spin coating) yöntemi kullanılabilir. Bu yöntem sayesinde film kalınlığı ayarlanabilir.

2.5. Su Kirliliği

Bir gezegenden canlılığın var olup olmadığını araştırırken, suyun varlığı önemli bir kriterdir. Çünkü su canlıların yaşamasını sağlar. Yeryüzündeki su içinde ortaya çıkmış canlıların karalar üzerine yayılışından önceki 3 milyar yıl boyunca su içinde evrimleşmişlerdir. Ayrıca karasala hayat formları da dâhil olmak üzere tüm canlılara suya muhtaçtır. Bir hücrenin %70-95'i sudan ibaret dünyanın ise 3/4'ü su ile kaplıdır.

Suyun canlılar için önemli olmasının bazı nedenleri vardır. Bu nedenlerden ilki organizmaların su molekülü arasındaki kohezyondan yararlanmalarıdır. Hidrojen bağları sayesinde oluşan kohezyon suyun yerçekimine zıt yönde taşınmasını mümkün kılar ve su köklerden yapraklara mikroskobik su kanalları içinde taşınır. Suyun yüzey geriliminin yüksek olması diğer bir özelliğidir. Bu özelliği sayesinde bazı hayvanların suyun yüzeyinde durabilmesi, yürüyebilmesi, koşabilmesi gerçekleşmiştir. Suyun canlılık için önemli olmasının nedenlerinden bir diğeri ise su dünya üzerindeki sıcaklıkları belli sınırlar içinde tutmasıdır. Sucul canlılar için büyük bir ekosistem olan göl ve okyanuslar kışın tamamen donmazlar. Bu da suyun canlılığın devamını sağlayan önemli özelliklerinden biridir.

Canlılar için bunca önemini saydığımız suyun tüketimi, hızla artan nüfus ve gelişen teknoloji sayesinde artmaktadır. Bilindiği gibi içme, kullanma, endüstri ve tarımsal sulama gibi ihtiyaçlar giderildikten sonra su kirlenmektedir. Su kirliliğinin tanımını yapacak olursak; su kaynağın kimyasal, fiziksel, mikrobiyal, radyoaktif ve ekolojik özelliklerin olumsuz yönde değişmesi şekilde gözlenen ve doğrudana ya da dolaylı olarak biyolojik kaynaklarda insan sağlığında su ürünlerinde su kalitesi ve suyun diğer amaçlarla kullanılmasında engelleyici bozulmalar yaratacak madde ve enerji atıklarının boşaltılmasını ifade eder [68]. Sular çoğu zaman geri dönüşümsüz olarak kirlenmektedir. Kirlenen su hem temiz su kaynaklarını yok etmekte hem de çevre için yeni bir kirlenici ve risk kaynağı olmuştur.

2.5.1. Su Kirleticileri

2.5.1.1. Mikroorganizmalar ve hastalık yapıcı canlılar

Suların hijyenik açıdan kirlenmesine neden olan mikroorganizmalar, en büyük hastalık etkenleridir. Dönem dönem salgın hastalıklara da neden olan mikroorganizmalar doğrudan temasla ya da atık suların karıştığı sulardan dolaylı olarak bulaşır. Mikrobiyal su kirleticilerini şu şekilde sıralayabiliriz: *Adenovirus*, *Campylobacter jejuni*, *Enterovirus*, *Escherichia coli (0157)*, *Helicobacter pylori*, *Hepatitis A virus*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium avium*, *Naegleria fowleri*, *Salmonella enterica*, *Shigella sonnei* [69].

2.5.1.2. Organik Maddelerden Kaynaklardan Kirlilik

Su ortamındaki organik maddeler kirleticilerin büyük bir kısmını oluştururlar. Bazı endüstriyel atıklar ve kentsel atıkların çoğu bozulabilir, kararsız organik maddelerdir. Doğada, ölü bitki ve hayvanlardan gelen organik maddelere biyolojik yaşam zincirlerini hızla diğer canlılar tarafından kullanılabilir kararlı maddelere dönüştürürler. Bir dönüşüm için gerekli oksijen akarsu tarafından sağlanır. Bu nedenle organik kirletici yükü, biyokimyasal dönüşüm için gerekli olan oksijen miktarının bir fonksiyonu olarak ölçülebilir.

2.5.1.3. Endüstriyel Atıklar

Endüstriyel faaliyetler sonucu oluşan arsenik, siyanür, krom, fenol, civa, kurşun, bakır, kadmiyum gibi zehirli maddelerin ve ağır metallerin neden olduğu kirliliktir. Teknolojik ve endüstriyel gelişimden daha çok kontrolsüz atık boşaltma sistemlerinin neden olduğu kirliliktir.

2.5.1.4. Radyoaktivite

Dünyada kurulumu artan nükleer enerji tesislerinden çıkan reaksiyon ürünleri de radyoaktiftir. Nükleer atıkların yeraltında ve denizaltında çok uzun zaman boyunca saklanması için kullanılan kaplardan kaynaklanabilecek sızmalar bu maddelerin oluşturabileceği zehirli etkiler açısından önem taşımaktadır. Ayrıca radyoaktif kirlenmenin kaynağı olarak hastaneler, araştırma kuruluşları, nükleer silah denemeleri de gösterilebilir [68].

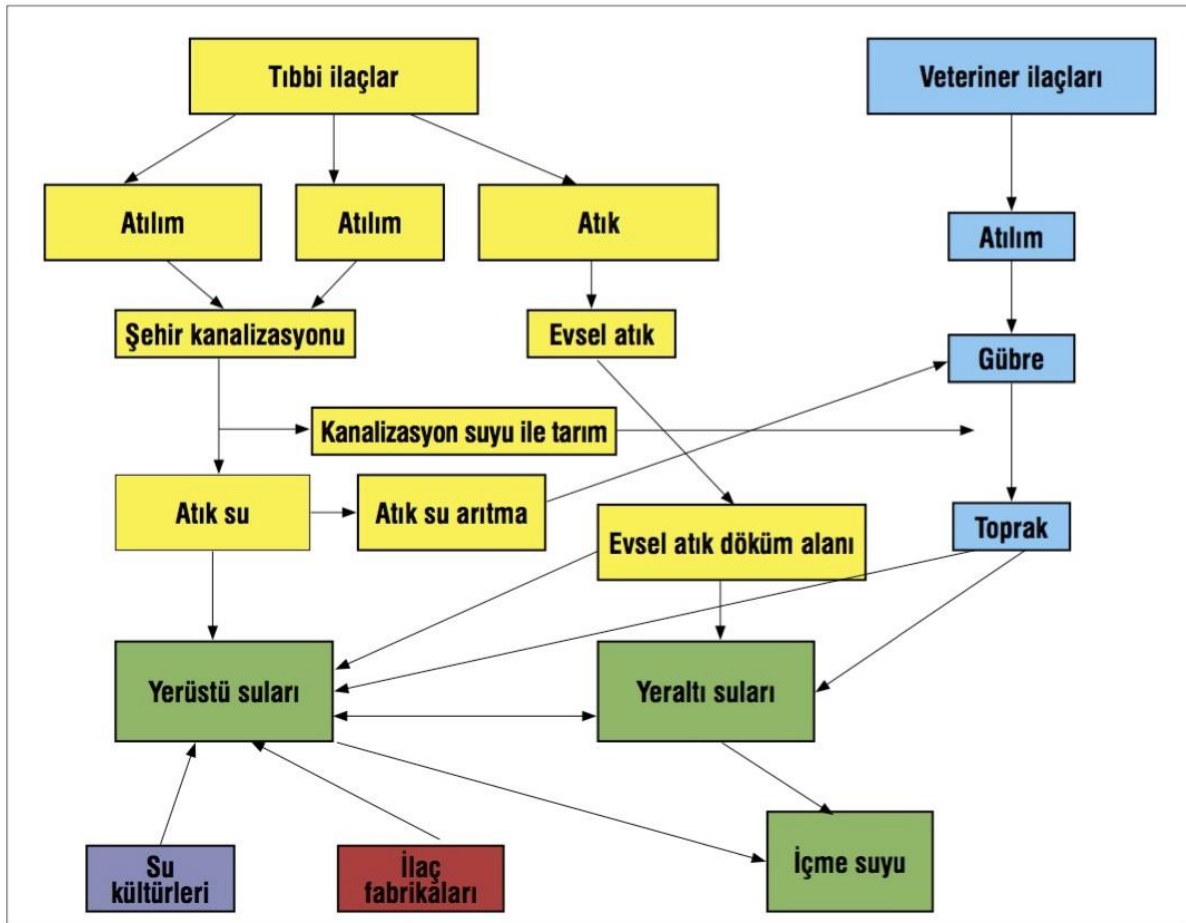
2.5.1.5. Hormonlar

2010 yılında yapılan ölçümler doğrultusunda içme sularında bile 7 hormona rastlandı. Bu hormonların içerisinde estriol, 17β östradiol, 17α -etinilestradiol, testostereone, estrone, 4-androstene-3, 17dione ve equilin örnek verilir. Bu hormonların tayin limiti aralığı 0,04-2,9 ng/L'dır [69].

2.5.1.6. İlaçlar

Dünyada ve ülkemizde son yıllarda ilaç tüketimi ve dolayısıyla ilaç üretimi hızla artmaktadır. İlaçlar sadece insanların teşhis ve tedavilerinde değil veterinerlikte hayvan yetiştiriciliğinde de tedavi ve büyüme hormonu olarak kullanılmaktadır. İlaçların hastalar tarafından kullanıldıktan sonra bir kısmı metabolizma tarafından

kullanılırken, kullanılmayan kısmı idrar ve dışkı yoluyla dışarı atılır ardından kanalizasyon ve oradan da arıtım tesisine ulaşır. Bu sırada biyolojik olarak bozunmazlarsa ya da arıtım tesislerinde arıtım sırasında yok edilmezlerse içme sularına bile karışabilirler. İlaç atıkları sadece atık sularında değil sedimentlerde de biriktiği görülmüştür. Arıtma tesisi çıkış suları ve çamurları tarım alanında kullanılabilir. Bu kullanımlar sonucu ilaç atıkları toprağa oradan da yeraltı sularına kadar ulaşabilir (Şekil 2.11). Ayrıca yapılan çalışmalarda bitkiler üzerinde ilaç birikimi de gözlenmiştir.



Şekil 2.11. İlaç kalıntılarının çevreye yayılma profili [69].

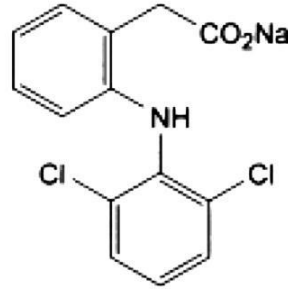
Sucul ortamlardaki ilaçların varlığı son dönemlerde yeni araştırma konularının arasında gelmektedir. Yapılan çalışmalarda gözlenen bileşikler arasında hormonlar, lipid düşürücü ajanlar, ağrı kesiciler, anti-kanser ilaçları, sitostatik bileşikler, anti-epileptikler ve kan basıncını düzenleyen ilaçlar olmak üzere geniş bir ilaç çeşidi bulunmaktadır [71]. Sucul ortamlarda bulunan bazı ilaçlar Çizelge 2.3'de verilmiştir.

Çizelge 2.3. Sucul ortamda bulunan ilaçların bazıları verilmiştir.

Uygulama Alanı	Bileşikler
Antibiyotikler (sulfonomitler)	Sulfamethoxazole, Sulfachlorpyridazine, Sulfamerazine,sulfamethazine, Sulfathiazole,sulfadimethoxine, Sulfamethiazole
Analjezikler/anti-inflammatuvar İlaçlar(ağrı kesiciler)	Diclofenac, Ibuprofen, Ketorofen, Naproxen, Indometacine, Fenoprofen, Phenazone, Acetaminophen(Paracetamol), Acetylsalicylicacid, Demethylaminophenazone, Meclofenamic asit, Tolfenamic asit
Lipid düzenleyiciler	Bezafibrate, Gemfibrozil, Clofibric acid, Fenofibric acid
Diğer bulunanlar	Iopromide, Diatrizoate, Metformin(antidiabetic agent), Fluoxetine(antidepressant)

2.6. Diklofenak

Diklofenak sodyum sarımtırak - bayaz renkli; kısmen higroskopik, kristalize toz şeklinde bulunmaktadır. Diklofenak sodyumun kimyasal formülü Şekil 2.12 'de verilmiştir.



Şekil 2.12 :Diklofenak sodyumun kimyasal şekli.

Diklofenak sodyum, antiinflamatuvar, analjezik ve antipiretik etkili non-steroidal antiinflamatuvar (NSAİİ) bir ilaçtır. Fenilasetik asit türevi olan diklofenak genellikle sodyum tuzu halinde romatoid artrit, osteoartrit ve ankilozan spondilit gibi iskelet kası ve eklem rahatsızlıklarında; kesecik iltihabı ve tendon iltihabı gibi peri artiküler rahatsızlıklarda; burkulma ve kasılma gibi yumuşak doku rahatsızlıklarında ve de renal kolik, akut gut, dismenore, migren ya da bazı cerrahi işlemler gibi ağrılı durumlarda kullanımı tercih edilmektedir. Diklofenak sodyumunun gözdeki uygulamaları da mevcuttur. Özellikle katarakt ameliyatlarında intra-operatif miyozisten korunmak, gözdeki lazer ve cerrahi uygulamalar sonrası inflamasyonun tedavisi, ameliyat sonrası veya travmatik kazalar sonrası korneal epiteliyal rahatsızlıkların ağrısını gidermek için sıklıkla kullanılmaktadır.

Antiinflamatuvar etki, yapısında bulunan iki aromatik halka arasındaki 69°'lik açı sayesinde çıkar. Bu açının oluşma nedeni; aynı aromatik halkada birbirine göre *orto* konumunda yer alan iki klor atomudur. Nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçların etki mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamış olmasına rağmen bu konu hakkında bazı mekanizmalar öne sürülmüştür. Bu mekanizmalardan en önemlisi "iltihap oluşumunda prostaglandin hipotezi" olup antiinflamatuvar etkinin buna göre açıklanmasıdır. Prostaglandinler, vücutta çok geniş bir aralıkta etki gösterir. Hasar

gören dokuda ağrı oluşumu ve inflamasyon; mide ve oniki parmak bağırsağı çeperini ülser oluşumuna karşı korumak; kan basıncını düşürmek ve doğum sırasındaki kasılmaları tetiklemek prostaglandinlerin etkileri arasında yer almaktadır. Nonsteroidal antinflamatuar ilaçlar, prostaglandin sentezini ve salgılanmasını inhibe ederler, fakat enjekte edilen prostaglandinlerin oluşturduğu ağrı, enflamasyon ve ateşi inhibe etmezler. Nonsteroidal antinflamatuar ilaçlar, siklooksijenaz basamağını inhibe ederek prostaglandin endoperoksitlerin dolayısı ile prostaglandinler ve diğer bazı bileşiklerin (prostasiklin ve tromboksanlar) oluşumunu engellerler [62, 63]. Diklofenak sodyumun etken madde olarak kullanıldığı bazı piyasa ürünleri Çizelge 2.4'de verilmiştir.

Çizelge 2.4: Etken madde olarak Diklofenak içeren piyasa ürünlerinin bazıları [68].

Müstahzar ismi	Dozaj Şekli	Dozu	Firma Adı
Voltaren	Ampul	75mg/3mL	Novartis
Deflamat	Ampul	75mg/3mL	Tripharma
Diclojik	Ampul	75mg/3mL	Osel
Miyarden	Enterik Draje	50 mg	Yavuz ilaç
Dikloron	Ampul	75mg/3mL	Deva
Miyaden	Ampul	75mg/3mL	Yavuz İlaç
Volfenaks	Ampul	75mg/3mL	İ.E. Ulagay
Actinoma	Jel	3%	Orva
Diklo-S	Jel	4%	Bilim
Romatim	Jel	1%	Kurtsan
Aftojel	Jel	3%	Orva
İnflaset Steril Göz damlası	Oftalmik ürün	0,10%	Bilim
Ocubrax Steril Göz Damlası	Oftalmik ürün	0,10%	Liba

2.6.1. Diklofenak Sodyumun Çevre Üzerindeki Etkisi

İlaçlar özellikle de ağrı kesici ilaçların bilinçli ya da bilinçsiz tüketimi son yıllarda hızla artmıştır. Bu artış beraberinde bazı sorunları da getirmiştir. Basit bir eklem ağrısını gideren ilaçtan tutun da göz damlalarının içinde dahi bulunan diklofenağın son dönemlerde çevre sağlığını olumsuz yönde etkilediği bazı araştırmacılar tarafından ortaya konulmuştur. Son zamanlarda yapılan araştırmalar sulardaki µg/L düzeyinde bulunan diklofenağa maruz kalan canlılarda bir takım hasarlar meydana geldiğini

göstermiştir. 2004 yılında Scgwaiger ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada 1µg/L ile 500µg/L arasındaki derişimlerdeki diklofenak gökkuşığı balıklarının yaşadığı ortama uygulanmıştır. 28 gün sonra, 5µg/L ve üzeri diklofenak derişiminde balıklarda bazı hasarlar ortaya çıkmıştır [64].

Hofmann ve arkadaşlarının 2007 yılında yapmış oldukları araştırmalar akbaba popülasyonu üzerine de diklofenağın öldürücü etkiye sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır [65].

Wuersch ve arkadaşları,İsviçre’de 3 farklı atık su arıtım tesisinde bazı asidik ilaçların (ibuprofen, mefenamik asit, ketoprofen, klofibril asit ve diklofenak) oluşumunu incelemiş ve risk değerlendirmesini çalışmışlardır. Bu araştırma sonucu ibuprofen, mefenamik asit ve diklofenağın atık su arıtım tesislerinde çok az giderildiği, çıkış sularında yüksek derişimlerde bulunduğu, bu ilaçların yüzey suları için potansiyel kirlenici olduğu ve çevresel risk oluşturduğu tespit edilmiştir [66].

DeLorenzo ve arkadaşları deniz fitoplanktonu olan *Dunaliella tertiolecta* üzerinde diklofenak etkisini araştırmışlardır. 25 mg/L ve üzerindeki derişimlerdeki diklofenak miktarının bu canlılar için zehirli olduğunu rapor etmişlerdir [67].

3. Materyal ve Yöntemler

Tez kapsamında yapılan deneysel çalışmaları aşağıda verilen başlıklar altında toplayabiliriz:

- Metakrilik asit-diklofenak önkompleksinin hazırlanması,
- Metakrilik asit-diklofenak (MAAD) önkompleksinin karakterizasyonu
- SPR çip altın yüzeyinin alil merkaptan ile yüzey modifikasyonu
- Diklofenak baskılanmış metakrilik asit-diklofenak (PMAAD) ve diklofenak baskılanmamış metakrilik asit (PMAA) SPR sensörlerin hazırlanması,
- Kalıp molekül diklofenakın SPR sensör yüzeyinden uzaklaştırılması,
- Diklofenak baskılanmış PMAAD ve diklofenak baskılanmamış PMAA SPR sensörlerin karakterizasyonu,
- Diklofenak baskılanmış PMAAD SPR sensörün sulu çözeltiden farklı derişimlerdeki diklofenak etkileşimleri için SPR analizlerinin gerçekleştirilmesi,
- Diklofenak baskılanmış PMAAD ve baskılanmamış PMAA SPR sensörün karbamazepin bulunduğu ortamda seçiciliğinin incelenmesi,
- PMAAD sensörün tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi.

3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Metakrilik asit-diklofenak (PMAAD) nanofilmin hazırlanmasında kullanılan temel bileşenlerden, 2,2'-azobisisobütironitril (AIBN), etilenglikoldimetakrilat (EDMA), kalıp molekül olarak kullanılan diklofenak(DFC), Tetrahidrofuran (THF), toluen, seçicilik çalışmalarında kullanılan karbamazepin (Sigma Chemical Co., ABD) firmasından temin edilmiştir. Reaktifler kullanılabildiği kadar 4°C'de muhafaza edilmiştir. Çalışmada kullanılan diğer kimyasallar Merck AG (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir ve analitik saflıktadır.

Deneylerde kullanılan su, yüksek akışlı selüloz asetat zar (Barnstead D2731) ile ters ozmoz Barnstead (Dubuque, IA) ROpure LP® birimi ve iyon değiştirici dolgulu kolon sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen saf suyun direnci 18MΩ/cm'dir. Deneylerde kullanılan cam malzemeler bir gece boyunca 4.0 M nitrik asitte bekletilerek temizlenmiştir.

3.2. Metakrilik asit-Diklofenak (MAAD) Önkompleksinin Karakterizasyonu

UV spektrofotometresi (UV mini 1240 SHIMADZU) kullanılarak MAAD önkompleksinin UV spektrumu elde edilmiştir. Farklı mol oranlarında hazırlanan fonksiyonel monomer ve analit, 275 nm dalga boyunda UV spektrofotometrisine tabi tutulup spektrumları alınmıştır.

3.3. SPR Çip Altın Yüzeyinin Allil Merkaptan ile Yüzey Modifikasyonu

SPR çip altın yüzeyi allil merkaptan ($\text{CH}_2\text{CHCH}_2\text{SH}$) kullanılarak modifiye edilmiştir (Şekil 3.1). Modifikasyon öncesinde çip altın yüzeyi asidik pirana çözeltisi ile temizlenmiştir. 20 mL asidik pirana çözeltisi içine daldırılan altın yüzeyler 20 saniye asidik çözelti içinde kalmıştır. Çözeltiden çıkarılan çipler saf etil alkol ile yıkanmış ve vakum etüvünde (200 mmHg, 40°C) 3 saat kurutulmuştur. Temizlenen SPR çip altın yüzeyine 10 µL allil merkaptan damlatılmış ve 12 saat çeker ocakta muhafaza edilerek bekletilmiştir. Bu işlemlerden sonra altın yüzeyler etil alkol ile yıkanmış ve azot atmosferinde kurutulmuştur. Modifikasyon sonucunda SPR çip altın yüzeyine allil grupları bağlanmıştır.

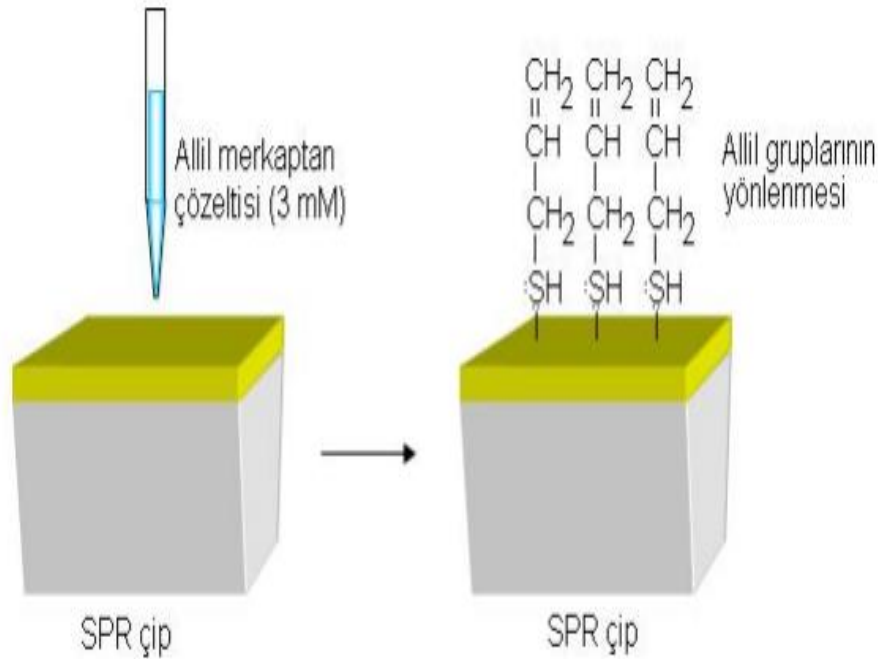
3.4. Diklofenak Baskılanmış PMAAD ve Baskılanmamış PMAA SPR Sensörlerin Hazırlanması

Diklofenak tanıma bölgelerine sahip nanofilm, metakrilik asit-diklofenak ön kompleksinin EDMA çapraz bağlayıcısı eşliğinde polimerleştirilmesiyle elde edilmiştir. Metakrilik asit-diklofenak ön kompleksi kalıp molekül olarak diklofenak, fonksiyonel monomer olarak metakrilik asit monomerinin etkileşimiyle hazırlanmıştır. Bunun için 10 mg diklofenak, 381 mL metakrilik asit ile $3,14 \times 10^{-2}$ (mmol) kalıp molekül, fonksiyonel monomer oranı sağlanarak kompleksleştirildi. (PMAAD) ön kompleksine 1370 µL toluen ve 430 µL tetrahidrofuran aprotik çözücü karışımı eklenerek ön kompleksin homojen çözeltisi hazırlanmıştır. Çözölmüş olan (PMAAD) ön kompleksine 110 µL EDMA çapraz bağlayıcı eklenerek sonikatörde 10 dakika çözümleri sağlandı. Polimer çözeltisinden 5 dakika N_2 gazı geçirilerek çözönmüş O_2 ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Başlatıcı olarak 10 mg AIBN eklendikten sonra allilemiş çip altın yüzeyine 1 µL polimer çözeltisi damlatılmıştır. Çip yüzeyindeki polimerizasyon UV lamba altında 40 dakika fotopolimerizasyon ile sağlanmıştır. Polimerizasyon sonrası reaksiyona girmeyen monomerler etil alkol ile uzaklaştırılmıştır. Kalıp molekül, monomer ve çapraz bağlayıcı oranı 1:11:14'tür.

Çözelti içindeki monomer yüzdesi %25 (w/v) olarak belirlenmiştir. Diklofenak baskılanmamış nanofilm, baskılanmış polimer çözeltisine benzer olarak diklofenak eklenmeden hazırlanmıştır.

3.5. Kalıp Molekül Diklofenakın SPR Sensör Yüzeyinden Uzaklaştırılması

Elde edilen polimerik SPR sensörden kalıp molekül diklofenakın uzaklaştırılması için metanol: asetik asit (9:1, v:v) desorpsiyon çözeltisi olarak kullanılmıştır. Diklofenak baskılanmış SPR sensör oda sıcaklığında desorpsiyon çözeltisi kullanılarak her on beş dakikada bir desorpsiyon çözeltisi yenilenerek bir buçuk saat boyunca yıkanmıştır. Bu işlem kalıp molekül olarak kullanılan diklofenakın 275 nm'de UV spektrofotometresiyle tayin edilmeyene kadar tekrarlanmıştır.



Şekil 3.1. Allil merkaptan ile yüzeyin modifiye edilmesi ve allil gruplarının bağlanması.

3.6. SPR Sensörlerin Karakterizasyonu

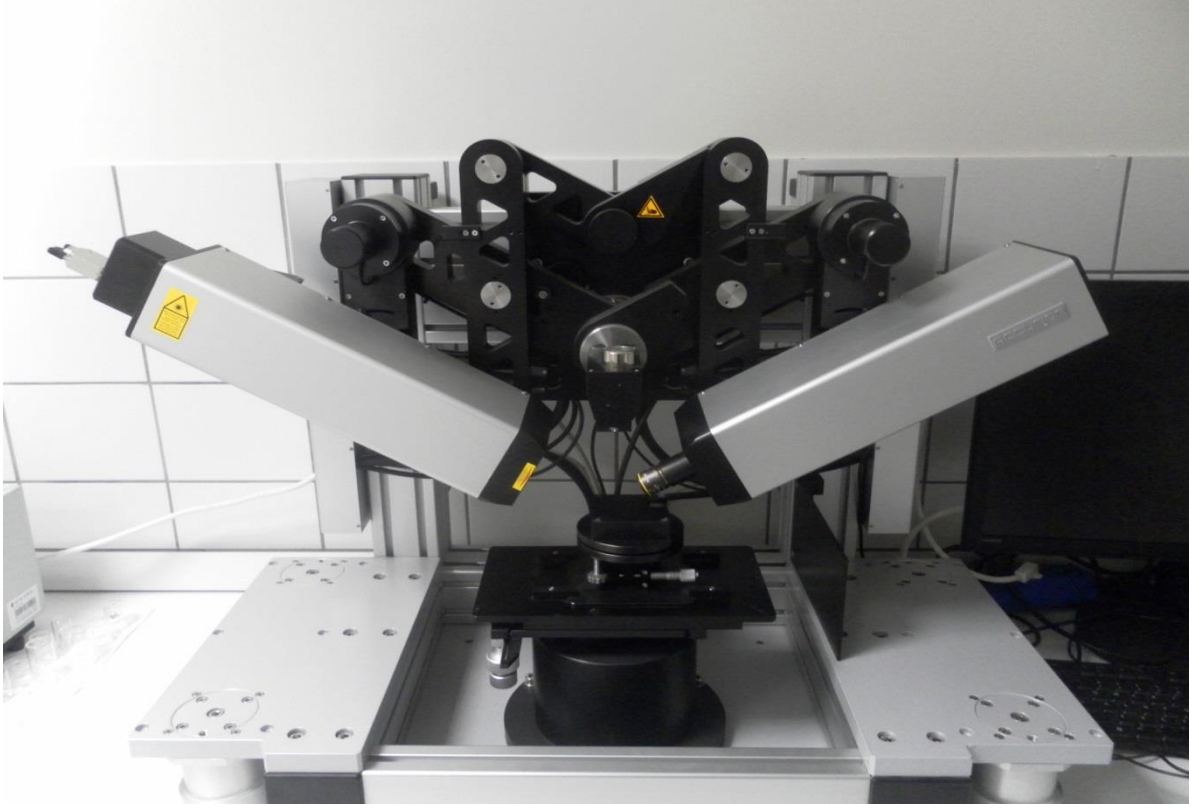
3.6.1. Atomik Kuvvet Mikroskopisi

Diklofenak baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensörlerin altın yüzeylerinin karakterizasyonu yarı temas modunda atomik kuvvet mikroskobu (Nanomagnetics Instruments, Oxford, İngiltere) kullanılarak elde edilmiştir. Kullanılan atomik kuvvet

mikroskobu cihazı, serbest kantileverlı interferometre özelliği ile çok yüksek çözünürlükte (4096 x 4096 piksel) ölçüm alabilmektedir. SPR sensörler çift yüzlü karbon bant ile örnek tutucuya yerleştirilmiştir. SPR sensörü görüntüleme çalışmaları yarı temas modunda, hava ortamında gerçekleştirilmiştir. Salınım rezonans frekansı, 341.30 Hz olarak uygulanmıştır. Titreşim genliği, $1 V_{RMS}$ ve boş titreşim genliği ise $2 V_{RMS}$ 'dir. Örnekler $2 \mu\text{m/s}$ tarama hızında, 256×256 piksel çözünürlükte, $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ 'lik bir alanın görüntüsü olarak alınmıştır.

3.6.2. Elipsometre Ölçümleri

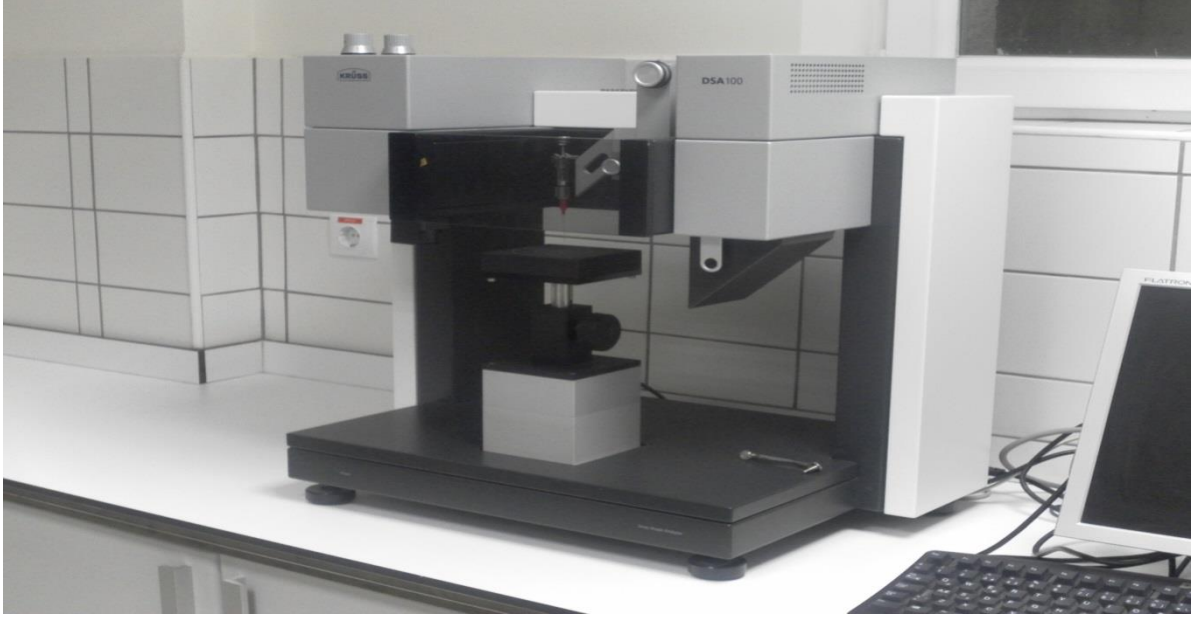
SPR sensörlerin yüzeyindeki polimerin kalınlığı görüntüleme yapan elipsometre (Nanofilm EP3 – Nulling Elipsometre Göttingen, Almanya)(Şekil 3.2) ile ölçülmüştür. Polimerin kalınlık ölçümleri 658 nm dalga boyunda, 65° 'lik bir geliş açısında, 10x büyütme ve %2'lik lazer gücünde gerçekleştirilmiştir. SPR çipi lazer ışık kaynağı altına yerleştirilmiş ve yüzey kalınlığı hesaplama programı için SF10 prizma+45 nm altın veri olarak öngörülmüştür. Ölçümler sensör yüzeyinde yaklaşık $350 \mu\text{m} \times 350 \mu\text{m}$ 'lik bir alanda, 3 farklı noktada 3 kere tekrarlanmış ve sonuçlar bu değerlerin ortalaması alınarak elde edilmiştir. Diklofenak baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensörlerin analiz etmek için 4 faz modeli (hava/polimerik tabaka/altın/krom ve SF10 cam) uygun görülmüştür.



Şekil 3.2. Nanofilm EP3 ellipsometre cihazı.

3.6.3. Temas Açısı Ölçümleri

Boş SPR çipi altın yüzeyinin, diklofenak baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensörlerin yüzey karakterizasyonu Krüss DSA100 (Hamburg, Almanya) temas açısı cihazı kullanılarak elde edilmiştir (Şekil 3.3). SPR çiplerin yüzeyine 1 damla su damlatılarak, yapışık damla yöntemiyle statik ölçümde temas açısı belirlenmiştir. Çip yüzeyinin farklı bölgelerine su damlatılarak fotoğraflar çekilmiş ve her bir fotoğraf için ayrı temas açısı belirlenmiştir. Temas açısı değerleri damlacığın katı ile sol temas noktasından alınan soldan temas açısı; sağ temas noktasından alınan sağdan temas açısı olarak belirlenmiştir. Ayrıca her iki noktanın ortalaması olan ortalama temas açısı değerleri elde edilmiştir. Boş SPR çipi altın yüzeyi, diklofenak baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensör yüzeyleri için temas açısı değerleri, her biri için alınan 10 ölçümün ortalama değerleri olarak hesaplanmıştır. Temas açısı değerleri DSA2 yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.3. Krüss DSA100 temas açısı cihazı.

3.6.4. FTIR-ATR Spektrofotometre Analizi

SPR çipinin altın yüzeyinin karakterizasyonu, FTIR-ATR spektrofotometresi (Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS10, Waltham, MA, ABD) kullanılarak elde edilmiştir. SPR sensör, cihazın örnek yuvasına yerleştirilmiş 400-4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında yüzeyde gerçekleşen toplam yansıma miktarı ölçülmüştür.

3.7. Yüzey Plazmon Rezonans Sistemi ile Plazmon Ölçümleri

SPR sensörlerin, yüzey plazmon eğrileri yüzey plazmon rezonans sistemi SPRiLab (GenOptics, Orsay, Fransa) ile alınmıştır. 25.0 x 12.5 mm yüzey alanına sahip 50 nm kalınlıkta altın kaplı SPR sensörler GenOptics firmasından (Orsay, Fransa) temin edilmiştir. Görüntü alınması sırasında ışığın SPR sensöre ulaşma açısı değiştirilerek (48.7-56.7°) ışığın % kırılma değerleri elde edilmiştir. Alınan değerler incelenmiş ve yüzey plazmon eğrileri ışığın geliş açısına karşı % kırılma miktarı ve eğimi grafiğe geçirilerek rapor edilmiştir.

3.8. Diklofenak Baskılanmış SPR Sensörle Kinetik Analizler

Diklofenak baskılanmış SPR nanosensörün hazırlanması ve karakterizasyonundan sonra kinetik çalışmalara geçilmiştir. Kinetik çalışmalar, farklı derişimlerdeki diklofenak çözeltileri ile gerçekleştirilmiştir. Farklı derişimlerdeki bu çözeltilerde

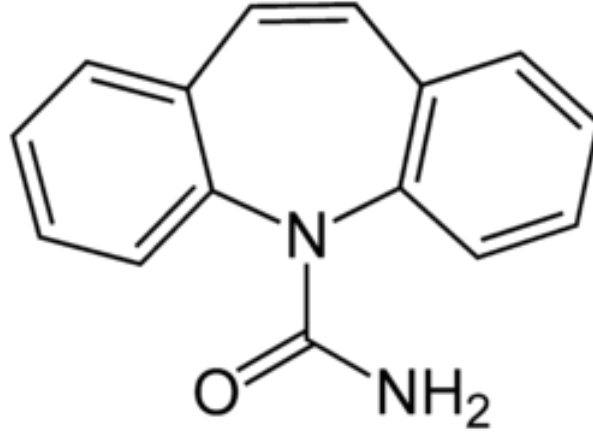
metanol:su (1:1) karışımında 0,005-10,0 µg/mL arasında hazırlanarak SPR sistemine verilmiştir. Şekil 3.4'de GenOptics SPRiLab sistemi gösterilmektedir. GenOptics SPRiLab, lazer kaynağı, ayna sistemi, CCD kamera sistemi, peristaltik pompa ve bilgisayardan oluşmaktadır. Yüzeyinde diklofenak tanıma bölgelerine sahip nanofilm tutturulan SPR sensör, kinetik analiz çalışmalarında kullanılmıştır. SPR sisteminde kullanılan deneysel yöntem şu şekildedir: SPR nanosensör yüzeyi deiyonize su (50 ml) ile yıkanmıştır. Sistemden metanol-su karışımı(1:1) geçerken yüzey plazmon eğrileri alınmış ve rezonans kırılma açısı tespit edilmiştir. Cihaz belirlenen kırılma açısına ayarlanarak, kinetik çalışmalar bu açı değerinde gerçekleştirilmiştir. SPRview yazılımının kinetik görüntüleme programı kinetik analiz çalışmalarında kullanılmıştır. Bu program, dakikada yaklaşık 150 kırılma miktarı değerini ölçmekte ve anlık olarak % kırılma miktarı değişiminin gözlenmesini sağlamaktadır. Plazmon eğrileri alınması ve aynanın rezonans açısı değerine ayarlanmasının ardından, SPR sisteminden 5 dakika süreyle dengeleme tamponu olarak metanol-su karışımının verilmesine devam edilmiştir. Bu basamaktan sonra, farklı derişimlerdeki diklofenak çözeltileri (10 mL, 2.0 ml/dakika akış hızı)teker teker SPR sistemine verilmiştir. Rezonans frekansındaki kayma değerleri anlık olarak gözlenmiş ve denge durumuna geldiğinde sisteme %10'luk asetik asit-metanol çözeltisi (10 mL, 2.0 ml/dak. Akış hızı, 25°C) desorpsiyon ajanı olarak verilmiştir. SPR sensörün desorpsiyonundan sonra, sensör su ve metanol-su çözeltisi ile yıkanmıştır. Farklı derişimlerdeki birbiri ardı sıra diklofenak çözeltileri SPR sistemine verilmeden önce adsorpsiyon-desorpsiyon-temizleme işlemleri tekrarlanmıştır.



Şekil 3.4. GenOptics SPRiLab sistemi.

3.9. SPR Çipin Baskılama Seçiciliğinin Belirlenmesi

Diklofenak tanıma bölgelerine sahip SPR sensörün seçiciliğini göstermek için diklofenak baskılanmamış SPR sensör hazırlanmıştır. Diklofenak ve karbamazepin moleküllerinin kullanılmasıyla oluşturulan karışımlar (0,5 µg/mL, 10 ml, 2.0 ml/dak. Akış hızı, 25°C) SPR sisteme verilmiştir. Hazırlanan çözeltilerin sisteme verilmesinden sonra grafikler elde edilmiştir.



Şekil 3.5. Karbamazepinin kimyasal formülü

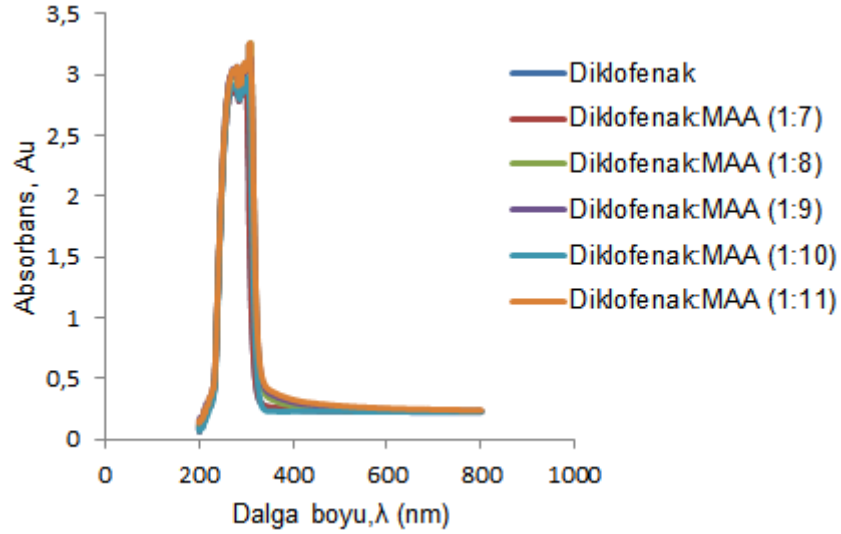
3.10. Diklofenak Baskılanmış Sensörün Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi

Diklofenak baskılanmış sensörün tekrar kullanılabilirliğinin incelenmek amacıyla 0.5 µg/mL derişimlerde hazırlanmış diklofenak içeren çözeltiler (0.5 µg/mL, 10 mL, 2.0 mL/dak. Akış hızı, 25°C) SPR sistemine verilmiştir. Bu işlem on kez tekrar edilmiştir.

4.SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1.Diklofenak-metakrilik asit Ön Kompleksinin Hazırlanması

MAAD ön kompleksini hazırlamak için diklofenak ve metakrilik asit kullanılmıştır. Diklofenak-metakrilik asit kompleksini oluşturan kalıp molekül olarak kullanılan diklofenak fonksiyonel monomer olarak kullanılan metakrilik asitin stokiyometrik olarak birleşme oranlarını tayin etmek için farklı oranlarda MAAD (1:7; 1:8; 1:9; 1:10; 1:11) kompleksleri hazırlanmıştır. Kalıp molekül (diklofenak) oranları sabit tutularak artan mol oranlarında metakrilik asitin kompleksleşmeye etkisi spektrofotometre kullanılarak incelenmiştir. 200-700 nm dalga boyu aralığındaki MAAD ön komplekslerinin absorpsanları ölçülmüştür. (Şekil 4.1). Elde edilen absorpsanlardan, absorpsanın artan metakrilik asit oranı ile arttığı, 1:11 MAAD oranında değişiklik göstermediği tespit edilerek kalıp molekül : monomer oranı 1:11 olarak bulunmuştur.

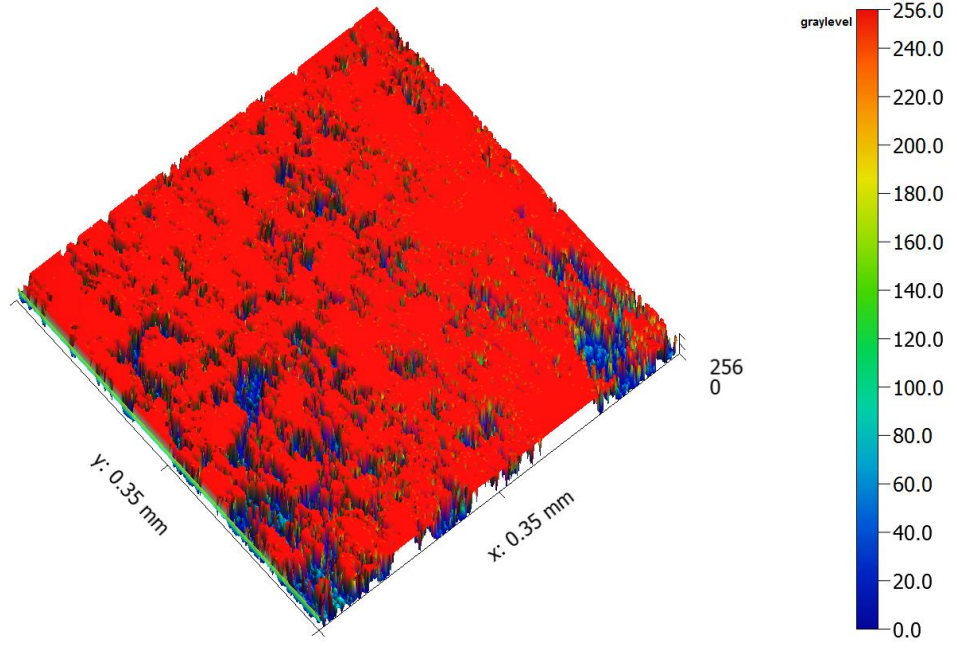


Şekil 4.1. Kalıp molekül diklofenak:fonksiyonel monomer oranının belirlenmesi; MAAD monomerlerinin mol oranı (1:7; 1:8; 1:9; 1:10; 1:11).

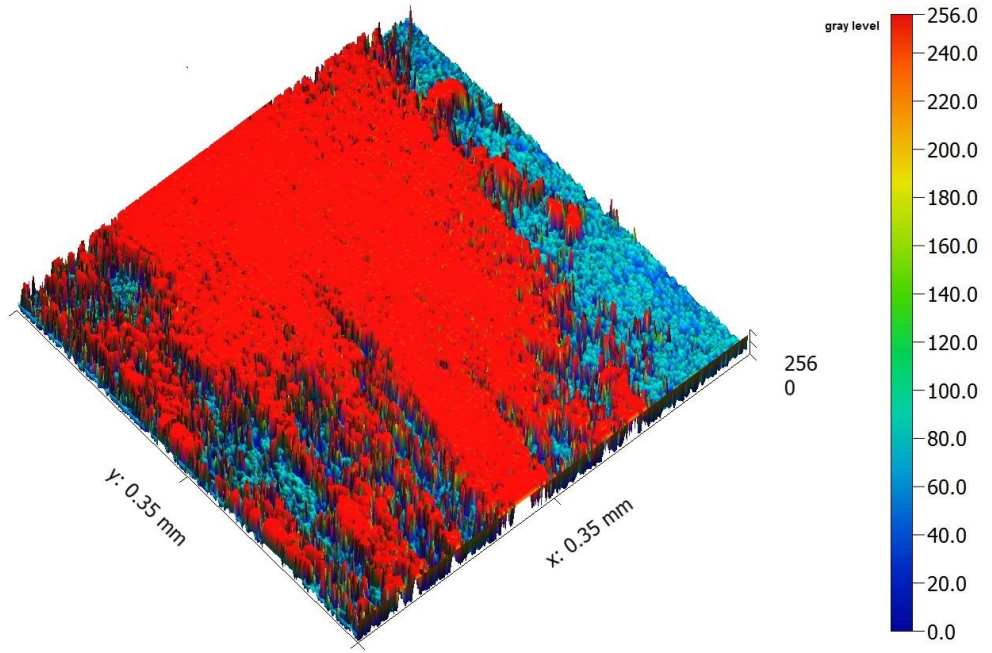
4.2. SPR Sensörlerin Yüzey Karakterizasyonu

4.2.1. Elipsometre Analizi

Diklofenak baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensörlerin yüzey kalınlık ölçümleri elipsometre cihazı kullanılarak elde edilmiştir (Şekil 4.2). Alınan ölçümler 658 nm dalga boyunda, 60°'lik geliş açısında gerçekleştirilmiştir. Diklofenak baskılanmış SPR sensörün ortalama kalınlığı 20.6 nm, ortalama pürüzlülüğü 1.514 nm olarak bulunmuşken, diklofenak baskılanmamış SPR sensörün ortalama kalınlığı 7.3 nm, ortalama pürüzlülüğü de 1.452 nm olarak bulunmuştur.



a

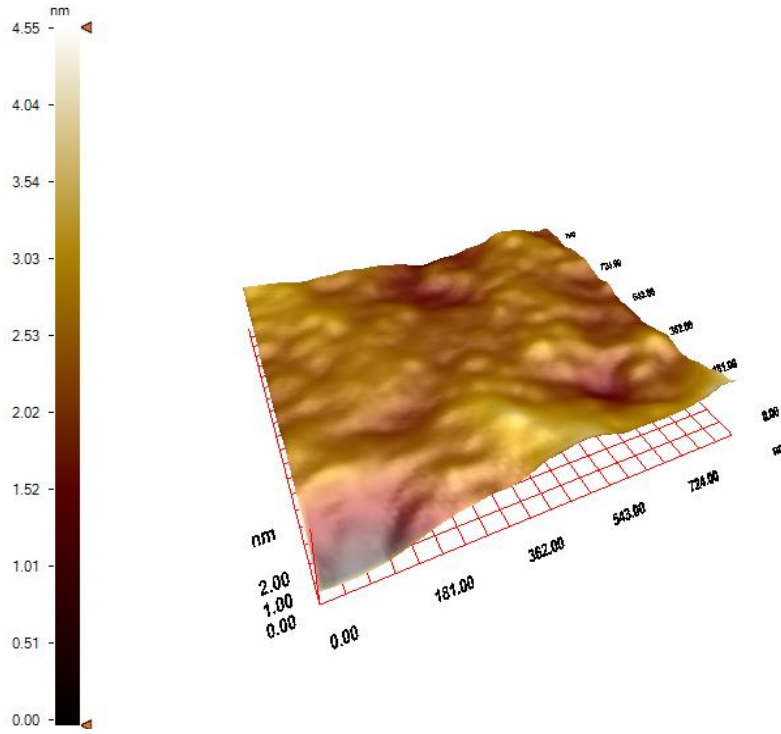


b

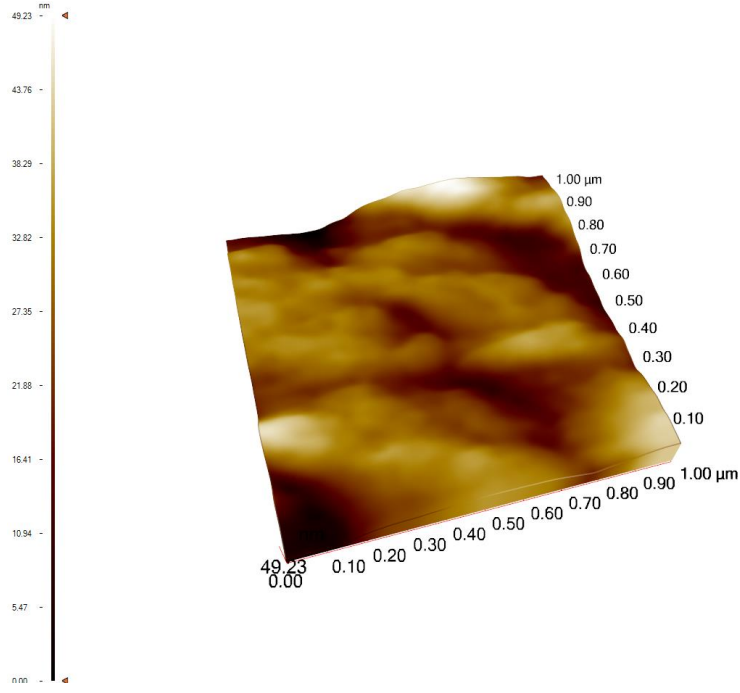
Şekil 4.2 Diklofenak baskılanmış (a) ve baskılanmamış (b) SPR sensörlerin elipsometrik ölçümde alınan 3 boyutlu görüntüleri.

4.2.2. Atomik Kuvvet Mikroskobu Analizi

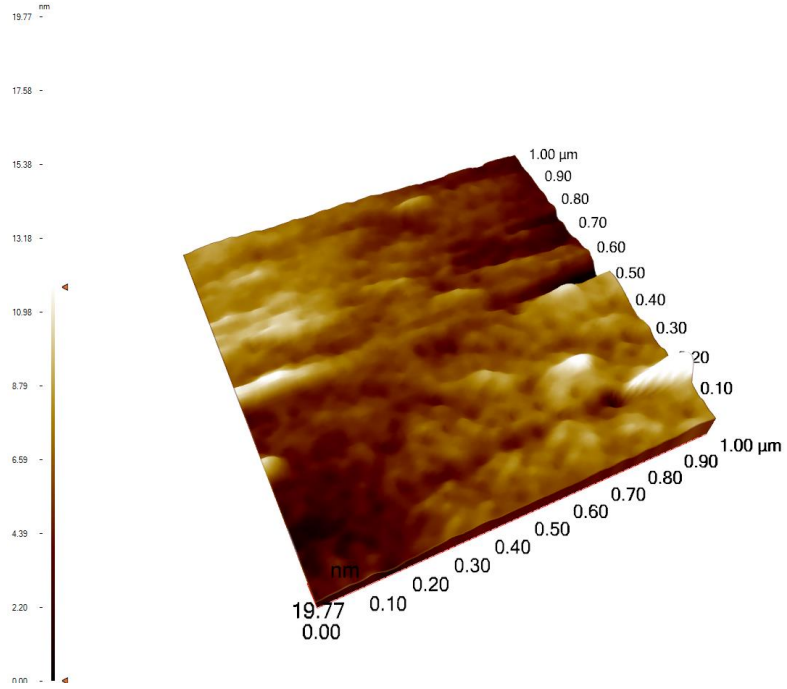
Boş SPR çip, Diklofenak baskılanmış ve baskılanmamış SPR çiplerinin yüzey morfolojisi atomik kuvvet mikroskobuyla yarı temas modunda elde edilmiştir. Asidik pirana çözeltisi ile temizlenmiş boş SPR çipin yüzey derinliği 4.55 nm olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.3). Diklofenak baskılanmış SPR sensörün ortalama pürüzlülüğü 8.16 nm (Şekil 4.4), diklofenak baskılanmamış SPR sensörün ortalama kalınlığı 1.51 nm (Şekil 4.5) olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar diklofenak baskılanmış ve baskılanmamış nanofilmlerin SPR altın yüzeyine başarılı bir şekilde tutunduğunu göstermektedir.



Şekil 4.3. Boş SPR çip altın yüzey derinliği.



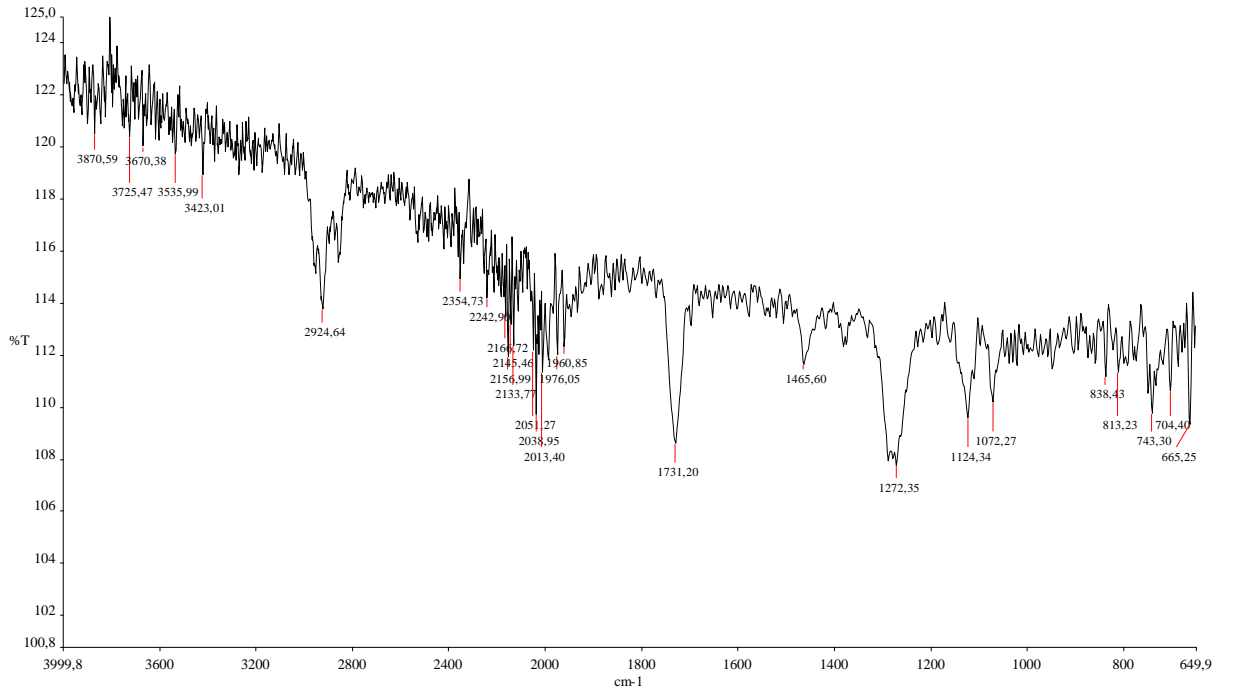
Şekil 4.4. Diklofenak baskılanmış SPR çipin yarı temas modunda alınan AFM görüntüsü.



Şekil 4.5. Diklofenak baskılanmamış SPR çipin yarı temas modunda alınan AFM görüntüsü.

4.2.3. FTIR-ATR Analizi

Metakrilik asit polimerini karakterize etmek için FTIR-ATR cihazı kullanılmıştır (Şekil 4.6). 1731 cm^{-1} 'deki band metakrilik asit monomerindeki C=O bandından kaynaklanmaktadır. 3423 cm^{-1} 'deki bant $-\text{COOH}$ gruplarıyla ilişkili bazı su moleküllerinden kaynaklanmaktadır. 1272 cm^{-1} 'deki bant asit dimerlerinden gelen banttir. Monomer yapısına ait titreşim, gerilme ve eğilme bantları, metakrilik asit monomerinin sentezinin gerçekleştiğini göstermektedir [61,62].

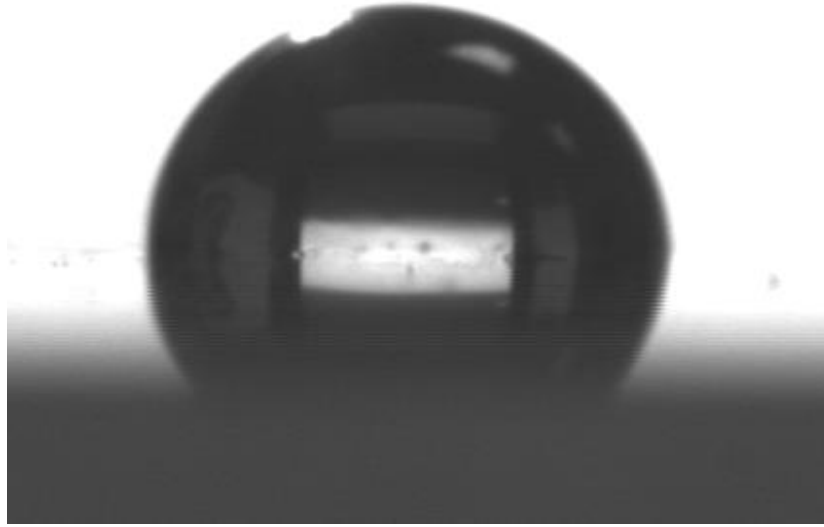


Şekil 4.6. SPR temelli nanofilme ait FTIR-ATR spektrumu.

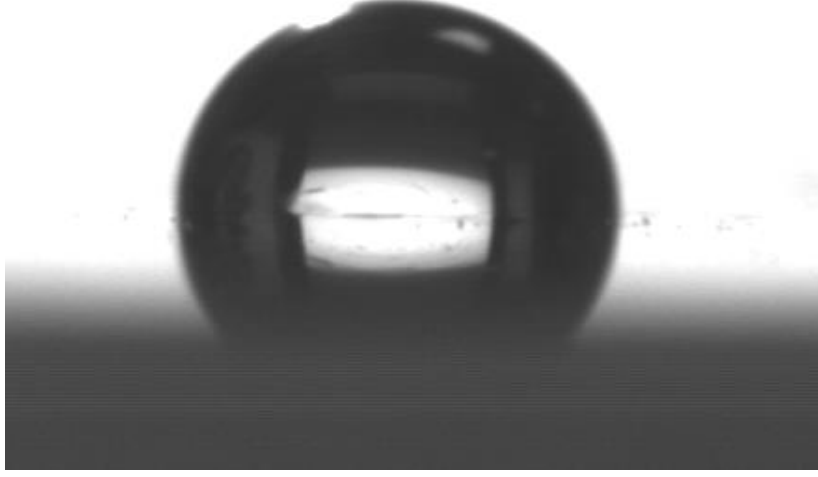
4.2.4. Temas Açısı Ölçümleri

Boş SPR çip, diklofenak baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensörlerin yüzey karakterizasyonu Krüss DSA100 (Hamburg, Almanya) temas açısı cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen temas açısı değerleri DSA2 yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır. Boş SPR altın yüzeyinin, diklofenak baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensörlerin yüzey temas açısı değerleri Çizelge 4.1'de verilmiştir.

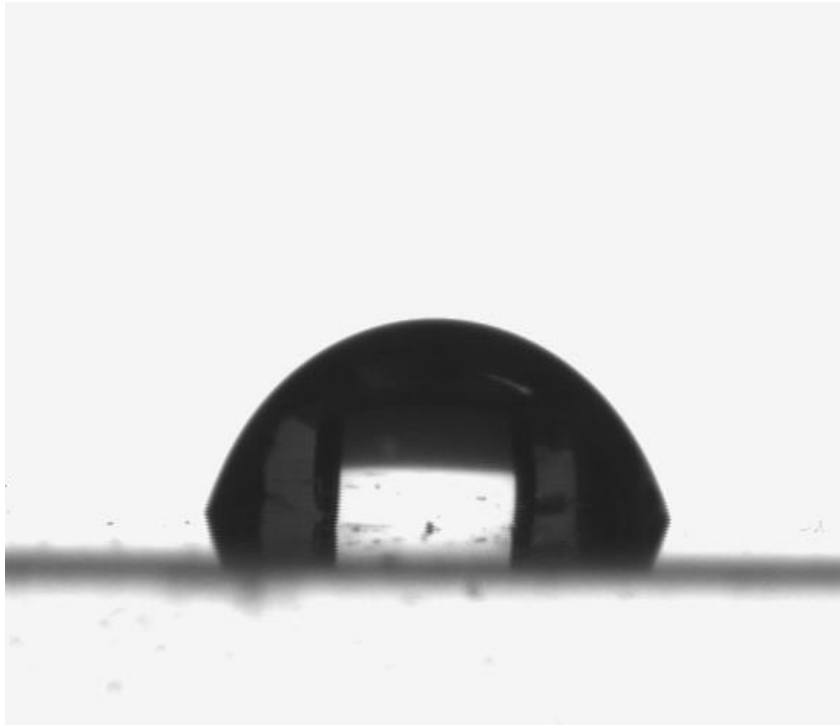
Çizelge 4.1'den görüldüğü üzere boş SPR çipinin altın yüzeyinin temas açısı değeri 81.4° iken, diklofenak baskılanmış SPR çipte 76.8° 'ye düşmüştür. Diklofenak baskılanmamış SPR çipin temas açısı değeri 75.4° olarak belirlenmiştir. Yüzeyin temas açısı değerindeki bu azalma yüzeyin hidrofilitésinin arttığını göstermektedir. Bu durum şu şekilde açıklanabilir. Metakrilik asit hidrofilik karakterde bir malzeme olduğundan dolayı, yüzeyde hidrofilik bir polimerin bulunması yüzey hidrofilitésini arttırmış ve temas açısı değerini düşürmüştür. Şekil 4.7a'da boş SPR çip altın yüzeyinin, Şekil 4.7b'de diklofenak baskılanmış SPR sensörün ve Şekil 4.7c'de diklofenak baskılanmamış SPR sensör yüzeyinin temas açısı görüntüleri verilmiştir.



(a)



(b)



(c)

Şekil 4.7. Boş altın yüzey (a), diklofenak baskılanmış SPR sensör yüzeyi (b) ve diklofenak baskılanmamış SPR sensör yüzeyi (c) temas açısı fotoğrafları.

Çizelge 4.1. Boş SPR çipinin yüzeyi, Diklofenak baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensör yüzeylerinin temas açıları.

Yüzey	Temas Açısı°
Modifiye edilmemiş altın yüzey	81.4°
Diklofenak baskılanmış SPR sensor yüzeyi	76.8°
Diklofenak baskılanmamış SPR sensor yüzeyi	75.4°

4.3. SPR Nanosensörlerle Kinetik Analizler

Biyomoleküllerin tayininde sıklıkla kullanılan enzim, radyoaktif veya floresan işaretleme yöntemlerinin aksine SPR temelli biyosensörler, herhangi bir işaretleme gerek duyulmadan kullanılabilirler. İşaretleme işleminin yapılmaması hem zaman kazandırmakta hem de maliyeti düşürmektedir. İşaretleyici olarak kullanılan moleküllerin ortamda bulunan diğer moleküllerle etkileşiminden dolayı yanlış sonuçlar elde edilebilmektedir. SPR temelli sensörlerin kullanılmasıyla söz konusu sorunlar giderilebilmektedir. Ayrıca SPR sensörlerde analit ve yüzey etkileşimi gerçek zamanda ve doğrudan ölçülebilmektedir. Bu özellik nicel olarak kinetik, termodinamik ve derişim parametrelerinin belirlenmesini veya nitel olarak ligand ile analit arasındaki ilişkinin karakterize edilmesini sağlamaktadır.

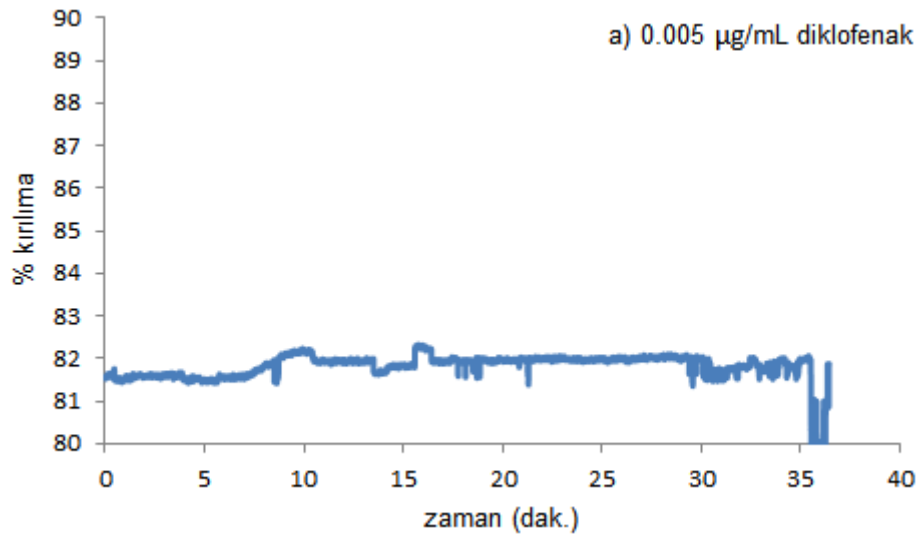
Bu çalışma kapsamında diklofenak baskılanmış SPR nanosensörler hazırlanmıştır. Diklofenak derişimi ile SPR sinyali arasındaki ilişkinin değerlendirilebilmesi için farklı derişimlerde (0,005-10,0 µg/mL) diklofenak çözeltileri hazırlanmıştır. Çözeltiler peristaltik pompa kullanılarak SPR nanosensörler ile etkileştirilmiş ve SPRview yazılımı kullanılarak kinetik veriler alınmıştır. Şekil 4.8'de farklı derişimlerde hazırlanan diklofenak çözeltilerinden elde edilen grafikler verilmiştir.

Çeşitli ortamlarda diklofenak tayinine yönelik bazı çalışmalar yapılmıştır. Schwaiger ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, gökkuşağı balıklarının yaşadıkları ortamlara 1.0 µg/L ve 500 µg/L aralığındaki farklı diklofenak derişimini 28 gün boyunca uygulamışlardır. 28. günün sonunda 5 µg/L - 500 µg/L 'lik diklofenak

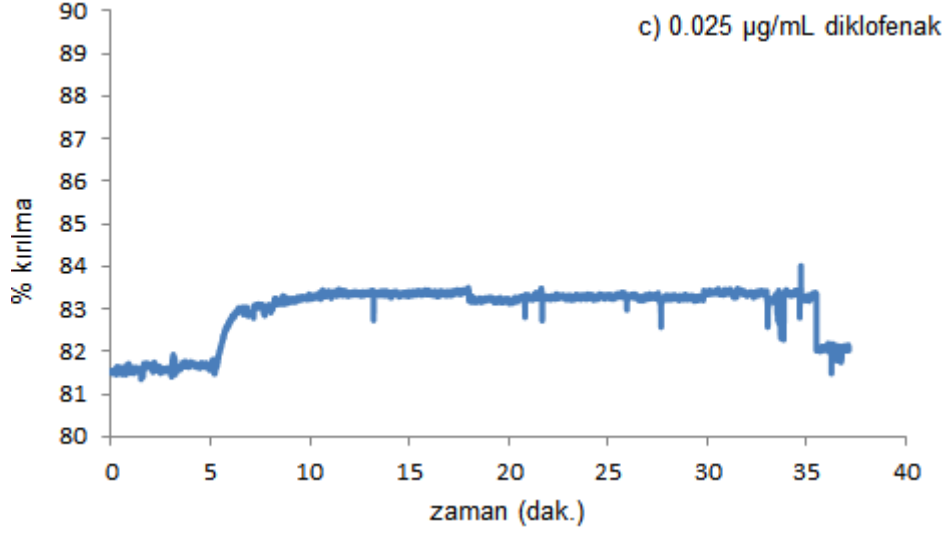
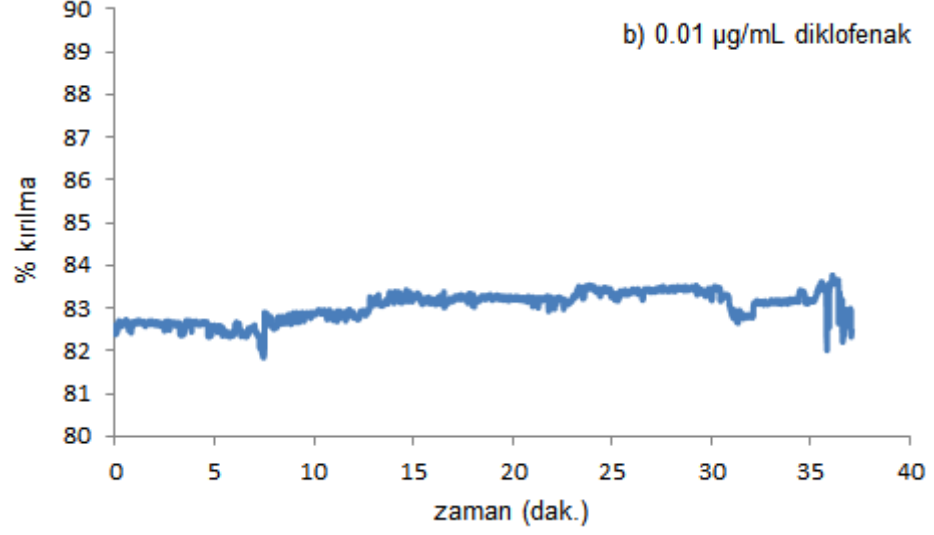
derişimi balıkların farklı organlarını olumsuz etkilediği ortaya çıkmıştır. Yapılan tüm çalışmalar bu aralıklar referans alınak yapılmıştır. Noee ve arkadaşları diklofenağın idrar örneklerindeki miktarının 5 mg/L olduğu tesbit edilmiş ve hazırladıkları diklofenak baskılanmış mikrokürelerle bu ortamdan diklofenağın uzaklaştırılmasını hedeflemişlerdir. Uzaklaştırmanın ardından ortamda 0,227- 0,085 mg/L aralığında diklofenak olduğu belirlemişlerdir.

şekil 4.8'de farklı derişimlerde diklofenak zeltelerinin SPR nanosensrlere uygulanması ile elde edilen % kırılmaya karşılık zaman grafikleri verilmiştir. şekilden de görüldüğü gibi sensör yüzeyine diklofenak uygulanmasıyla birlikte % kırılma değeri artmaktadır.

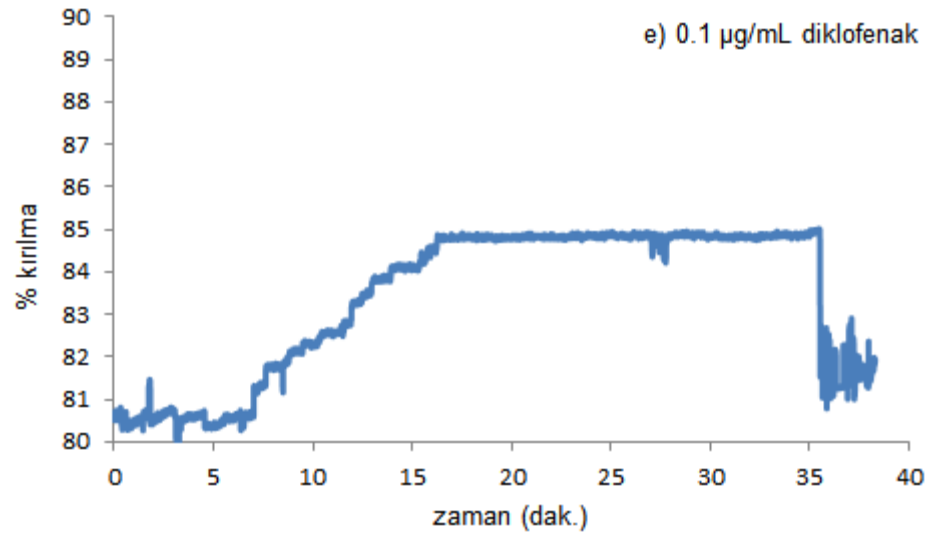
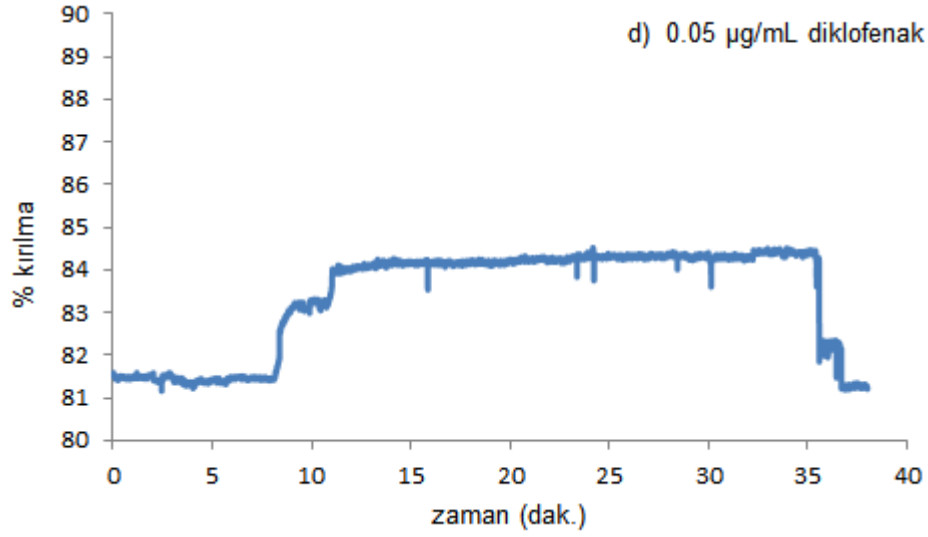
şekil 4.9'de tüm grafikler bir arada verilmiştir. Standart bir ölçümde, sistemden öncelikle denge tamponu daha sonra sistem yeniden dengeye ulaşana kadar diklofenak çözeltisi geirilmif ve son aşamada desorpsiyon çözeltisi kullanılmıştır. Bütün ölçümlerde sistemin dengeye ulaşması için 35 dakika beklenilmiştir. Desorpsiyon ve rejenerasyon işlemleri yaklaşık 20 dakika içinde gerçekleştirilmiştir.



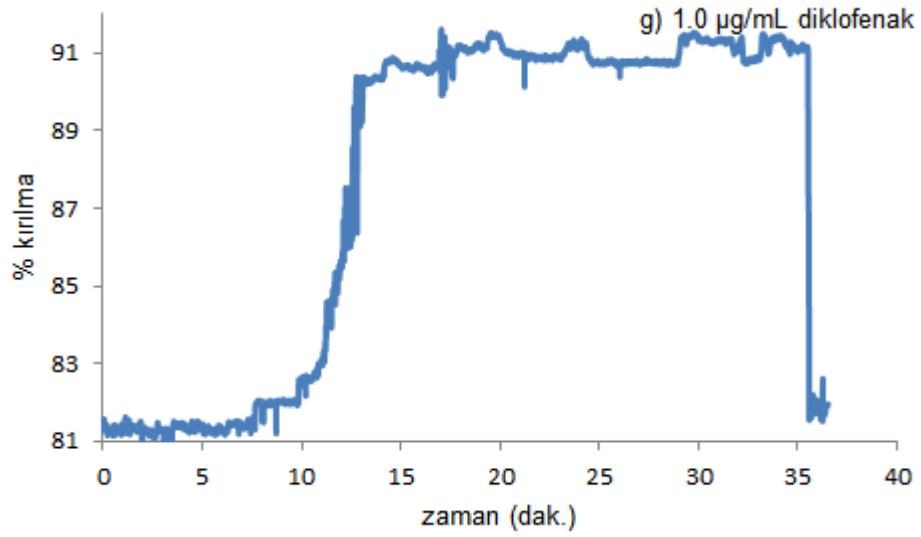
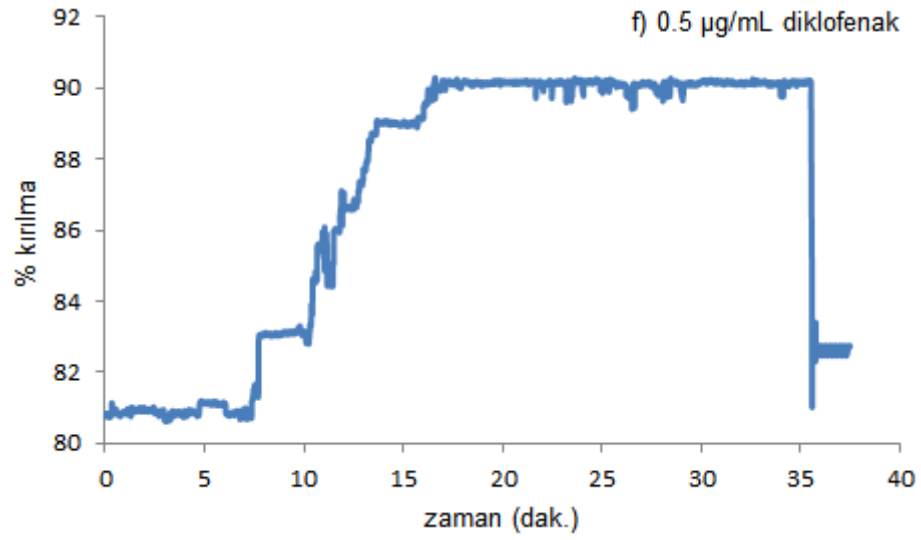
şekil 4.8. Değişik derişimlerde diklofenak zeltelerinin SPR sensörlere uygulanması ile elde edilen % kırılmaya karşılık zaman grafikleri: (a) 0.005 µg/mL; (b) 0,01 µg/mL; (c) 0.025 µg/mL; (d) 0.05 µg/mL; (e) 0.1 µg/mL; (f) 0.5 µg/mL; (g) 1.0 µg/mL; (h) 2.0 µg/mL; (i) 3.0 µg/mL; (i) 5.0 µg/mL (j) 10.0 µg/mL.



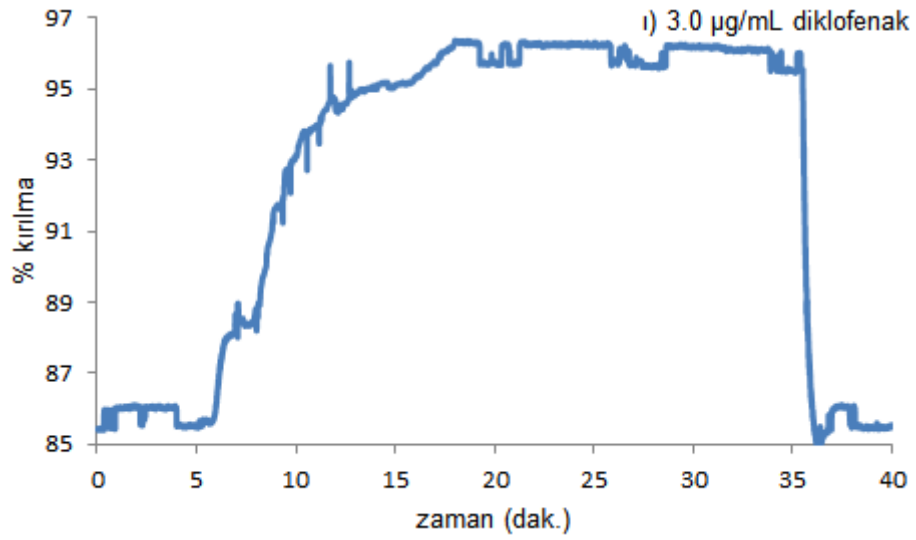
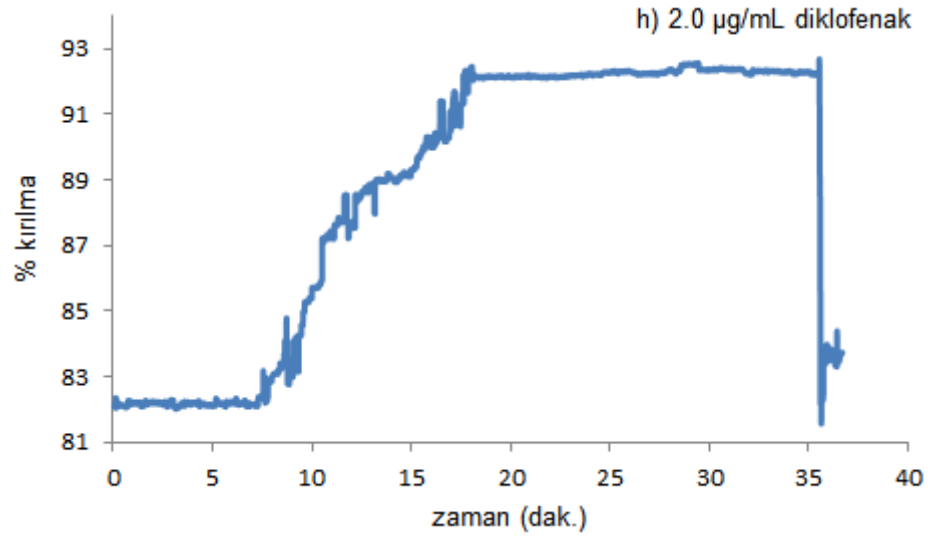
Şekil 4.8. Değişik derişimlerde diklofenak çözeltilerinin SPR sensörlere uygulanması ile elde edilen % kırılmaya karşılık zaman grafikleri: (a) 0.005 µg/mL; (b) 0,01 µg/mL; (c) 0.025 µg/mL; (d) 0.05 µg/mL; (e) 0.1 µg/mL; (f) 0.5 µg/mL; (g) 1.0 µg/mL; (h) 2.0 µg/mL; (ı) 3.0 µg/mL; (i) 5.0 µg/mL (j) 10.0 µg/mL (devamı).



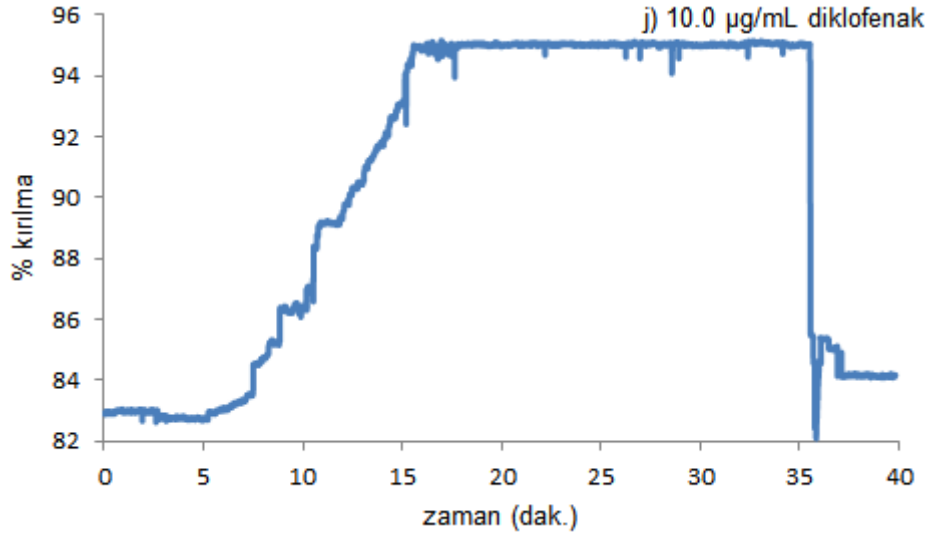
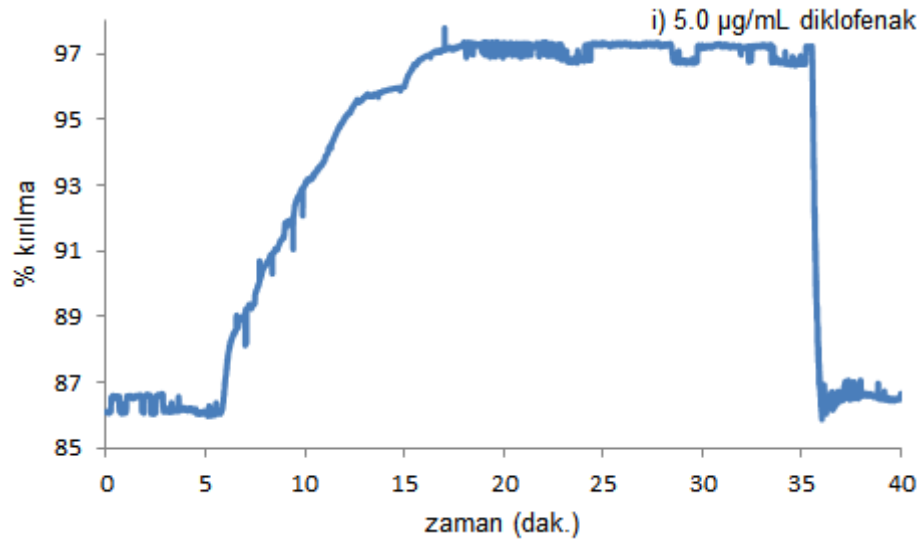
Şekil 4.8. Değişik derişimlerde diklofenak çözeltilerinin SPR sensörlere uygulanması ile elde edilen % kırılmaya karşılık zaman grafikleri: (a) 0.005 µg/mL; (b) 0,01 µg/mL; (c) 0.025 µg/mL; (d) 0.05 µg/mL; (e) 0.1 µg/mL; (f) 0.5 µg/mL; (g) 1.0 µg/mL; (h) 2.0 µg/mL; (ı) 3.0 µg/mL; (i) 5.0 µg/mL (j) 10.0 µg/mL (devamı).



Şekil 4.8. Değişik derişimlerde diklofenak çözeltilerinin SPR sensörlere uygulanması ile elde edilen % kırılmaya karşılık zaman grafikleri: (a) 0.005 µg/mL; (b) 0,01 µg/mL; (c) 0.025 µg/mL; (d) 0.05 µg/mL; (e) 0.1 µg/mL; (f) 0.5 µg/mL; (g) 1.0 µg/mL; (h) 2.0 µg/mL; (ı) 3.0 µg/mL; (i) 5.0 µg/mL (j) 10.0 µg/mL (devamı).

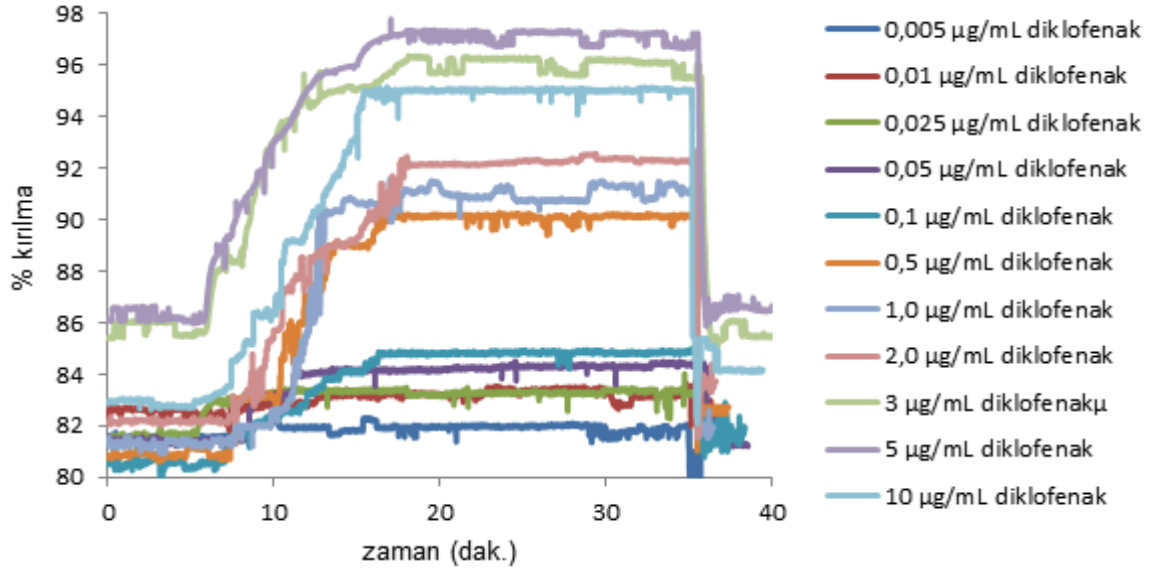


Şekil 4.8. Değişik derişimlerde diklofenak çözeltilerinin SPR sensörlere uygulanması ile elde edilen % kırılmaya karşılık zaman grafikleri: (a) 0.005 µg/mL; (b) 0,01 µg/mL; (c) 0.025 µg/mL; (d) 0.05 µg/mL; (e) 0.1 µg/mL; (f) 0.5 µg/mL; (g) 1.0 µg/mL; (h) 2.0 µg/mL; (i) 3.0 µg/mL; (i) 5.0 µg/mL (j) 10.0 µg/mL (devamı).



Şekil 4.8. Değişik derişimlerde diklofenak çözeltilerinin SPR sensörlere uygulanması ile elde edilen % kırılmaya karşılık zaman grafikleri: (a) 0.005 µg/mL; (b) 0,01 µg/mL; (c) 0.025 µg/mL; (d) 0.05 µg/mL; (e) 0.1 µg/mL; (f) 0.5 µg/mL; (g) 1.0 µg/mL; (h) 2.0 µg/mL; (ı) 3.0 µg/mL; (i) 5.0 µg/mL (j) 10.0 µg/mL (devamı).

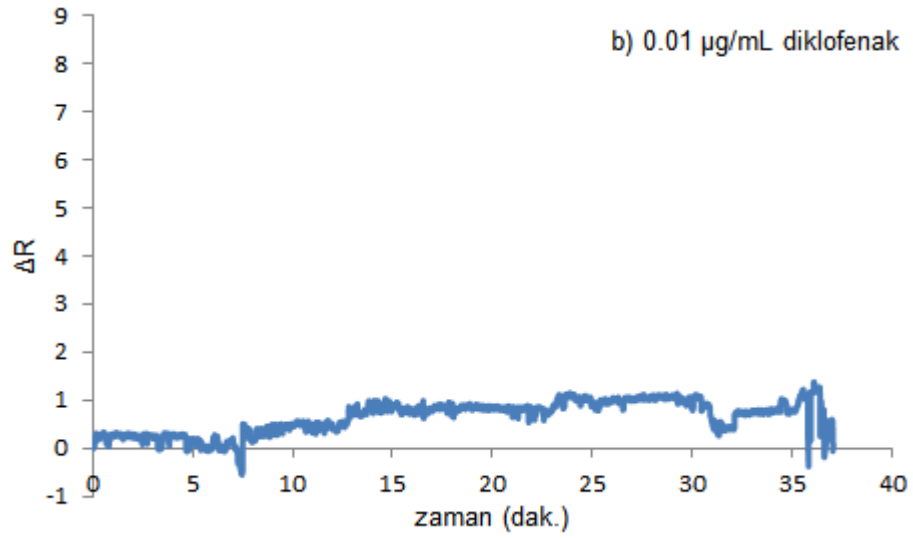
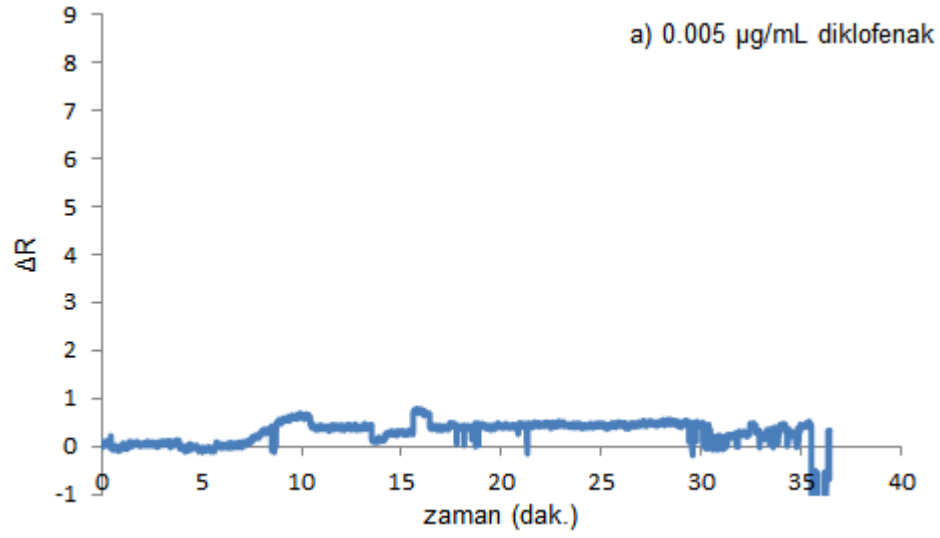
Derişimdeki artışla birlikte % kırılma değerindeki artışın daha fazla olduğu görülmektedir. Bunun sebebi olarak çözelti ile yüzey arasındaki sürücü güç olan derişim farkının artması gösterilebilir.



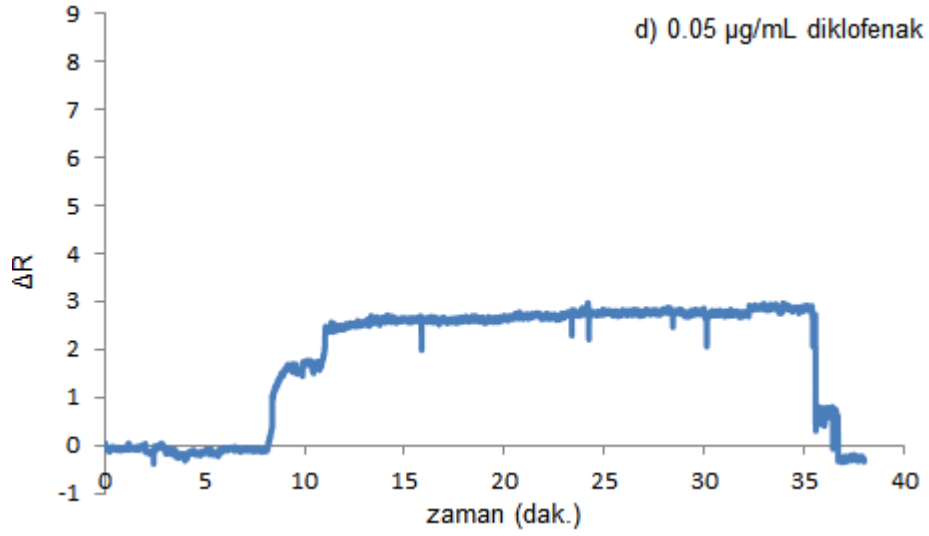
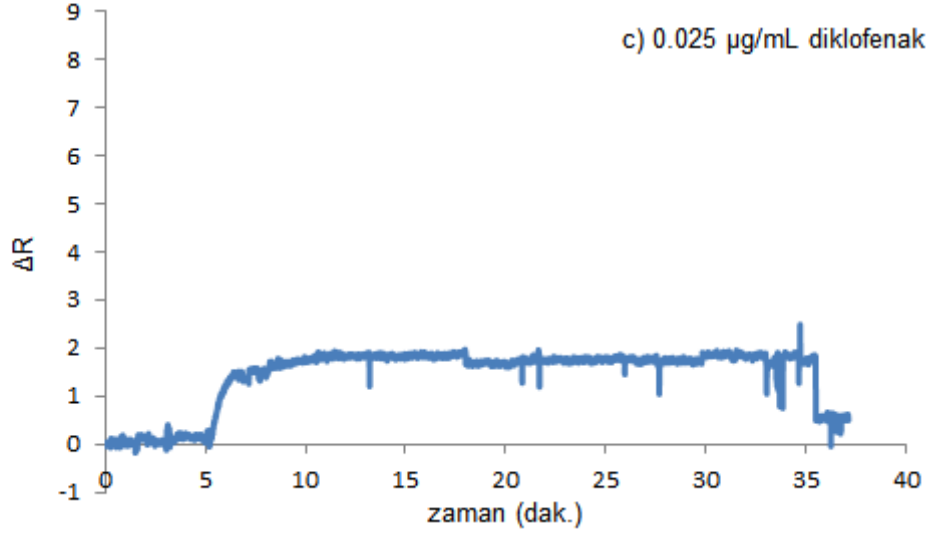
Şekil 4.9. Diklofenak çözeltileri ile SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait % kırılma zaman grafiği.

Şekil 4.10'da farklı derişimlerdeki diklofenak çözeltilerinden elde edilen zamana karşı ΔR derişimlerini gösteren grafikler verilmektedir.

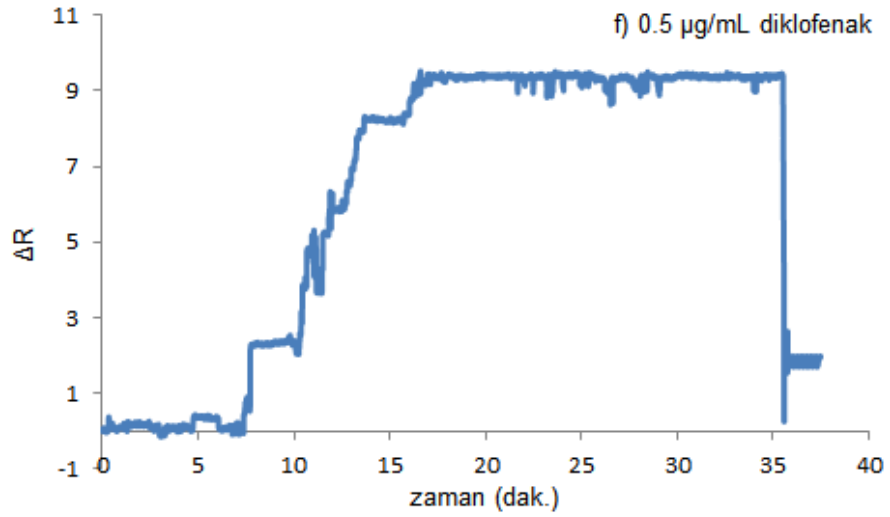
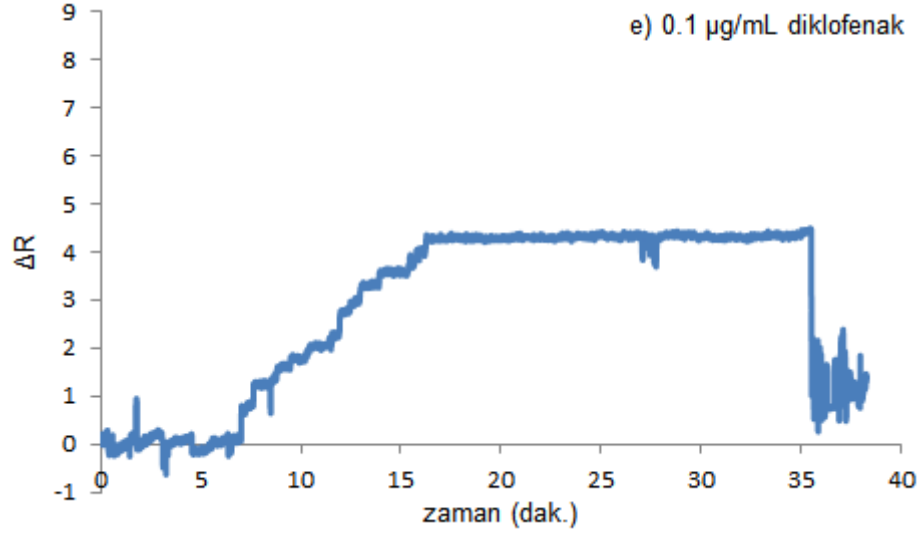
Şekil 4.11'de farklı derişimlerdeki diklofenak çözeltileri ve SPR temelli sensör arasındaki etkileşimlere ait ΔR zaman grafiği verilmiştir.



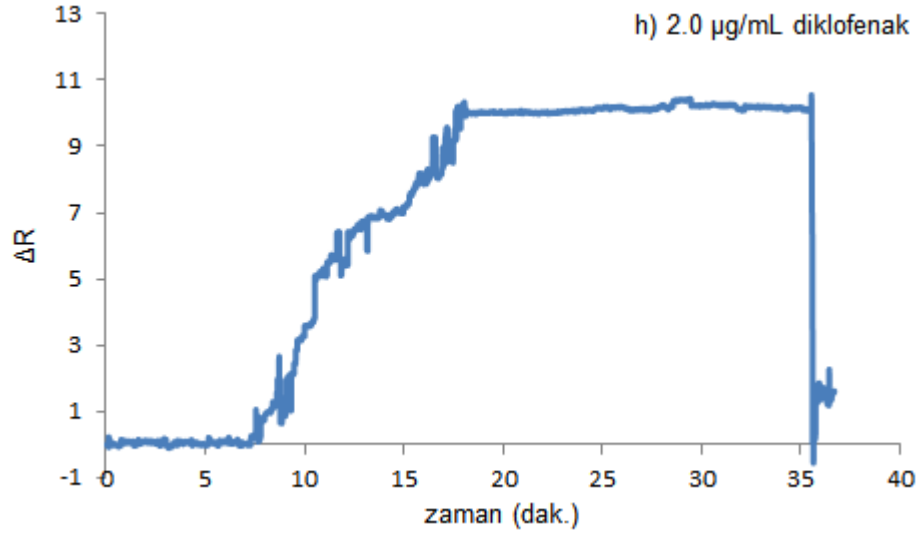
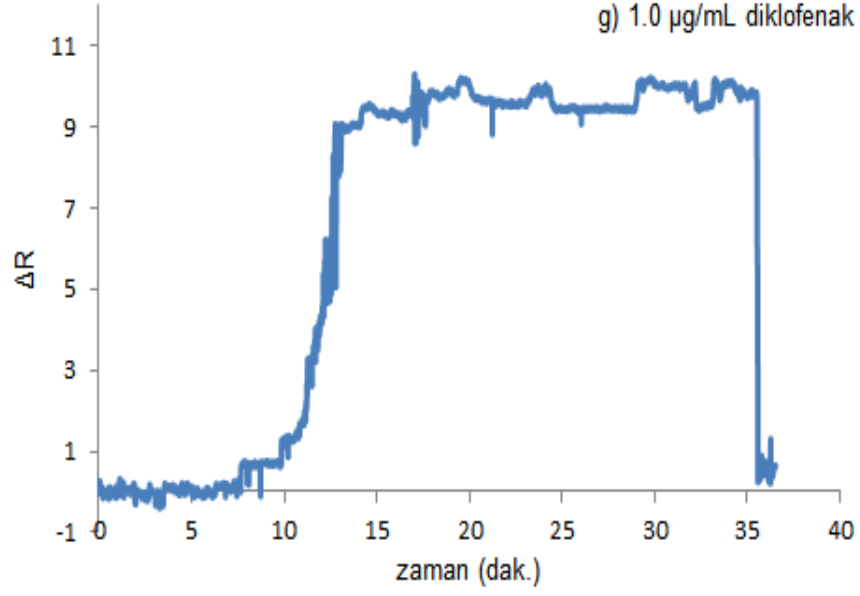
Şekil 4.10. Farklı derişimlerdeki diklofenak çözeltilerinden elde edilen zamana karşı ΔR derişimlerini gösteren grafikler: (a) 0.005 µg/mL; (b) 0,01 µg/mL; (c) 0.025 µg/mL; (d) 0.05 µg/mL; (e) 0.1 µg/mL; (f) 0.5 µg/mL; (g) 1.0 µg/mL; (h) 2.0 µg/mL; (ı) 3.0 µg/mL; (i) 5.0 µg/mL (j) 10.0 µg/mL.



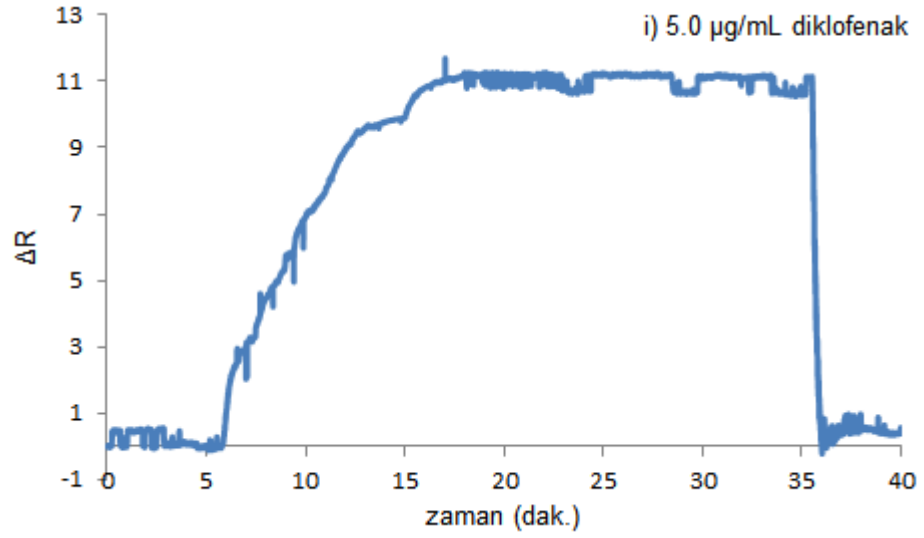
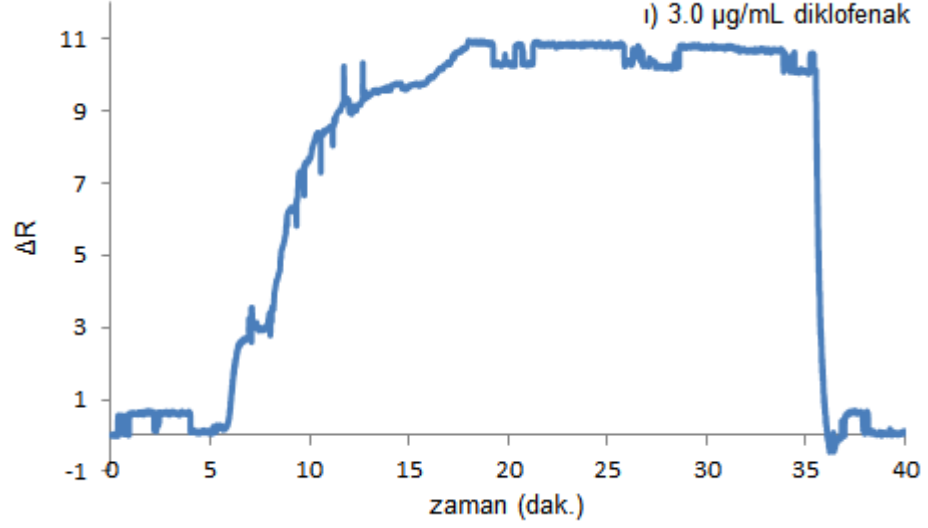
Şekil 4.10. Farklı derişimlerdeki diklofenak çözeltilerinden elde edilen zamana karşı ΔR derişimlerini gösteren grafikler: (a) 0.005 µg/mL; (b) 0,01 µg/mL; (c) 0.025 µg/mL; (d) 0.05 µg/mL; (e) 0.1 µg/mL; (f) 0.5 µg/mL; (g) 1.0 µg/mL; (h) 2.0 µg/mL; (i) 3.0 µg/mL; (i) 5.0 µg/mL (j) 10.0 µg/mL (devamı) .



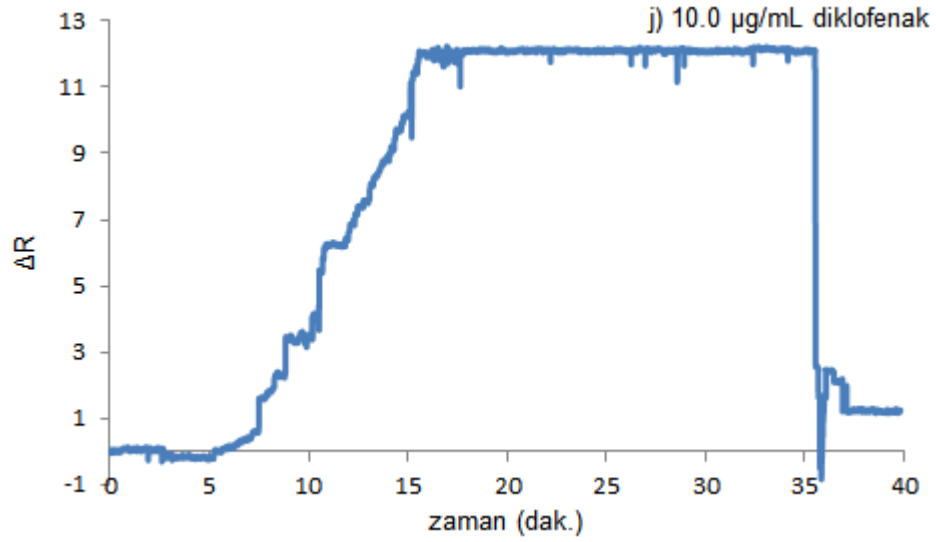
Şekil 4.10. Farklı derişimlerdeki diklofenak çözeltilerinden elde edilen zamana karşı ΔR derişimlerini gösteren grafikler: (a) 0.005 µg/mL; (b) 0,01 µg/mL; (c) 0.025 µg/mL; (d) 0.05 µg/mL; (e) 0.1 µg/mL; (f) 0.5 µg/mL; (g) 1.0 µg/mL; (h) 2.0 µg/mL; (ı) 3.0 µg/mL; (i) 5.0 µg/mL (j) 10.0 µg/mL (devamı).



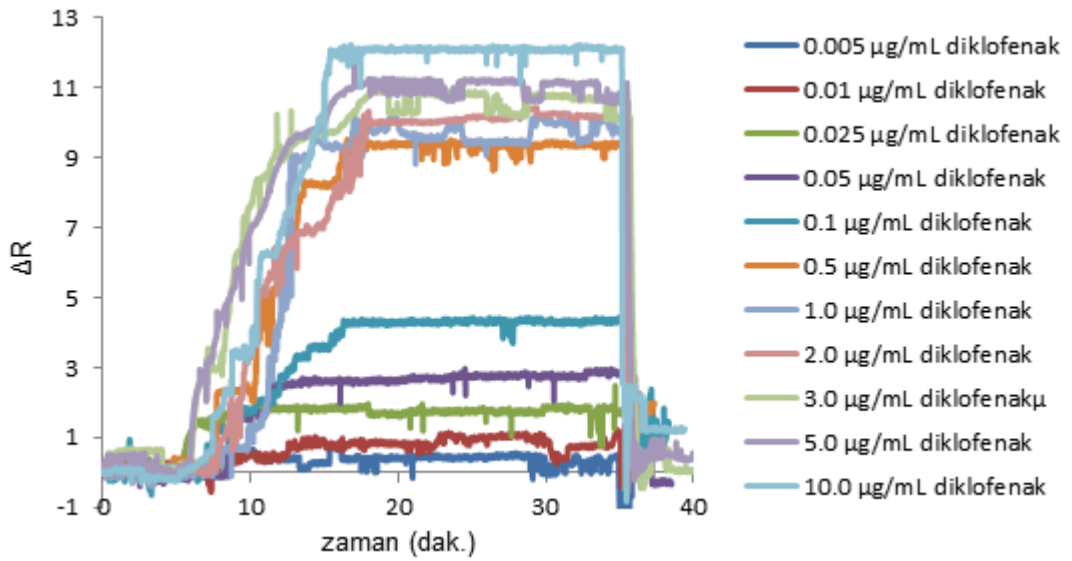
Şekil 4.10. Farklı derişimlerdeki diklofenak çözeltilerinden elde edilen zamana karşı ΔR derişimlerini gösteren grafikler: (a) 0.005 µg/mL; (b) 0,01 µg/mL; (c) 0.025 µg/mL; (d) 0.05 µg/mL; (e) 0.1 µg/mL; (f) 0.5 µg/mL; (g) 1.0 µg/mL; (h) 2.0 µg/mL; (i) 3.0 µg/mL; (i) 5.0 µg/mL (j) 10.0 µg/mL(devamı).



Şekil 4.10. Farklı derişimlerdeki diklofenak çözeltilerinden elde edilen zamana karşı ΔR derişimlerini gösteren grafikler: (a) 0.005 µg/mL; (b) 0,01 µg/mL; (c) 0.025 µg/mL; (d) 0.05 µg/mL; (e) 0.1 µg/mL; (f) 0.5 µg/mL; (g) 1.0 µg/mL; (h) 2.0 µg/mL; (i) 3.0 µg/mL; (j) 5.0 µg/mL (j) 10.0 µg/mL (devamı).



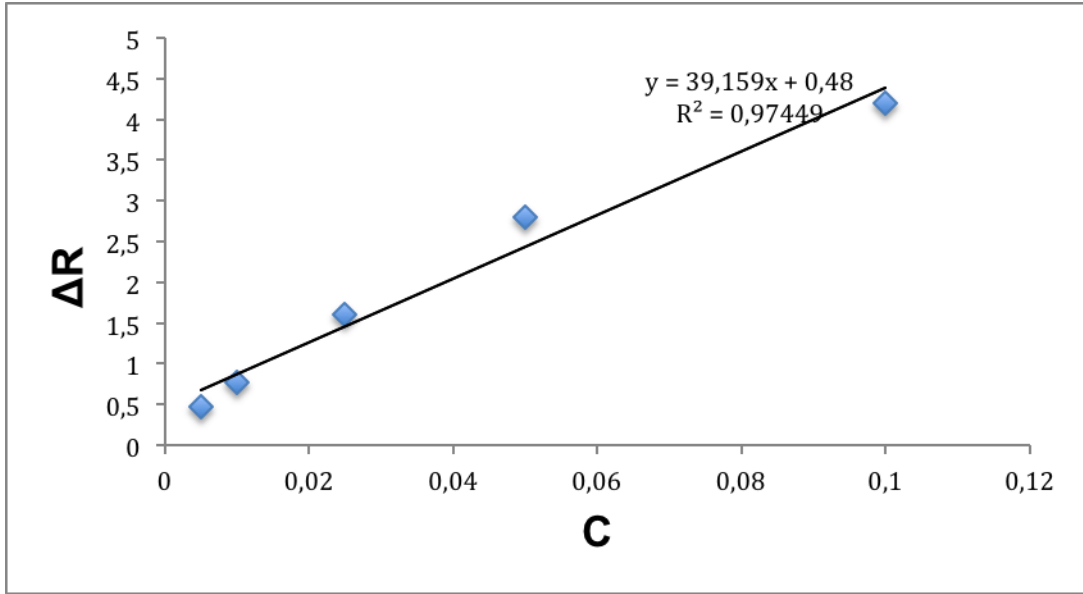
Şekil 4.10. Farklı derişimlerdeki diklofenak çözeltilerinden elde edilen zamana karşı ΔR derişimlerini gösteren grafikler: (a) 0.005 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (b) 0,01 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (c) 0.025 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (d) 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (e) 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (f) 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (g) 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (h) 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (ı) 3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (i) 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (j) 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (devamı).



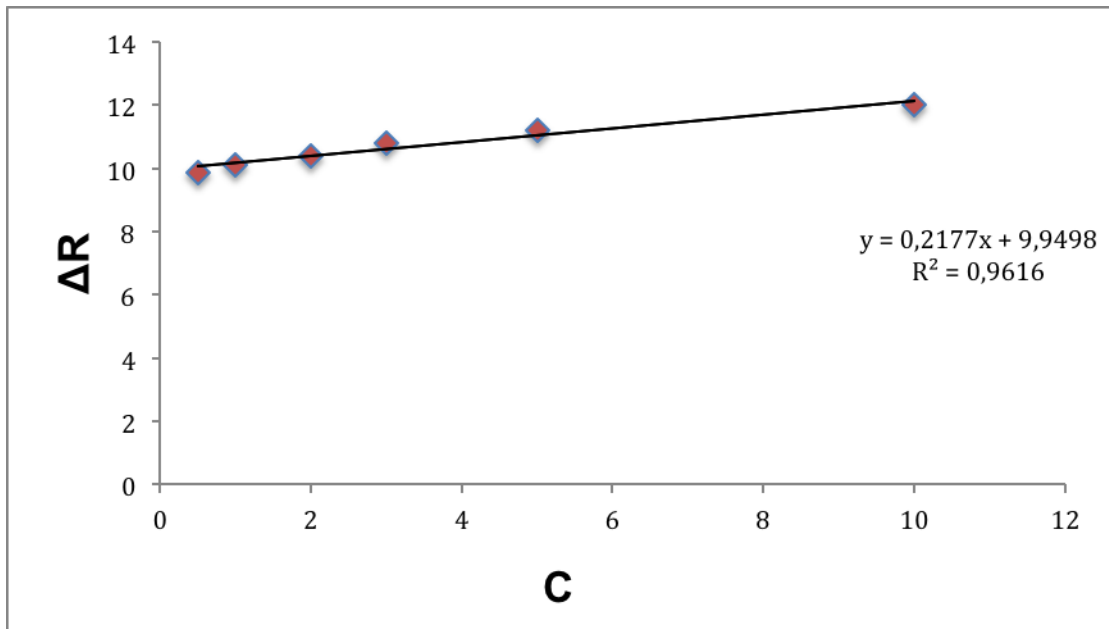
Şekil 4.11. Farklı derişimlerdeki diklofenak çözeltileri ve SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait ΔR zaman grafiği.

Şekil 4.12'de görüldüğü gibi SPR sensör iki farklı derişim aralığında derişim-sinyal doğrusallığı göstermektedir. 0,005 $\mu\text{g}/\text{ml}$ – 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ derişim aralığında alınan veriler değerlendirildiğinde elde edilen doğrunun denklemi $y=39.159x+0.48$ ve doğrusallığı (R^2) 0,9745; 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ – 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ derişim aralığında alınan veriler

değerlendirildiğinde elde edilen doğrunun denklemi $y=0.2467x+9.7461$ ve doğrusallığı (R^2) 0.8921 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen bu verilerle SPR sensör, 0,005 $\mu\text{g/mL}$ – 0,1 $\mu\text{g/mL}$ aralığında %97, 0,5 $\mu\text{g/mL}$ – 10 $\mu\text{g/mL}$ aralığında %96 doğrulukta ölçüm yapmaktadır.



(a)



(b)

Şekil 4.12. Diklofenak baskılanmış SPR nanosensör ve ΔR arasındaki ilişki (a) 0,005 $\mu\text{g/mL}$ – 0,1 $\mu\text{g/mL}$ aralığında (b) 0,5 $\mu\text{g/mL}$ – 10 $\mu\text{g/mL}$.

-Denge Analizi

Toplam ligand miktarı ($[B]_0$), yüzeyin maksimum analit bağlama kapasitesi olarak tanımlanırsa; diğer tüm derişim değerleri SPR sinyali olarak ifade edilebilir. Böylelikle kütlenin derişime dönüştürülme işleminin yapılmasına gerek kalmayacaktır. Serbest analit derişiminin akış hücresinde sabit kaldığı yalancı-birinci derece koşulları altında bağlanma şu şekilde ifade edilir:

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

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

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

Bundan dolayı, bağlanma sabiti K_A , $\Delta R_{denge}/C$ 'ye karşı ΔR_{denge} grafiğinden hesaplanır. Ayrılma sabiti K_D ise; $1/K_A$ eşitliği ile hesaplanabilir.

-Bağlanma Kinetik Analizi

Eşitlik 4.1 tekrar düzenlendiğinde;

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

eşitliği elde edilir. Buradan, etkileşim kontrollü kinetikler için çizilen $d\Delta R/dt$ 'ye karşı ΔR grafiğinin, eğimi $-(k_a C + k_d)$ olan bir doğru verdiği görülmektedir. Başlangıç bağlanma hızı analit derişimiyle doğrusal bir ilişki içerisindedir ve kantitatif olarak derişim belirlenmesinde kullanılır. Eğer R_{maks} değeri biliniyorsa, tek bir sensorgram kullanılarak k_a ve k_d değerleri hesaplanabilir. Yüzeyi tamamen doygunluğa erіştirmek için çok yüksek analit derişimleri gerekli olduğu için R_{maks} 'ın deneysel olarak belirlenmesi zordur. Tercih edilen yaklaşım, birçok farklı analit derişimlerinde

bağlanma sensorgramlarının alınmasıdır. İleri ve geri yöndeki hızların analizi için çizilen $d\Delta R/dt$ 'ye karşı ΔR grafikleri, ileri ve geri yöndeki hız sabitleri ile ilişkili bir eğim değeri (S) vermektedir:

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

S'ye karşı C grafiği, eğimi k_a olan bir doğru vermektedir. Teorik olarak kesim noktası k_d değerini vermektedir. Fakat, $k_a C \gg k_d$ olduğu durumlarda k_d 'nin hesaplanması için bu yöntem çok güvenilir değildir. Daha güvenilir yöntem, ayrışma kinetiğinin incelenmesidir.

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

Burada; ΔR_0 ve ΔR_t , ayrılma eğrisindeki t_0 ve t anlarındaki SPR sinyal değerleridir [70]. Şekil 4.13'de denge analizi ve bağlanma kinetik analizi için çizilen doğrular verilmiştir. Bu doğrulara ait denklemlerden hesaplanan ΔR_{maks} , k_a , k_d , K_A ve K_D değerleri Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Kinetik hız sabitleri.

Denge Analizi (Scatchard)		Bağlanma Kinetik Analizi	
ΔR_{maks}	11.46	k_a , $\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{s}$	0.6481
K_A , $\mu\text{g}/\text{mL}$	7.124	k_d , 1/s	0.091
K_D , $\text{mL}/\mu\text{g}$	0.140	K_A , $\mu\text{g}/\text{mL}$	7.14
R^2	0.96	K_D , $\text{mL}/\mu\text{g}$	0.14
		R^2	0.9802

4.4. Denge İzoterm Modelleri

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

Scatchard

$$\Delta R_{\text{denge}} / [C] = K_A (\Delta R_{\text{maks}} - \Delta R_{\text{denge}})$$

Langmuir

$$\Delta R = \{ \Delta R_{\text{maks}} [C] / K_D + [C] \}$$

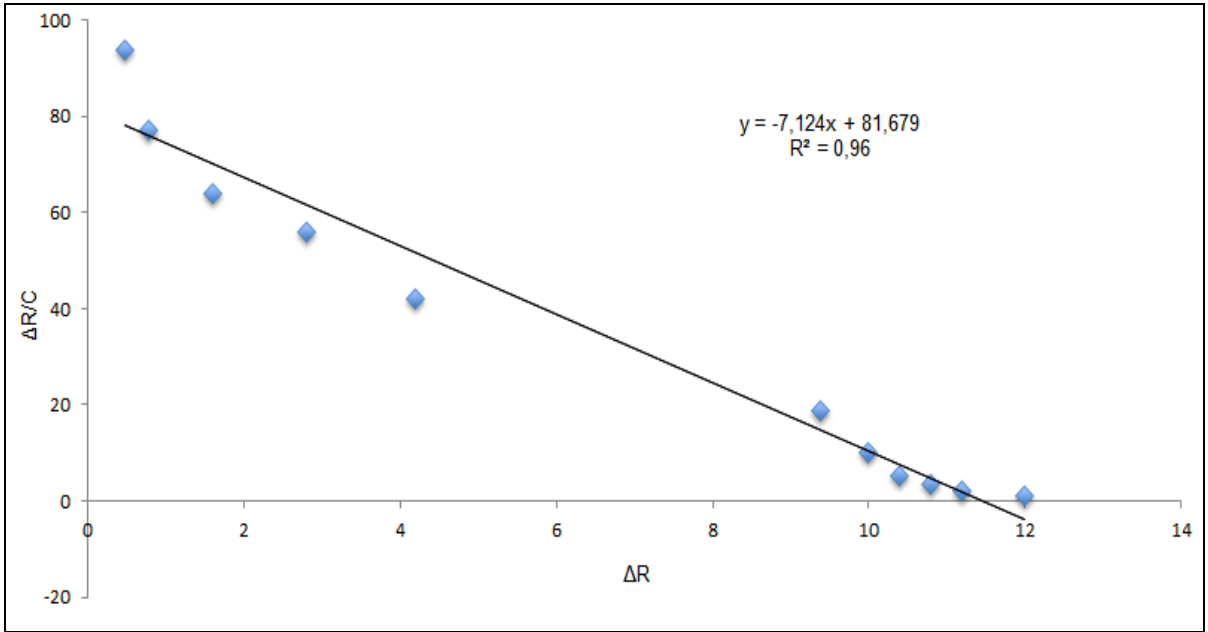
Freundlich

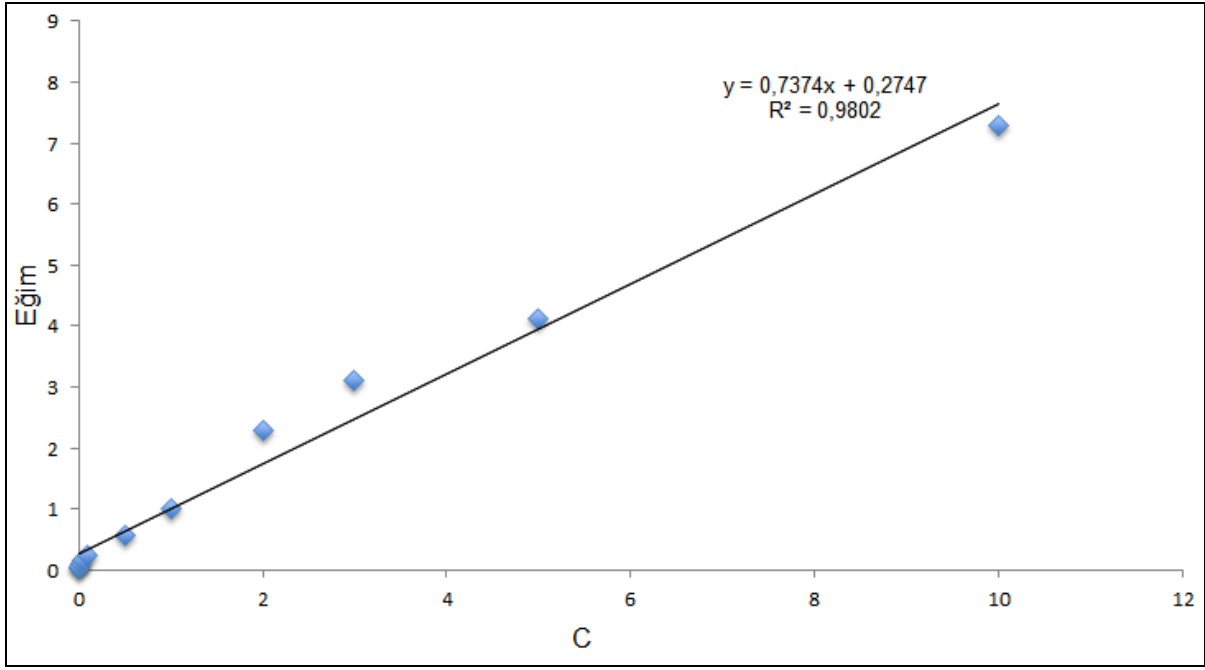
$$\Delta R = \Delta R_{\text{maks}} [C]^{1/n}$$

Langmuir-Freundlich

$$\Delta R = \{ \Delta R_{\text{maks}} [C]^{1/n} / K_D + [C]^{1/n} \}$$

Burada; ΔR_{maks} , maksimum SPR sinyal kayması; ΔR_{denge} , denge halindeki SPR sinyal kayması; $[C]$, analit derişimi ($\mu\text{g/ml}$); K_A ($\mu\text{g/ml}$), bağlanma denge sabiti; K_D ($\text{ml}/\mu\text{g}$), ayrışma denge sabiti; $1/n$, Freundlich yüzey heterojenite indeksidir.





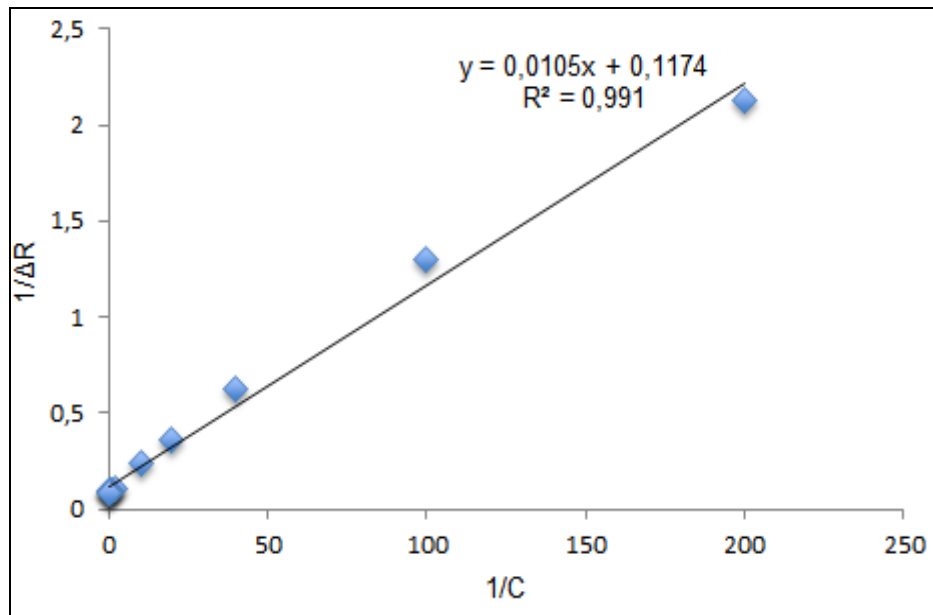
(b)

Şekil 4.13. Kinetik hız sabitlerinin belirlenmesi. (a) Denge analiz yaklaşımı (Scatchard); (b) Bağlanma kinetik yaklaşımı.

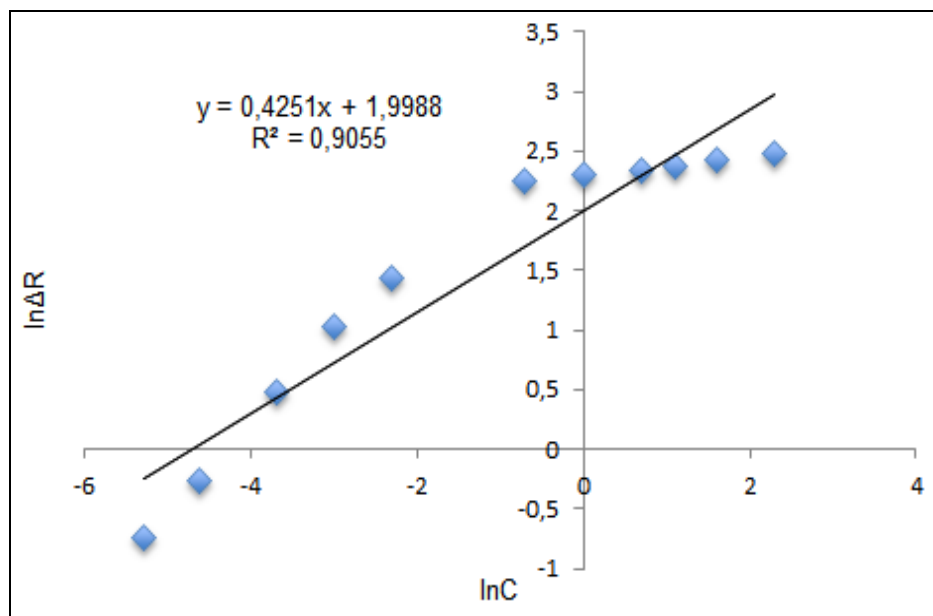
Şekil 4.14'te göre deneysel olarak elde edilen veriler diklofenak tayinine en uygun model Langmuir modelidir ($R^2 = 0.991$). Bu sonuç, hazırlanan sensör yüzeyindeki diklofenak bağlanma özelliklerinin homojen dağılımlı, tek tabakalı, eş enerjili ve minimum yanıl etkileşimli olduğunu göstermektedir. Her üç izoterm modelinden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3'de verilmiştir.

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

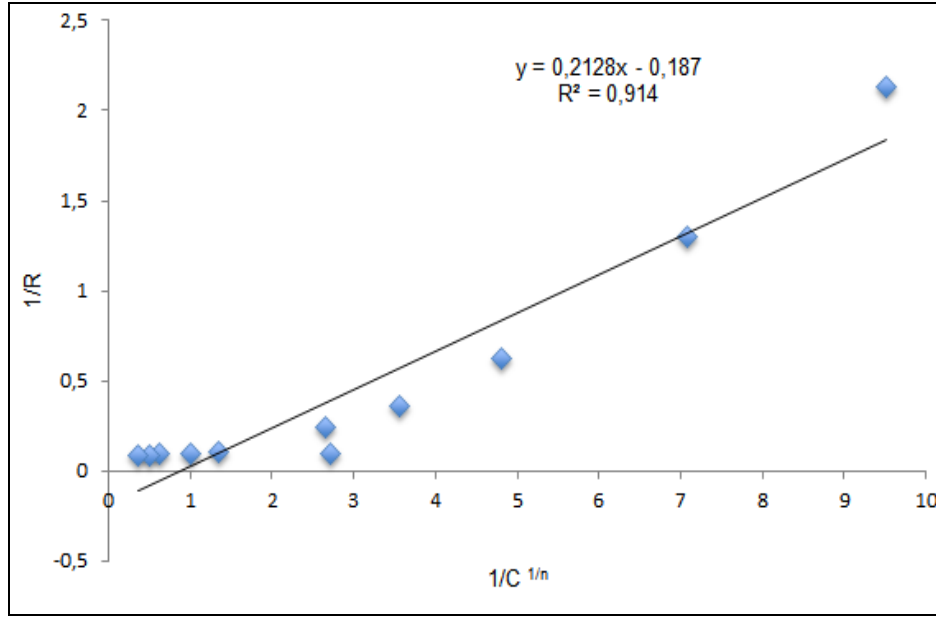
Langmuir		Freundlich		Langmuir-Freundlich	
ΔR_{maks} , $\mu\text{g/mL}$	8.52	ΔR_{maks} , $\mu\text{g/mL}$	7.38	ΔR_{maks} , $\mu\text{g/mL}$	5.347
K_D , $\text{mL}/\mu\text{g}$	0.089	$1/n$	0.4251	$1/n$	0.288
K_A , $\mu\text{g/mL}$	11.24	R^2	0.9055	K_D , $\text{mL}/\mu\text{g}$	1.138
R^2	0.991			K_A , $\mu\text{g/mL}$	0.88
				R^2	0.9141



(a)



(b)



(c)

Şekil 4.14. Adsorpsiyon modelleri. (a) Langmuir; (b) Freundlich; (c) Langmuir-Freundlich.

4.5. Yarışmalı kinetik analizler

Hazırlanan diklofenak baskılanmış sensörün diklofenağa karşı seçiciliğinin belirlenmesi için yarışmalı adsorpsiyon çalışmaları diklofenak ve karbamazepin biyomoleküllerinin kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir.

Karbamazepin için diklofenak molekülerine göre dağılma ve seçicilik katsayıları aşağıdaki eşitliğe göre belirlenmiştir:

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

Eşitlikte K_d , dağılma katsayısını (ml/g); C_i ve C_f , biyomoleküllerin başlangıç ve sonuç derişimlerini ($\mu\text{g/mL}$); V , kullanılan çözelti hacmini (mL) ve m , polimerin kütlesini (g) ifade etmektedir. SPR sensör uygulamalarında, derişim ve kütle parametrelerinin dönüştürülmesi gerçekleştirilmektedir [70]. Bu yaklaşımdaki temel sebepler; başlangıç ve son derişimleri arasında önemli bir fark gözlenememesi; polimerin kütlesinin kesin olarak belirlenememesi ve derişimin ΔR ile doğrusal ilişkide olmasıdır.

Bu durumda seçicilik katsayısı,

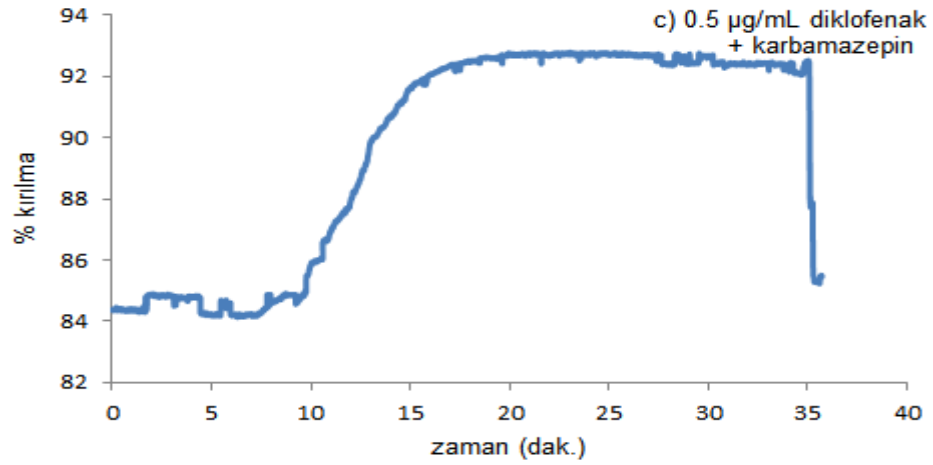
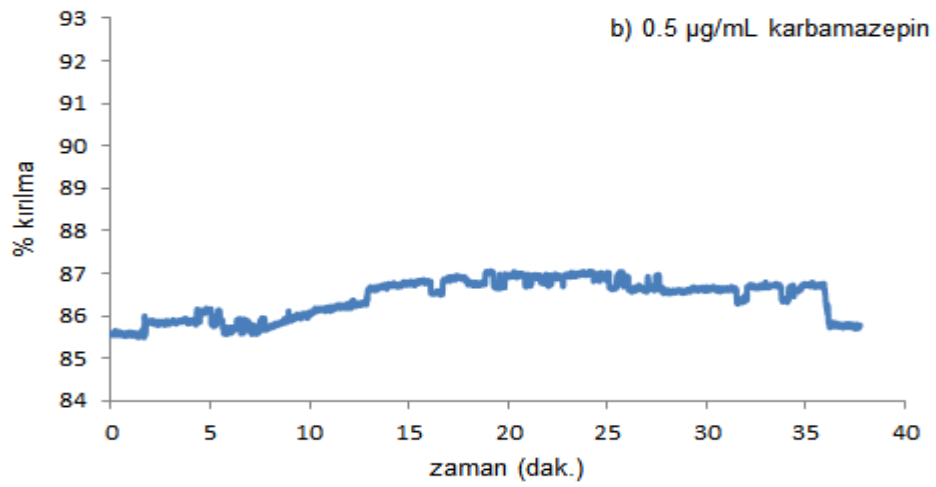
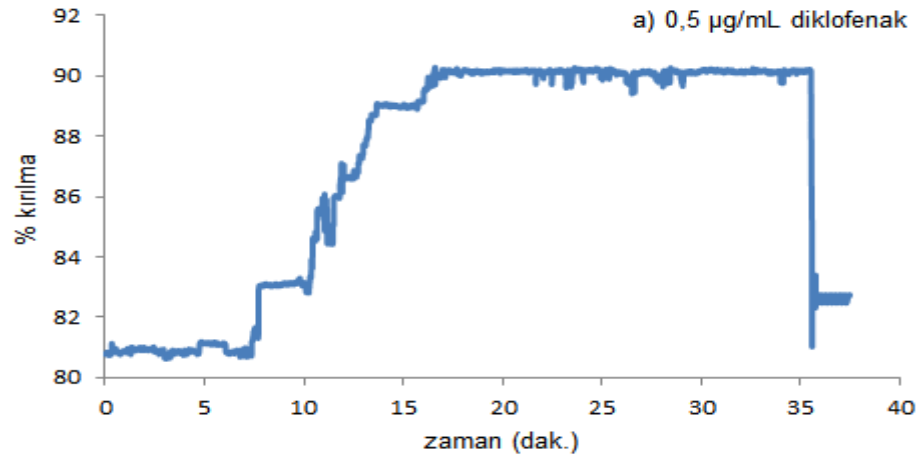
$$k = \Delta R_{\text{kalıp}} / \Delta R_{\text{girişimci}} \quad (4.7)$$

şeklinde kullanılabilir. Baskılama seçiciliğinin belirlenmesi ise;

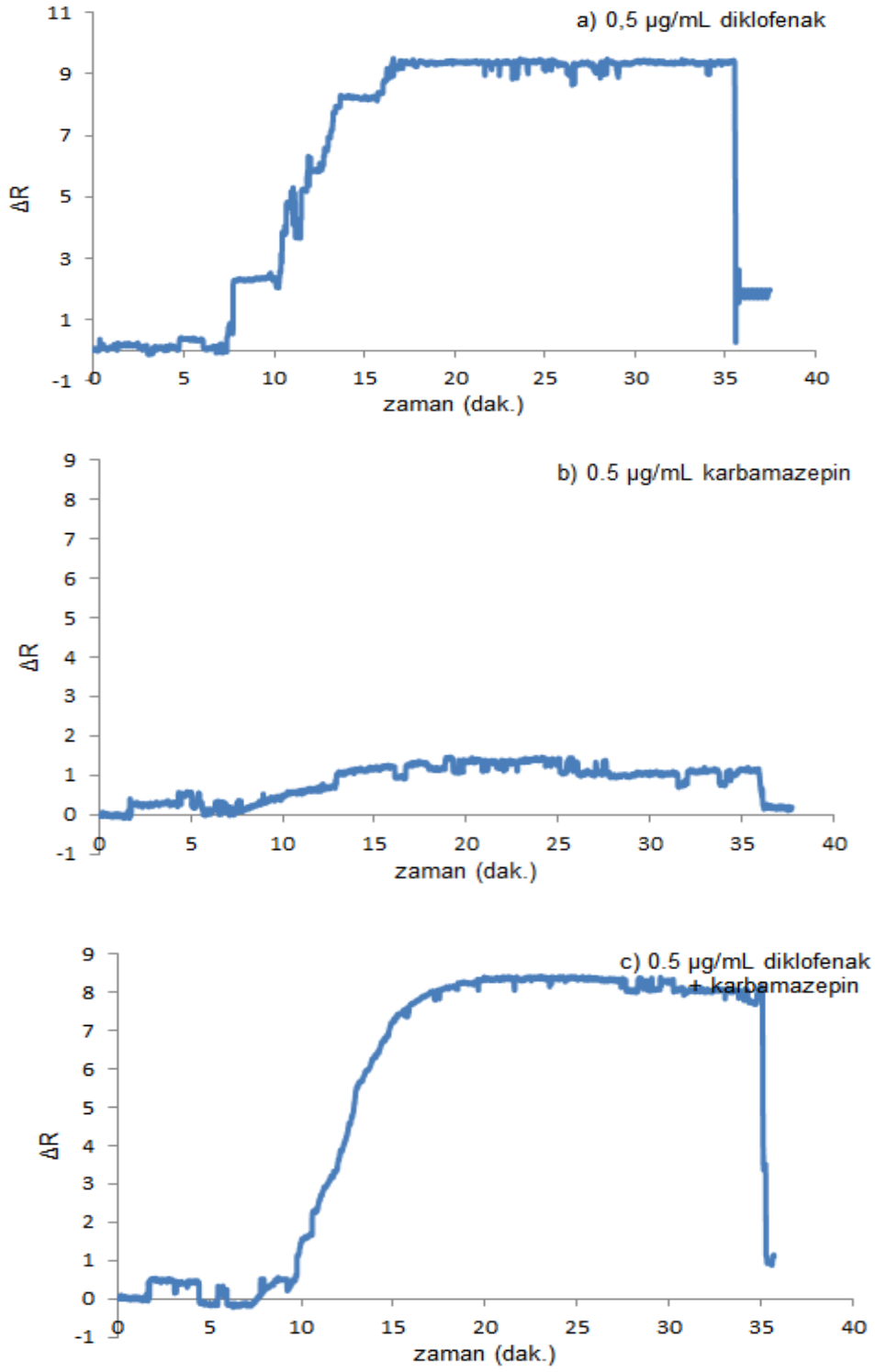
$$k' = k_{\text{baskılanmış}} / k_{\text{kontrol}} \quad (4.8)$$

şeklinde ifade edilebilir.

Şekil 4.14 ve 4.15 ((a) 0,5 µg/mL diklofenak; (b) 0,5 µg/mL karbamazepin; (c) 0,5 µg/mL diklofenak- karbamazepin) incelendiğinde; diklofenak baskılanmış SPR nanosensörün karbamazepin molekülleriyle spesifik bir etkileşime girmediği ve sinyal vermediği belirlenmiştir. Bu durum diklofenak baskılanmış çipin, diklofenak molekülüne seçici olduğunu göstermektedir. İkili karışım dikkate alındığında, diklofenak karışımlarının gösterdiği ΔR kayma değerleri, tekli çözeltilere göre daha düşüktür. Bu durum, moleküllerin karışım halinde bir yarışmacı ajan olarak davrandığı ve ΔR kayma değerinde azalmaya sebep olduğunu göstermektedir.



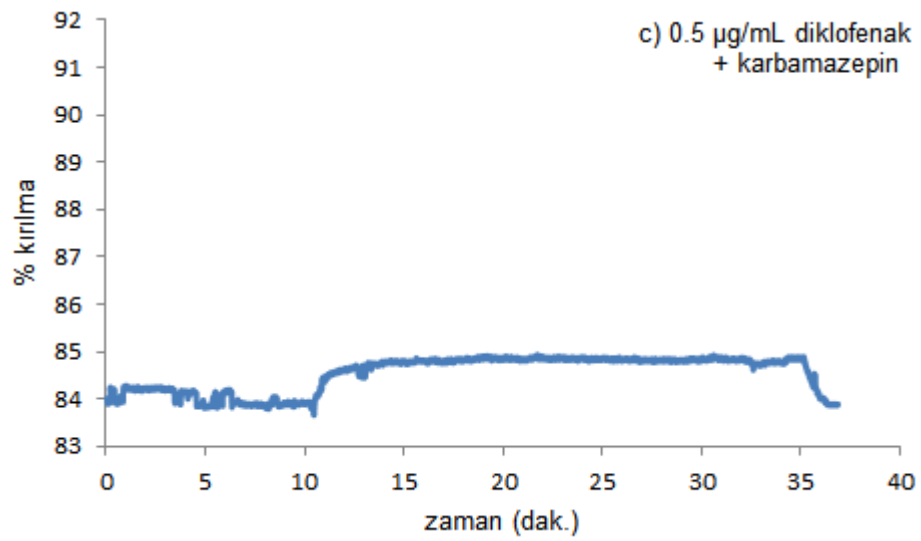
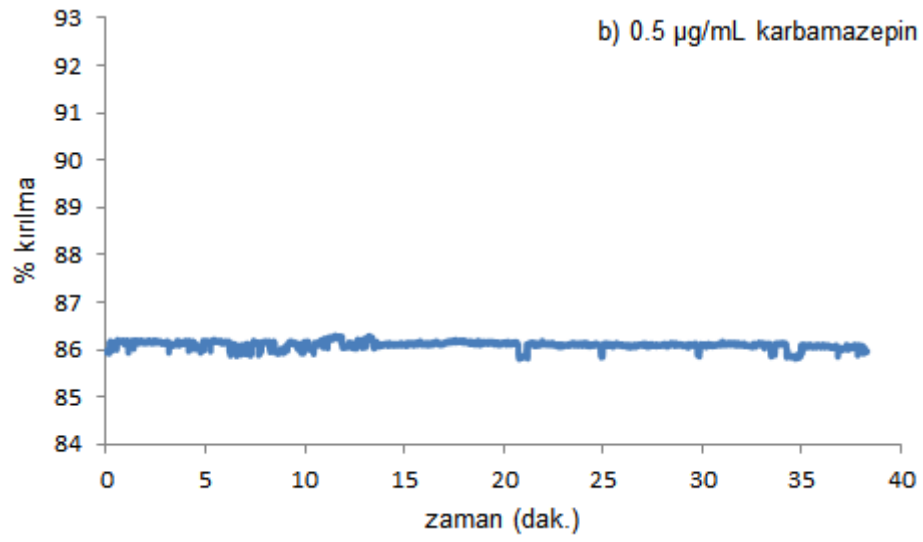
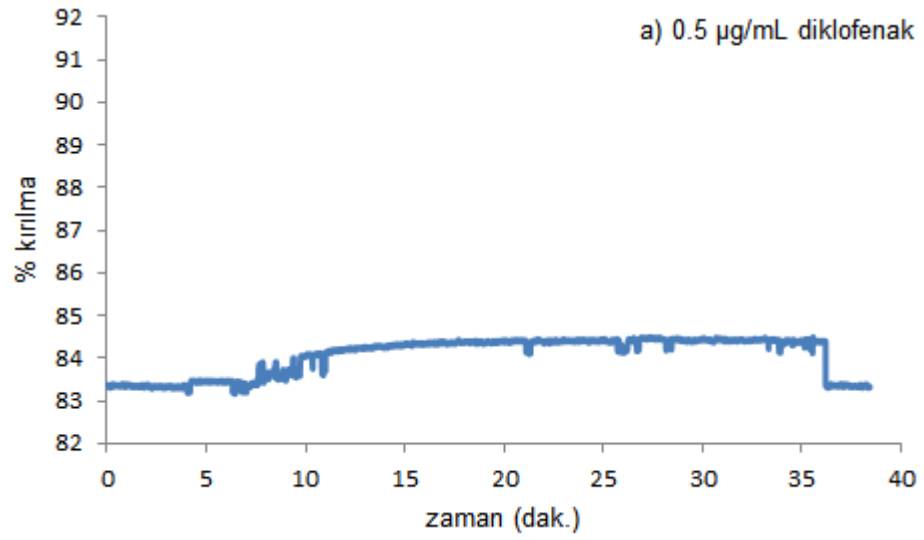
Şekil 4.15. Diklofenak ve karbamazepin tekli ve ikili çözeltileri ile SPR sensör arasındaki % kırılma-zaman grafikleri.



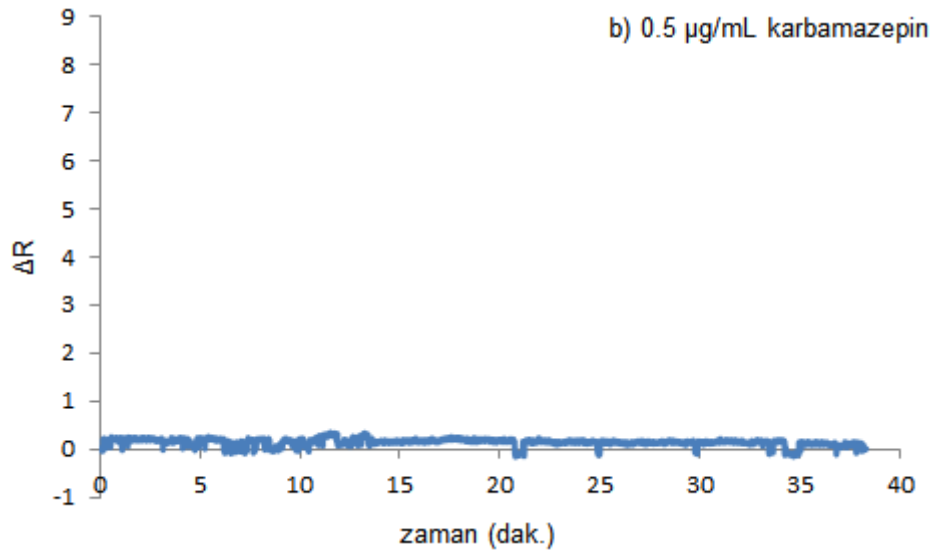
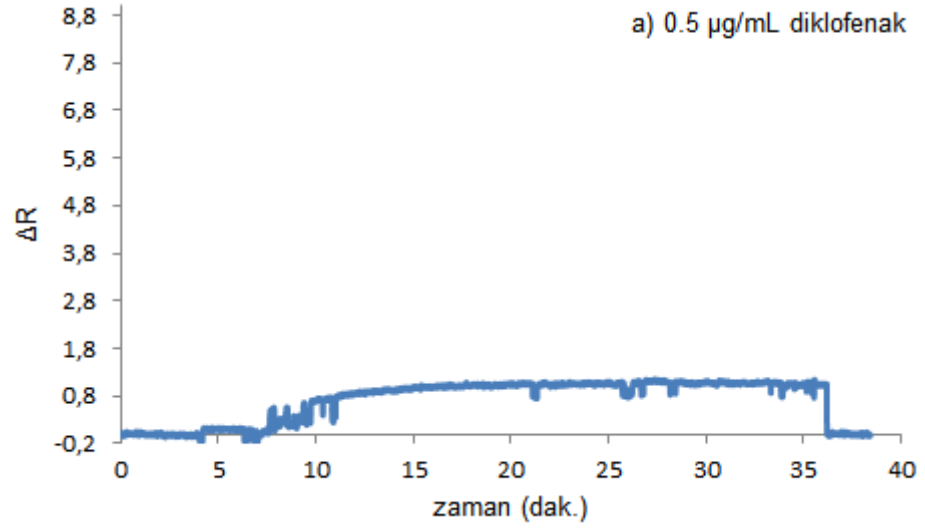
Şekil 4.16. Diklofenak ve karbamazepin tekli ve ikili çözeltileri ile SPR sensör arasındaki ΔR -zaman grafikleri.

4.6. Diklofenak baskılanmış sensörün baskılama seçiciliğinin belirlenmesi

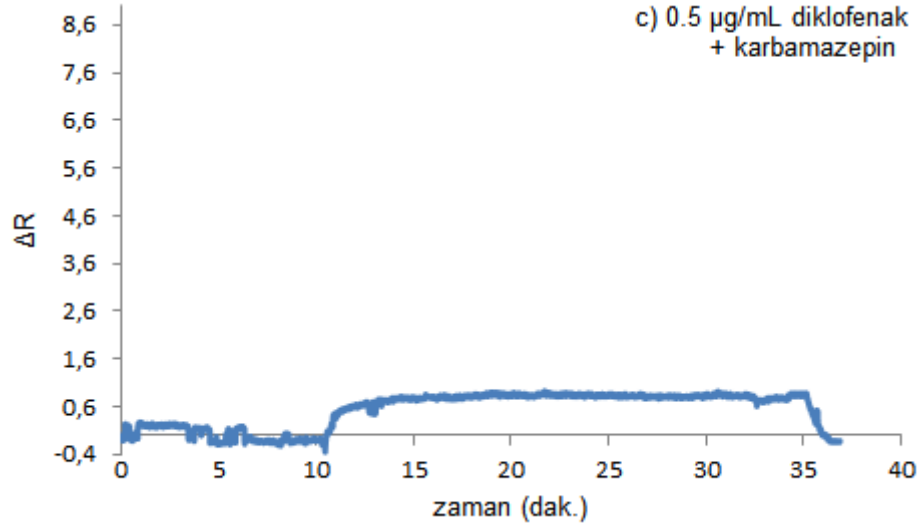
Diklofenak baskılanmış sensörün baskılama seçiciliğini göstermek için diklofenak baskılanmamış SPR çip hazırlanmıştır. Diklofenak ve karbamazepin biyomoleküllerinin kullanılmasıyla oluşturulan karışımlar SPR sistemine verilmiştir. Bu çözeltiler metanol-su çözeltisiyle 0.5 µg/mL derişimde hazırlanmışlardır. Şekil 4.16'da % kırılma/zaman, Şekil 4.17'da $\Delta R/zaman$ grafikleri verilmiştir. Şekil 4.17 incelendiğinde; diklofenak baskılanmamış SPR nanosensörün karbamazepin ile herhangi bir etkileşime girmediği ve sinyal vermediği gözlenmiştir. Tekli ve ikili karışımlarda; diklofenak baskılanmış SPR sensörlere benzer sonuçlar elde edildiği ve karışımların sinyal değerlerinde antagonistik bir etki olduğu görülmektedir. Diklofenak, karbamazepin bulunduğu ortamda daha az ΔR değeri vermesinin sebebi; bu moleküllerin yarışmacı ajan olarak davranıp diklofenanın bağlandığı bölgelere bağlanmak istemesidir. Diğer bir muhtemel sebepte ikili karışımın bulunduğu ortamdaki sterik engellerin oldukça fazla olması ve diklofenak moleküllerinin bağlanması gereken boşluklara ulaşamamasıdır. Diklofenak baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensörler karşılaştırıldığında; Diklofenak sinyalinin 9.38'den 1.03'e düştüğü görülmektedir (Çizelge 4.4). Eşitlik 4.7 ve 4.8 kullanılarak hesaplanan seçicilik katsayıları, karbamazepin için 8.4 (baskılanmış), 7.92 (baskılanmamış) olarak bulunmuştur. Bağlı seçicilik değeri, 1'in ne kadar üzerindeyse baskılama işleminin o kadar etkin olduğu bilinmektedir.



Şekil 4.17. Diklofenak ve karbamazepin çözeltileri ile diklofenak baskılanmamış SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait kırılma-zaman grafikleri .



Şekil 4.18. Diklofenak ve karbamazepin çözeltileri ile diklofenak baskılanmamış SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait ΔR -zaman grafikleri .



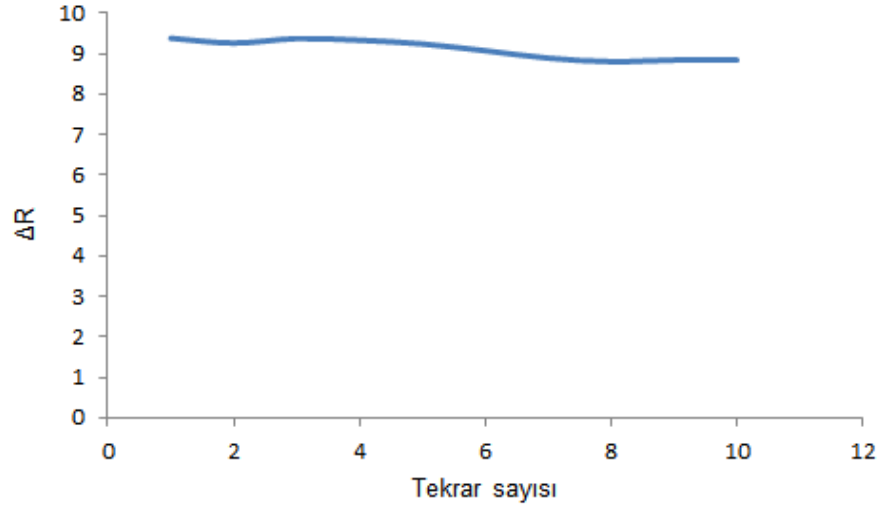
Şekil 4.18. Diklofenak ve karbamapazın çözeltileri ile diklofenak baskılanmamış SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait ΔR -zaman grafikleri (devamı).

Çizelge 4.4. Diklofenağa göre karbamazepin için seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları.

Biyomolekül	MIP		NIP		
	ΔR	k	ΔR	k	k'
Diklofenak	9.38	-	1.03	-	-
Karbamazepin	1.12	8.4	0.13	7.92	1.06

4.7. Diklofenak baskılanmış SPR sensörün tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi

Diklofenak baskılanmış SPR sensörün tekrar kullanılabilirliğini incelemek amacıyla 0.5 µg/ml derişimlerde diklofenak içeren çözeltiler SPR sistemine tekrarlı (10 kez) bir şekilde enjekte edilmiş ve sonuçlar şekil 4.18'de verilmiştir.



Şekil 4.19. Diklofenak baskılanmış SPR sensörün tekrar kullanılabilirliği.

5.YORUM

- Diklofenak-metakrilik asit ön kompleksini hazırlamak için kalıp molekül olarak diklofenak fonksiyonel monomer olarak metakrilik asit kullanılmıştır. Diklofenak-metakrilik asit kompleksini oluşturan kalıp molekül olarak kullanılan diklofenak fonksiyonel monomer olarak kullanılan metakrilik asitin stokiometrik olarak birleşme oranlarını tayin etmek için diklofenak-metakrilik asit (1:7; 1:8; 1:9; 1:10; 1:11) kompleksleri hazırlanmıştır. Elde edilen absorbanlardan, absorbanın artan metakrilik asit oranı ile arttığı, 1:11 diklofenak-metakrilik asit oranında değişiklik göstermediği tespit edilerek kalıp molekül:monomer oranı 1:11 olarak bulunmuştur.
- SPR sensörlerin yüzey karakterizasyonu FTIR-ATR spektrofotometresiyle yapılmıştır. 1731 cm^{-1} 'deki band metakrilik asit monomerindeki C=O bandından kaynaklanmaktadır. 3423 cm^{-1} 'deki band -COOH gruplarıyla ilişkili bazı su moleküllerinden kaynaklanmaktadır. 1272 cm^{-1} 'deki bant asit dimerlerinden gelen banttir. Monomer yapısına ait titreşim, gerilme ve eğilme bandları, metakrilik asit monomerinin sentezinin gerçekleştiğini göstermektedir.
- Boş SPR çip, diklofenak baskılanmış ve baskılanmamış SPR çiplerin temas açısı ölçümlerinden görüldüğü üzere; boş SPR çipin yüzey temas açısı değeri 81.4° iken, diklofenak baskılanmış SPR çipin temas açısı değeri 76.8°'ye, diklofenak baskılanmamış SPR çipin temas açısı değeri de 75.4°'ye düşmüştür. Temas açısında meydana gelen düşüşün nedeni şu şekilde açıklanabilir: Metakrilik asit hidrofilik karakterde bir malzeme olduğundan dolayı, yüzeyde hidrofilik bir polimerin bulunması yüzey hidrofilitesini arttırmış ve temas açısı değerini düşürmüştür.
- Diklofenak baskılanmış SPR sensörün ortalama yüzey kalınlığı elipsometre ile elde edilmiştir. Diklofenak baskılanmış SPR sensörlerin yüzey kalınlığı 20.60 nm, Diklofenak baskılanmamış SPR çipin yüzey kalınlığı 7.30 nm olarak tespit edilmiştir.
- Diklofenak baskılanmış SPR sensörün yüzey morfolojisi yarı temas modunda atomik kuvvet mikroskobu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Diklofenak baskılanmış SPR

sensörün ortalama yüzey pürüzlülüğü 8.16 nm, Diklofenak baskılanmamış SPR çipin ortalama yüzey pürüzlülüğü 1.51 nm olarak tespit edilmiştir.

- Diklofenak baskılanmış SPR sensör artan derişimlerde hazırlanmış diklofenak çözeltileriyle etkileştirilmiştir. Artan derişimlerle birlikte ΔR değerlerinde de bir artış görülmüştür. Bunun nedeni; sensör yüzeyi ile çözeltiler arasındaki sürücü güç olan derişim farkının artmasıdır.
- ΔR 'ye karşılık zaman grafikleri bir arada çizildiğinde derişimin artmasıyla ΔR değerlerinin arttığı açık bir şekilde görülmektedir.
- SPR sensör iki farklı derişim aralığında derişim-sinyal doğrusallığı göstermektedir. 0,005 $\mu\text{g/mL}$ – 0,1 $\mu\text{g/mL}$ derişim aralığında alınan veriler değerlendirildiğinde elde edilen doğrunun denklemi $y=39.159x+0.48$ ve doğrusallığı (R^2) 0,9745; 0,5 $\mu\text{g/mL}$ – 10 $\mu\text{g/mL}$ derişim aralığında alınan veriler değerlendirildiğinde elde edilen doğrunun denklemi $y=0.2467x+9.7461$ ve doğrusallığı (R^2) 0.9621 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen bu verilerle SPR sensör, 0,005 $\mu\text{g/mL}$ – 0,1 $\mu\text{g/mL}$ aralığında %97, 0,5 $\mu\text{g/mL}$ – 10 $\mu\text{g/mL}$ aralığında %96 doğrulukta ölçüm yapmaktadır.
- Langmuir modelin hazırlanan SPR sensöre en uygun izoterm model olduğu görülmüştür. Hesaplanan ΔR_{maks} değeri (8.52), K_A ve K_D değerleri sırasıyla 11.24 ve 0.08 olarak hesaplanmıştır.
- Hazırlanan diklofenak baskılanmış SPR sensörün diklofenağa karşı seçiciliğinin belirlenmesi için yarışmalı bağlanma çalışmaları diklofenak ve karbamazepin çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Diklofenak baskılanmış SPR sensörün diklofenağa verdiği sinyal değeri (ΔR) 9.38 iken, aynı derişimlerde hazırlanan karbamazepin çözeltilisine verdiği sinyal değeri 1.12'dir. Bu sonuçlara göre hazırlanan sensör diklofenağı karbamazepin göre 8,4 kat daha duyarlı tayin etmektedir. Etkileşimdeki bu hassasiyet kalıp molekül olan diklofenağın üç boyutlu yapısının polimerik hafızaya alınmasından kaynaklanmaktadır.
- Diklofenak baskılanmış SPR sensörün baskılama seçiciliğini göstermek için diklofenak baskılanmamış SPR sensör hazırlanmış ve seçicilik çalışmalarında olduğu

gibi aynı derişimlerde diklofenak ve karbamazepin SPR sistemine enjekte edilmiştir. Diklofenak baskılanmamış SPR sensörün aynı derişimlerdeki diklofenak ve karbamazepin çözeltilerine verdiği tepki daha az olmuştur. Diklofenak baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensörler karşılaştırıldığında DFC sinyal duyarlılığının 9.38'den 1.03'e düştüğü görülmektedir. Seçicilik katsayıları, karbamazepin için 8.40 (baskılanmış), 7.92 (baskılanmamış) olarak bulunmuştur.

- Diklofenak baskılanmış SPR sensörün tekrar kullanılabilirliğini incelemek için; aynı derişimde diklofenak içeren çözeltiler 10 kez SPR sistemine verilmiş ve hazırlanan SPR sensörün diklofenak tayin miktarında önemli bir düşüş olmadan diklofenağı tayin ettiği görülmüştür.

6.KAYNAKLAR

- [1] Yücel A., *Çoklu enzim esasli biyosensör geliştirilmesi*, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, **2013**.
- [2] Wulff, G., Poll, H.G., Enzyme-analogue built polymers, 23. Influence of the structure of the binding sites on the selectivity for racemic resolution, *Makromolekular Chemistry and Physics*, 188, 4, 741-748, **1987**.
- [3] Bouwmeester, H., Dekkers, S., Noordam, M.Y., Hagens, W.I., Bulder, A.S., de Heer, C., ten Voorde, S.E.C.G., Wijnhoven, S.W.P., Marvin, H.J.P., Sips, A.J.A.M., Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 53, 52-62, **2009**.
- [4] Kaynar,B., *Metal ferit nanoparçacıklarının Hazırlanması ve Fiziksel Özelliklerinin İncelenmesi*, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri, Enstitüsü, **2007**.
- [5] Ünsal T., *Metal ferit nanoparçacıklarının Kimyasal Yöntemlerle Sentezlenmesi Magnetik özelliklerinin Belirlenmesi*, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri, Enstitüsü, **2007**.
- [6] Boisseau, P., Loubaton, B., Nanomedicine, nanotechnology in medicine, *Comptes Rendus Physique*, 12, 620-636, **2011**.
- [7] Cavalcanti, A., Shirinzadeh, B., Kretly, L.C., Medical nanorobotics for diabetes control, *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine*, 4, 127-138, **2008**.
- [8] Chen, H., Yada, R., Nanotechnologies in agriculture:New tools for sustainable development, *Trends in Food Science & Technology* 22, 585-594, **2011**.
- [9] Gohardani, O., Elola,M., C., Elizetxea, C., Potential and prospective implementation of carbon nanotubes on next generation aircraft and space vehicles: A review of current and expected applications in aerospace sciences, *Progress in Aerospace Sciences*, xxx, xxx, xxxx

- [7] Tazebay,U., H., Erdoğan, M., Nanobiyoteknoloji İnsanlığa ne Sunacak, *Bilim ve Teknik Dergisi*, 39-42, **2011**.
- [8] Celep Ş., *Nanoteknoloji ve tekstilde uygulama alanları*, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, **2011**.
- [9] Dorst, B., Mehta, J., Bekaert, K., Rouah-Martin, E., De Coen, W., Dubruel, P., Blust, R., Robbens, J., Recent advances in recognition elements of the food and environmental biosensors: *A review*, *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 1178-1194, **2010**.
- [10] Luong, J.H.T., Male, K.B., Glennon, J.D., Biosensor technology: Technology push versus market pull, *Biotechnology advances*, 26, 492-500, **2008**.
- [11] Gooding, JJ., Biosensor technology for detecting biological warfare agents: Recent progress and future trends', *Analytica Chimica Acta*, vol. 559, no. 2, pp. 137 - 151, **2006**.
- [12] Shah, J., Wilkins, E., Electrochemical Biosensors for Detection of Biological Warfare Agents, *Electroanalysis* ; 15, 157-167, **2003**.
- [13] Clark, LC Jr., Lyons, C., Electrode system for continuous monitoring in cardiovascular surgery, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 102, 29-45, **1962**.
- [14] Setford, S.J., Newman, J.D., Enzyme Biosensors. Bölüm 2; 29-60. Barredo, J.L. *Microbial Enzymes and Biotransformations*. Springer, **2005**.
- [15] Mathotra, R., Patel, V., Vaque, J.P., Gutkind, J.S. ve Rusling, J.F., Ultrasensitive Electrochemical Immunosensor for Oral Cancer Biomarker IL-6 Using Carbon Nanotube Forest Electrodes and Multilabel Amplification, *Analytical Chemistry*, 82, 3118-3123, **2010**.
- [16] Kadir, M.K.A., Tothill, I.E., *Development of an Electrochemical Immunosensor for Fumonisin, Detection in Foods*, *Toxins*, 2, 382-398, **2010**.
- [17] D'Souza, S.F., Microbial biosensors, *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 337-353, **2001**.

- [18] Wang, J., Rivas, G., Cai, X., Dontha, N., Shiraishi, H., Luo, D., Valera, F. S., Sequence-specific electrochemical biosensing of *M. tuberculosis* DNA, *Analytical Chemistry*, 337, 41-48, **1997a**
- [19] Yücel A., *Çoklu enzim esasli biyosensör geliştirilmesi*, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, **2013**.
- [20] Erdoğan, Ö., Yılmaz, E., Şener G., Uzun L., Say , R., Denizli, A., A new molecular imprinting-based mass-sensitive sensor for real-time detection of 17 β -estradiol from aqueous solution, *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 32,4, 1164-1169, **2013**.
- [21] Wood, RW., On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum, *Philosophical magazine*, 4, 396-402, **1902**.
- [22] Schasfoort R.B.M., Tudos A.J., Handbook of surface plasmon resonance, *The Royal Society of Chemistry*, Cambridge, UK. **2008**.
- [23] Kretschmann. E., Raether, H., Radiative decay of non-radiative surface plasmons excited by light *Z. Naturforsch, Teil A*, 23, 2135-2136, **1968**.
- [24] Earp, R.L., Dessy, R.E. Commercial Biosensors: Applications to Clinical Bioprocess and Environmental Samples. *John Wiley and Sons*: New York, Chapter 4, **1996**.
- [25] Liedberg, B., Nylander, C., Lundstrom, I., Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing, *Sensors and Actuators*,4, 29-304, **1983**.
- [26] Nylander, C., Liedberg, B., Lind, T., Gas detection by means of surface plasmons resonance, *Sensors and Actuators B*, 3, 79-88, **1982**.
- [27] Wood, RW., On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum, *Philosophical magazine*, 4, 396-402, **1902**.
- [28] Welford, K., Surface plasmon-polaritons and their uses, *Optical and Quantum Electronics*, 23, 1-27, **1991**.
- [29] Szentirmay, Z., Surface plasmon spectroscopy of metal/dielectric structures. *Spectrochimica Acta*, 48, 9-17, **1991**.

- [30] Earp, R.L., Dessy, R.E., Commercial Biosensors: Applications to Clinical Bioprocess and Environmental Samples. *John Wiley and Sons: New York*, Chapter 4, **1996**.
- [31] Homola J., Present and future of surface plasmon resonance biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 337, 528-539, **2003**.
- [32] Holford, T.R.J., Davis, F., Higson, S.P.J., Recent trends in antibody based sensors, *Biosensors and Bioelectronics*, 34, 12-24, **2012**.
- [33] Nylander, C., Liedberg, B., Lind, T., Gas detection by means of surface plasmons resonance, *Sensors and Actuators B*, 3, 79-88, **1982**.
- [34] Miura N., Sasaki, M., Gobi, K.V., Kataoka, C., Shoyama, Y., Highly sensitive and selective surface plasmon resonance sensor for detection of sub-ppb levels of benzo[a]pyrene by indirect competitive immunoreaction method, *Biosensors and Bioelectronics*, 18, 953-959, **2003**.
- [35] Türkoğlu, E.A., Yavuz, H., Uzun, L., Akgöl, S., Denizli, A., The fabrication of nanosensor-based surface plasmon resonance for IgG detection, *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 41; 213-221, **2013**.
- [36] Strong, A., Stimpson, D.I., Bartholomew, D.U., Jenkins, T.F., Elkind, J.L., Detection of trinitrotoluene (TNT) extracted from soil using a surface plasmon resonance (SPR)-based sensor platform. *SPIE*, 3710, 362-372, **1999**.
- [37] Oh, B.K., Kim, Y.K., Bae, Y.M., Lee, W.H., Choi, J.W., Detection of *Escherichia coli* O157, H7 using immunosensor based on surface plasmon resonance, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12, 780-786, **2002**.
- [38] Taylor, A.D., Ladd, J., Yu, Q., Chen, S., Homola, J., Jiang, S., Quantitative and simultaneous detection of four foodborne bacterial pathogens with a multi-channel SPR sensor, *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 752-758, **2006**.
- [39] Lotierzo, M., Henry, O.Y.F., Piletsky, S., Tothill, I., Cullen, D., Kania, M., Hock, B., Turner, A.P.F., Surface plasmon resonance sensor for domoic acid based on grafted imprinted polymer, *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 145-152, **2004**.

- [40] Uzun, L., Say, R., Ünal, S., Denizli, A., Production of surface plasmon resonance based assay kit for hepatitis diagnosis, *Biosensors and Bioelectronics*, 24, 2878–2884, **2009**.
- [41] Ladd, J., Boozer, C., Yu, Q., Chen, S., Homola, J., Jiang, S., DNA-directed protein immobilization on mixed self-assembled monolayers via a Streptavidin bridge, *Langmuir*, 20, 8090-8095, **2004**.
- [42] Stigter, E.C., Jong, G.J., Van Bennekom, W.P., An improved coating for the isolation and quantitation of interferon-gamma in spiked plasma using surface plasmon resonance (SPR), *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 474-482, **2005**.
- [43] Richardson, S.,D., Ternes, T., A., Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues, *Analytic Chemistry* 83, 4614-4648, **2011**.
- [44] Türkoğlu, E.A. Yüzey plazmon rezonans temelli antibadi sensörlerin hazırlanması, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, **2010**.
- [45] Şener, G., *Nanopartiküllerle duyarlılığı artırılmış yüzey plazmon rezonans biyosensörlerin hazırlanması*, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, **2009**.
- [46] Kara, M., *Nanodesenlenmiş ve moleküler baskılanmış kloramfenikol biyosensörünün hazırlanması, karakterizasyonu ve gıda güvenliği amacıyla kullanım potansiyelinin belirlenmesi*, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, **2010**.
- [47] Osman B., *Miyogloblinin yönelik moleküler baskılanmış yüzey plazmon rezonans biyosensör hazırlanması*, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi **2010**.
- [48] Wulff, G., Poll, H.G., Enzyme-analogue built polymers, 23. Influence of the structure of the binding sites on the selectivity for racemic resolution, *Makromolekular Chemistry and Physics*, 188, 4, 741-748, **1987**.

- [49] Piletsky, S. A., Alcock, S. Ve Turner, A. P. F., "Molecular imprinting at the edge of the third millennium", *Trends in Biotechnology*, vol.19, No:1, 9-12, **2001**.
- [50] Rao, T. P., Daniel, S. Ve Gladis, J. M., "Tailored materials for preconcentration or separation of metals by ion-imprinted polymers for solid-phase extraction (II-SPE)", *Trends in Analytical Chemistry*, 23, 28-35, **2004**.
- [51] Cormack, P.A.G., Elorza, A.Z., 2004. Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterization, *Journal of Chromatography B*, 804, 173-182, **2004**.
- [52] Komiyama, M., Takeuchi, T., Mukawa, T., Asanuma, H., Molecular imprinting (from fundamentals to applications), *Wiley-VCH Verlag*, **2003**.
- [53] Takeuchi, T., Haginaka, J., Separation and sensing based on molecular recognition using molecularly imprinted polymers, *Journal of Chromatography B*, 728, 1-20, **1999**.
- [54] Anderson, L.I., Molecular imprinting for drug bioanalysis a review on the application of imprinted polymers to solid-phase extraction and binding assay, *Journal of Chromatography B*, 739, 163-173, **2000**.
- [55] Komiyama, M., Takeuchi, T., Mukawa, T., Asanuma, H., Molecular imprinting (from fundamentals to applications), *Wiley-VCH Verlag*, **2003**.
- [56] Jiang, T., Zhao, L., Chu, B., Feng, Q., Yan, W., Lin, J-M., Molecularly imprinted solid-phase extraction for the selective determination of 17 β -estradiol in fishery samples with high performance liquid chromatography, *Talanta*, 78, 442-447, **2009**.
- [57] Ramstrom, O., Ye, L., Mosbach, K. 1996. Artificial antibodies to corticosteroids prepared by molecular imprinting. *Chemistry and Biology*, 3: 471-477, **1996**.
- [58] Yan, H., Row, H.K. Characteristic and synthetic approach of molecularly imprinted polymer, *International. Journal. Moleculer. Science*, 7: 155-178, **2006**.

- [59] Mosbach, K., Ramstrom, O., The Emerging Technique of Molecular Imprinting and Its Future Impact on Biotechnology, *Biology Technology*, 14(2): 163-170, **1996**.
- [60] Koçyiğit H., *Sulardaki kadmiyum kirliliğinin dolgulu kolonlarda adsorpsiyon yolu ile giderilmesi*, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, **1999**.
- [61] Ye, M., Zhang, D., Han, L., Tejada, J., Ortiz, C. Synthesis, preparation, and conformation of stimulus-responsive end-grafted poly(methacrylic acid-g-ethylene glycol) layers, *Soft Matter*, 2, 243-256, **2006**.
- [62] Polacca, G., Cascone, M.G., Petarca, L., Peretti, A. Thermal behaviour of poly(methacrylic acid)/poly(*N*-vinyl-2-pyrrolidone) complexes, *European Polymer Journal*, 36, 2541-2544, **2000**.
- [63] Zhang, L., Cheng, G., Fu, C., Molecular selectivity of tyrosine-imprinted polymers prepared by seed swelling and swelling and suspension polymerization, *Polymer International*, 51; 687-692, **2002**.
- [64] Lin, L.P., Huang, L.S., Lin, C.W., Lee, C.K., Chen, J.L., Hsu, S.M., Lin, S., Determination of binding constant of DNA-binding drug to target DNA by surface plasmon resonance biosensor technology, *Current Drug Target*, 5, 61-72, **2005**.
- [65] Homola J., Present and future of surface plasmon resonance biosensors, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 337, 528-539, **2003**.
- [66] Homola, J., Surface Plasmon Resonance Sensors for Detection of Chemical and Biological Species, *Chemical Reviews*, 108, 462-493, **2008**.
- [67] Rey, M., Bebianno, M., J., Effects of non steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) diclofenac exposure in mussel *Mytilus galloprovincialis*, *Aquatic Toxicology*, 148, 221-230, **2014**.
- [68] Öz, C., U., *Diklofenak Sodyum Yüklü Mikropartiküler Sistemlerden Sulu Dispersiyonların Hazırlanmasına Yönelik Çalışmalar*, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, **2011**.

- [69] Saygı, Ş., Battal, D., ŞahinN.,Ö., Çevre ve İnsan Sağlığı Yönünden ilaç Artıklarının Önemi, *Marmara Pharmaceutical Journal*, 16, 82-90, **2012**.
- [70] Li, X., Husson, S.M. Adsorption of dansylated amino acids on molecularly imprinted surfaces: A surface plasmon resonance study. *Biosensors&Bioelectronics*. 22, 336-348, **2006**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı: Kıvılcım Çaktü Güler

Doğum Yeri: Ankara

Medeni Hali: Evli

E-posta: caktu@hacettepe.edu.tr

Adresi: Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı, Beytepe, Ankara.

Eğitim

Lise: Kaya Bayazıtöğlu Lisesi

Lisans: Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans: Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü

Doktora: Hacettepe Üniversitesi Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

Yabancı Dil Düzeyi

İngilizce (İleri Düzeyde)

İş Deneyimi

Kilis 7 Aralık Üniversitesi (2010-..)

Deneyim Alanları

Yüzey plazmon rezonans (SPR) temelli biyosensörler, polimerik kolonlar

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

-

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

-