

**YÜZEY PLAZMON REZONANS SENSÖRÜ İLE  
SENTETİK RESEPTÖRLER KULLANILARAK SÜTTE  
BULUNAN BENZİL PENİSİLİNİN TAYİNİ**

**DETECTION OF BENZYL PENICILLIN IN MILK USING  
SYNTHETIC RECEPTORS WITH SURFACE PLASMON  
RESONANCE**

**ONUR ÇELİK**

**PROF. DR. ADİL DENİZLİ**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

## ÖZET

### YÜZEY PLAZMON REZONANS SENSÖRÜ İLE SENTETİK RESEPTÖRLER KULLANILARAK SÜTTE BULUNAN BENZİLPENİSİLİNİN TAYİNİ

**Onur ÇELİK**

**Yüksek Lisans, Biyomühendislik Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Adil DENİZLİ**

**Nisan 2022, 80 sayfa**

Gıda ürünlerinde, içme suyunda ve çevrede bulunan antibiyotik kalıntıları, antibiyotiğe dirençli bakteri suşlarının ortaya çıkması, normal ekolojik dengenin bozulması ve alerjik reaksiyon insidansının artması dahil olmak üzere ciddi sağlık sonuçlarına neden olmaktadır. Bu sebeplerden dolayı, halk sağlığının korunması için gıda ve çevredeki bu antibiyotik kalıntılarının tespiti hayati önem taşımaktadır. Bu tez çalışması kapsamında, moleküler baskılama tekniği kullanılarak hazırlanan yüzey plazmon rezonans (SPR) sensör ile hem sulu çözelti hem de süt örneklerinden benzilpenisilin antibiyotiğinin seçici ve hassas tayini gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, benzilpenisilin baskılanmış poli (hidroksietil metakrilat-grafen oksit-N-metakriloil-L-fenilalanin) (MIP-GO) SPR sensör hazırlanmıştır. Hazırlanan sensör yüzeyinin farklı yöntemler ile karakterize edilmesinden sonra MIP-GO SPR sensör benzilpenisilini 1-100 ppb derişim aralığında 0.021 ppb düşük tayin sınırı ve 0.9665 korrelasyon katsayısı ile doğrusal ilişki göstererek tayin etmiştir. MIP-GO SPR sensörün hedef molekül benzilpenisilini seçici tayin ettiğini göstermek amacı ile seçicilik çalışmaları gerçekleştirilmiş ve benzilpenisilini, amoksisilinden 8.16 kat ve ampisilinden 14.04 kat daha seçici tayin ettiği tespit edilmiştir. Baskılama verimliliğini incelemek amacı ile benzilpenisilin baskılanmamış poli (hidroksietil metakrilat-grafen oksit-N-metakriloil-L-fenilalanin) (NIP-GO) SPR sensör benzilpenisilin molekülü eklenmeden aynı polimerizasyon reçetesi kullanılarak hazırlanmıştır. MIP-GO SPR sensör ile NIP-GO SPR sensör karşılaştırıldığında baskılama verimliliği (IF) 11.06 olarak tespit edilmiştir. Grafen oksit (GO) yüzey

plazmon rezonans sinyal yanıtını artırmak amacı ile eklendiğinden, bu etkiyi incelemek için GO eklenmeden hazırlanan poli (hidroksietil metakrilat-grafen oksit-N-metakriloil-L-fenilalanin) (MIP) SPR sensör ile kontrol deneyleri gerçekleştirilmiştir. MIP-GO, NIP-GO ve MIP SPR sensörler, fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometresi, atomik kuvvet mikroskobu ve temas açısı ölçümleri ile karakterize edilmiştir. MIP-GO SPR sensörün tekrarlanabilirlik çalışmaları, 25 ppb benzilpenisilin derişimi içeren çözelti ile gerçekleştirilerek istatistiksel olarak analiz edilmiştir. %1.0'den az olan gün-içi analizlerin yüzde görelî standart sapması (RSD), aynı sensörle dört adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsünden sonra bile benzilpenisilin algılama yeteneğinde ihmal edilebilir bir kayıp olduğuna işaret etmiştir. Gerçek gıda örneğî olarak içine 6.25 ppb benzilpenisilin eklenen ve eklenmeyen sütteki benzilpenisilin miktarı MIP-GO SPR sensör ile tespit edilmiştir. Validasyon çalışmaları için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) deneyleri gerçekleştirilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Grafen oksit, moleküler baskılama, sensör, benzilpenisilin, yüzey plazmon rezonans.

## **ABSTRACT**

### **DETECTION OF BENZYL PENICILLIN IN MILK USING SYNTHETIC RECEPTORS WITH SURFACE PLASMON RESONANCE**

**Onur ÇELİK**

**Master, Division of Bioengineering**

**Supervisor: Prof. Dr. Adil DENİZLİ**

**April 2022, 80 pages**

Antibiotic residues in food products, drinking water and the environment cause the emergence of antibiotic-resistant bacterial strains, disruption of the normal ecological balance, and serious health consequences, including an increased incidence of allergic reactions. For these reasons, the detection of these antibiotic residues in food and the environment is vital for the protection of public health. In this study, selective and sensitive detection of benzylpenicillin antibiotic from both aqueous solution and milk samples was performed by surface plasmon resonance sensor prepared using molecular imprinting technique. For this purpose, benzylpenicillin imprinted poly (hydroxyethyl methacrylate-graphene oxide-N-methacryloyl-L-phenylalanine) (MIP-GO) SPR sensor was produced. Following the characterization studies of sensor surface, benzylpenicillin detection was performed by MIP-GO SPR sensor with 0.021 ppb detection limit and a linear correlation of 0.9665 for the 1-100 ppb concentration range of benzylpenicillin. Selectivity studies were carried out to show that the MIP-GO SPR sensor selectively detects the target molecule benzylpenicillin, and it was determined that the MIP-GO SPR sensor detected the target benzylpenicillin molecule 8.16 times more selectively than amoxicillin and 14.04 times more selectively than ampicillin. To examine the imprinting efficiency, non-imprinted poly (hydroxyethyl methacrylate-graphene oxide-N-methacryloyl-L-phenylalanine) (NIP-GO) SPR sensor was prepared using the same polymerization recipe without the addition of benzylpenicillin molecule. By comparing the MIP-GO SPR sensor with the NIP-GO SPR sensor, the imprinting efficiency was determined as IF: 11.06. Since graphene oxide (GO) was added to increase the surface

plasmon resonance signal response, control experiments were performed by a poly (hydroxyethyl methacrylate-graphene oxide-N-methacryloyl-L-phenylalanine) (MIP) SPR sensor prepared without adding GO to examine this effect. MIP-GO, NIP-GO and MIP SPR sensors were characterized by fourier-transform infrared spectrophotometer, atomic force microscopy and contact angle measurements. Repeatability studies of MIP-GO SPR sensor were performed for 25 ppb benzylpenicillin concentration and statistically analyzed. The percent relative standard deviation (RSD) of intraday-assays of less than 1.0% indicated a negligible loss of benzylpenicillin detection ability even after four adsorption-desorption cycles with the same sensor. As a real food sample, the benzylpenicillin amount spiked into the milk sample with 6.25 ppb final benzylpenicillin concentration and also unspiked milk sample was determined by MIP-GO SPR sensor. High-performance liquid chromatography (HPLC) experiments were carried out for validation studies.

**Keywords:** Graphene oxide, molecular imprinting, sensor, benzylpenicillin, surface plasmon resonance.

## TEŞEKKÜR

*Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmamda;*

*Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, çalışmalarımın titizlikle yürütülmesini ve sonuçlandırılmasını sağlayan, prensiplerini hayatım boyunca kendime örnek alacağım tez danışmanım, değerli hocam, **Sayın Prof. Dr. Adil Denizli** 'ye,*

*Tez çalışmam süresince akademik bilgi ve tecrübeleriyle yardımlarını esirgemeyen, çalışmalarımın her aşamasında mükemmeliyetçi yaklaşımıyla destek olan değerli hocam **Doç. Dr. Fatma Yılmaz** 'a,*

*Bilimsel katkı ve desteği ile yol gösteren değerli hocam **Dr. Öğr. Üyesi Yeşeren Saylan** 'a,*

*Tecrübeleri ve desteği ile tez çalışmam üzerinde büyük yardımları olan **Arş. Gör. Dr. Ilgım Göktürk** 'e,*

*Teorik ve pratik yardımlarıyla bana destek olan **Arş. Gör. Merve Çalışır** 'a ve **Gaye Yılmaz** 'a,*

*Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm **Bioreg** ailesi 'nin tüm bireyelerine,*

*Sonsuz sabrı ve öz verisiyle tüm eğitim hayatım boyunca destek olan **aileme**,*

*Teşekkür eder, sevgi ve saygılarımı sunarım.*

**Onur ÇELİK**

**Nisan, 2022**

## İÇİNDEKİLER

|  |      |
|--|------|
| ÖZET .....   | i    |
| ABSTRACT .....   | iii  |
| TEŞEKKÜR.....  | v    |
| İÇİNDEKİLER .....  | vi   |
| ŞEKİLLER.....  | viii |
| ÇİZELGELER.....  | xi   |
| SİMGELER VE KISALTMALAR .....  | xii  |
| 1. GİRİŞ.....  | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER.....   | 7    |
| 2.1. Antibiyotiklerin tarihçesi ve kullanım alanları.....  | 7    |
| 2.2. Antibiyotiklerin tayin yöntemleri .....   | 10   |
| 2.3. Moleküler baskılama tekniği .....   | 14   |
| 2.4. Yüzey plazmon rezonans .....  | 15   |
| 3. MATERYAL VE METOD.....  | 21   |
| 3.1. Kimyasal malzemeler .....   | 21   |
| 3.2. MIP-GO, NIP-GO ve MIP SPR sensörlerin modifikasyonu .....                                     | 21   |
| 3.3. MIP-GO ve NIP-GO SPR sensörlere GO-TMPSM'nin ve MIP SPR sensöre<br>TMSPM'nin bağlanması ..... | 21   |
| 3.4. MIP-GO, NIP-GO ve MIP SPR sensörlerin hazırlanması .....                                      | 22   |
| 3.5. MIP-GO, NIP-GO ve MIP SPR sensörlerin karakterizasyon çalışmaları .....                       | 24   |
| 3.5.1 Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektrofotometresi .....                                 | 24   |
| 3.5.2. Atomik kuvvet mikroskobu (AFM).....   | 25   |
| 3.5.3. Yüzey ıslanabilirlik ölçümleri .....  | 26   |
| 3.6. MIP-GO, NIP-GO ve MIP SPR sensörlerin kinetik analizleri.....                                 | 26   |

|  |    |
|--|----|
| 3.7. Sütteki benzilpenisilin tayini ve kinetik çalışmalar .....          | 30 |
| 4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA .....                                   | 32 |
| 4.1. GO-TMSPM kompleksinin karakterizasyonu.....                         | 32 |
| 4.2. MIP-GO, NIP-GO ve MIP SPR sensörlerin karakterizasyonu .....        | 34 |
| 4.3. SPR sensörler ile gerçekleştirilen kinetik analizler .....          | 39 |
| 4.4. Seçicilik çalışmaları.....  | 48 |
| 4.5. MIP-GO SPR sensörün baskılama etkinliğinin belirlenmesi.....        | 52 |
| 4.6. MIP-GO SPR sensörünün tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi..... | 55 |
| 4.7. GO'in GO-SPR sensörün hassasiyetini artırıcı etkisi.....            | 57 |
| 4.8. Süt örneğinden benzilpenisilin tayini .....                         | 58 |
| 4.9. Validasyon çalışmaları.....   | 62 |
| 5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....  | 65 |
| KAYNAKLAR .....  | 70 |
| YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALİK RAPORU .....                       | 81 |
| ÖZGEÇMİŞ .....   | 82 |



## ŞEKİLLER

|   |    |
|---|----|
| Şekil 2.1 Antibiyotiklerin ortaya çıkma kronolojisi.....  | 7  |
| Şekil 2.2 Sensörün tanıma elemanları .....  | 12 |
| Şekil 2.3 Moleküler baskılama yönteminin basamakları.....   | 15 |
| Şekil 2.4 SPR sensörlerin temel çalışma prensibi. ....  | 15 |
| Şekil 2.5 Snell yasasının gösterimi.....  | 16 |
| Şekil 2.6 Dielektrik sınırlarda meydana gelen iç kırınım. ....  | 17 |
| Şekil 2.7 SPR sensöründen elde edilen sensorgram.....   | 18 |
| Şekil 2.8 Plazmonik sensörlerin çalışma şekli. Hedef molekülün tanıma elemanlarına bağlanması (a) ve analit ile etkileşen sensör yüzeyindeki RI artışına bağlı olarak spektrumda meydana gelen değişiklik (b). .... | 19 |
| Şekil 2.9 MIP-GO SPR sensörün benzilpenisilin için adsorpsiyon-desorpsiyon işleminin şematik gösterimi. ....  | 20 |
| Şekil 3.1 SPR altın çip yüzeyinde nanofilm oluşumunun şematik gösterimi. ....   | 23 |
| Şekil 3.2 MIP-GO, NIP-GO ve MIP SPR sensörlerin elde edilmesinde kullanılan spin kaplayıcı (a) ve UV lamba (b).....   | 24 |
| Şekil 3.3 FTIR spektrofotometre cihazının görüntüsü. ....   | 25 |
| Şekil 3.4 AFM cihazının görüntüsü.....  | 25 |
| Şekil 3.5 Temas açısı değerlerinin ölçüldüğü cihazın görüntüsü.....   | 26 |
| Şekil 3.6 Kinetik analizlerin yapıldığı SPR cihazının görüntüsü.....  | 28 |
| Şekil 3.7 Validasyon çalışmalarının gerçekleştiği HPLC cihazının görüntüsü. ....  | 31 |
| Şekil 4.1 GO ile TMPSP'nin oluşturduğu GO-TMSPM kompleksinin moleküler formülü (a) ve MAPA monomerinin benzilpenisilin ile MAPA/benzilpenisilin ön-kompleksini oluşturması (b). ....                                | 33 |
| Şekil 4.2 GO'in ve TMPSM ile yaptığı GO-TMSPM kompleksin FTIR spektrumu. ....   | 33 |
| Şekil 4.3 MIP-GO ve NIP-GO SPR sensör yüzeylerindeki nanofilme ait FTIR spektrumu.  |    |

|  |    |
|--|----|
| .....  | 35 |
| Şekil 4.4 MIP-GO ve MIP SPR sensör yüzeylerindeki nanofilme ait FTIR spektrumu.<br>.....   | 35 |
| Şekil 4.5 Boş SPR sensörünün karakterizasyonu. AFM (A) ve temas açısı (B) görüntüsü.<br>.....  | 37 |
| Şekil 4.6 MIP-GO SPR sensörünün karakterizasyonu. AFM (A) ve temas açısı (B) görüntüsü. ....   | 37 |
| Şekil 4.7 MIP SPR sensörünün karakterizasyonu. AFM (A) ve temas açısı (B) görüntüsü.<br>.....  | 38 |
| Şekil 4.8 NIP-GO SPR sensörünün karakterizasyonu. AFM (A) ve temas açısı (B) görüntüsü. ....   | 38 |
| Şekil 4.9 1 ppb benzilpenisilin derişimi için elde edilen sensorgram. ....   | 40 |
| Şekil 4.10 6.25 ppb benzilpenisilin derişimi için elde edilen sensorgram. ....   | 40 |
| Şekil 4.11 12.5 ppb benzilpenisilin derişimi için elde edilen sensorgram. ....   | 41 |
| Şekil 4.12 25 ppb benzilpenisilin derişimi için elde edilen sensorgram. ....   | 41 |
| Şekil 4.13 50 ppb benzilpenisilin derişimi için elde edilen sensorgram. ....   | 42 |
| Şekil 4.14 100 ppb benzilpenisilin derişimi için elde edilen sensorgram. ....  | 42 |
| Şekil 4.15 1-100 ppb derişim aralığındaki benzilpenisilin çözeltilerinin MIP-GO SPR sensör ile elde edilen sensorgramları. ....  | 43 |
| Şekil 4.16 MIP-GO SPR sensörün kalibrasyon grafiğı. ....   | 44 |
| Şekil 4.17 Denge analiz (Scatchard) (a) ve bağlanma kinetik (b) yaklaşımları.....  | 46 |
| Şekil 4.18 Langmuir (a) ve Freundlich (b) adsorpsiyon izoterm modellerine ait grafikler.<br>.....  | 48 |
| Şekil 4.19 Benzilpenisilin iki boyutlu (2D) ve üç boyutlu (3D) yapısı (a), Amoksisilin iki boyutlu (2D) ve üç boyutlu (3D) yapısı (b), Ampisilin iki boyutlu (2D) ve üç boyutlu (3D) yapısı (c)..... | 50 |
| Şekil 4.20 MIP-GO SPR sensörün benzilpenisilin, amoksisilin ve ampisilin çözeltileri için verdiği sensorgram benzilpenisilin derişimi: 100 ppb.....  | 51 |

|  |    |
|--|----|
| Şekil 4.21 MIP SPR sensörün benzilpenisilin, amoksisilin ve ampisilin çözeltileri için verdiği sensorgram benzilpenisilin derişimi: 100 ppb.....   | 51 |
| Şekil 4.22 NIP-GO SPR sensörün benzilpenisilin, amoksisilin ve ampisilin çözeltileri için verdiği sensorgram benzilpenisilin derişimi: 100 ppb.....  | 52 |
| Şekil 4. 23 MIP-GO ve NIP-GO SPR sensörün benzilpenisilin çözeltisi için verdiği sensorgram benzilpenisilin derişimi: 100 ppb. ....  | 54 |
| Şekil 4.24 MIP-GO, MIP ve NIP-GO SPR sensörlerin seçicilik örnekleri için verdiği %kırılma değişimi değerlerini gösteren sensorgram benzilpenisilin derişimi: 100 ppb. ....  | 54 |
| Şekil 4.25 MIP-GO SPR sensörün tekrarlanabilirlik sensorgramı benzilpenisilin derişimi: 25 ppb. ....   | 55 |
| Şekil 4.26 Farklı günlerde hazırlanan MIP-GO SPR sensörü için gün-içi %kırılma değişim değerlerini gösteren grafik benzilpenisilin derişimi: 25 ppb. ....  | 56 |
| Şekil 4.27 GO'in benzilpenisilin tayini için sinyal yanıtını artırıcı etkisini gösteren sensorgram benzilpenisilin derişimi: 100 ppb. ....   | 58 |
| Şekil 4.28 MIP-GO SPR sensörün benzilpenisilinli ve benzilpenisilinsiz süt örnekleri için sensorgram benzilpenisilin derişimi: 6.25 ppb .....  | 60 |
| Şekil 4.29 Benzilpenisilinin HPLC ile analizi. 1.0-100 ppb benzilpenisilin çözeltisi için kalibrasyon eğrisi (a) ve 6.25 ppb benzilpenisilin katkılanmış ve katkılanmamış süt örneği için HPLC kromotogramları (b). .... | 64 |

## ÇİZELGELER

|   |    |
|---|----|
| Çizelge 2.1 Sütte bulunan maksimum kalıntı limitleri [52] .....   | 10 |
| Çizelge 4.1 Boş SPR çipin, MIP-GO, NIP-GO ve MIP SPR sensörlerin temas açısı, derinlik ve pürüzlülük değerleri.....     | 39 |
| Çizelge 4.2 Denge ve bağlanma kinetik analizleri ile elde edilen parametreler.....                                      | 46 |
| Çizelge 4.3 Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izoterm modellerine ait parametreler. ....                               | 48 |
| Çizelge 4.4 MIP-GO ve NIP-GO SPR sensörlerin benzilpenisilin tayini için seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları. .... | 53 |
| Çizelge 4.5 Tekrarlanabilirliğin kesinlik değerleri. ....   | 57 |
| Çizelge 4.6 Gün-içi kesinlik değerleri.....   | 57 |
| Çizelge 4.7 Benzilpenisilin tayini için kullanılan optik sensörler. ....  | 61 |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### SİMGELER

- C : Analit derişimi  
k<sub>a</sub> : Bağlanma hız sabiti  
k<sub>d</sub> : Ayrılma hız sabiti  
K<sub>A</sub> : Bağlanma sabiti  
K<sub>D</sub> : Ayrılmaz sabiti

### KISALTMALAR

- GO : Grafen Oksit  
MAPA : N-Metakriloil-(L)-Fenilalanin  
HEMA : 2-Hidroksietil Metakrilat  
EDMA : Etilen Glikol Dimetakrilat  
FTIR : Fourier Dönüşümlü Kızılötesi  
MIP : Moleküler Baskılanmış Polimer  
NIP : Baskılanmamış Polimer  
SEM : Taramalı Elektron Mikroskobu  
AFM : Atomik Kuvvet Mikroskobu

## 1. GİRİŞ

Benzilpenisilin en yaygın kullanılan  $\beta$ -laktamlardan biri olup hem insanlarda hem de hayvanlardaki bakteriyel enfeksiyonun önlenmesi ve tedavisinde kullanılmakta olan antibiyotiktir [1]. Ancak hayvancılıkta antibiyotik kullanımının yaygınlaşması süt gibi gıdalarda kalıntılara neden olarak aşırı duyarlı bireylerde alerjik reaksiyonlara neden olabilmektedir [2]. Antibiyotiklerin uygulandıktan sonra çevreye salınmalarından kaynaklı antibiyotik kalıntıları halk sağlığı için potansiyel bir tehdit oluşturan antibiyotik direncinin gelişmesine neden olabilmektedir [3]. Bu tehlikelerin önlenmesi için Avrupa Birliği yönetmelikleri, süt ve ette bulunan antibiyotiklerin maksimum kalıntı limitlerini yayınlamıştır [4]. Son yıllarda ilaç firmalarının ve hastanelerin atık sularında, belediye atık sularında, yüzey ve yeraltı sularında antibiyotik tespit edilmiştir [5]. Halk sağlığını korumak için gıda ve çevre sularındaki benzilpenisilinin izolasyonu ve tayini için hızlı, doğru ve spesifik bir yöntemlerin geliştirilmesi arzu edilmektedir. Halihazırda, biyolojik numunelerdeki antibiyotiklerin, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile analiz işlemi gerçekleştirilmeden önce katı faz ekstraksiyonu (SPE) ile saptanabilir bir seviyeye önceden konsantre edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla C18, hidrofilik lipofilik denge kopolimeri ve karışık fazlı SPE sorbentleri yaygın olarak antibiyotiklerin ekstraksiyonunda yüksek geri kazanım değeri ile kullanılmıştır [6]. Antibiyotiklerin tayini genellikle, *Bacillus stearothermophilus*'un büyüme inhibisyonuna dayanan mikrobiyolojik tabanlı tekniklerle gerçekleştirilmiştir [7].

Günümüzde, benzilpenisilinin tespiti için kromatografik testler [4,8-10], immünoassay temelli yöntemler [11,12] ve kapiler elektroforez [13] yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemler oldukça hassas ve seçicidir. Ancak nitelikli insan ihtiyacı, kullanılan çözücülerin çevreyi kirletmesi, donanımlı analitik cihazlara gerek duyulması, pahalı ve zaman alıcı olmaları gibi bazı dezavantajlara sahiptir. Uygulaması kolay, hızlı, özgül ve basit analizlerin geliştirilmesi bu dezavantajların üstesinden gelmek için gereklidir.

Son yıllarda moleküler baskılanmış polimerler (MIP'ler) geleneksel SPE sorbentlerin sınırlamalarının üstesinden gelmek için değerli bir alternatif olarak geliştirilmiştir. MIP'ler, hedef moleküle özgü tanıma bölgelerine sahip, sentetik, isteğe göre özel üretilen malzemeler olup bir hedef molekül, çapraz bağlayıcı ve fonksiyonel monomerlerin polimerizasyonu ile elde edilmektedirler [14,15]. MIP'ler, önceden belirlenmiş spesifik

seçicilikleri, kolay hazırlama ve iyi kimyasal kararlılıkları gibi benzersiz özellikleri nedeniyle özellikle sorbent olarak kullanılmaya iyi adaylardır [16,17].

Sensörler, biyolojik tanıma elemanlarını ve dönüştürücüleri içeren analitik cihazlardır [11]. Gıda sektöründe ve diğer analitik alanlarda farklı analitlerin hızlı, hassas ve yerinde izlenmesi için kullanılan yenilikçi yaklaşımlardan biri olup hayvansal kaynaklı gıdalarda antibiyotik kalıntılarının tespiti için başarıyla kullanılmıştır. Biyoalgılamada antikör, enzim, aptamer, mikrobiyal hücreler ve sentetik moleküler baskılanmış polimer (MIP) gibi farklı biyotanıma elemanları kullanılmıştır [18]. Bunlar arasında enzimler ve antikörler, antibiyotik kalıntılarının tespiti için en yaygın olarak kullanılan biyolojik tanıma elemanlarıdır [19]. Son yıllarda, benzilpenisilin antibiyotiğinin tespitinde elektrokimyasal [12,20-26], florimetrik ve kolorimetrik ölçümlere [27] dayalı optik sensörler kullanılmıştır. Son yirmi yılda, optik antibiyotik tespit yöntemleri, hızlı tepkileri ve yüksek hassasiyetleri nedeniyle giderek daha fazla dikkat çekmektedir. 1995 yılında, yüksek duyarlılığı nedeniyle yüzey plazmon rezonans (SPR) tabanlı sensörler antibiyotik tespitinde kullanılmıştır [28].

SPR, bir metal (genellikle altın) filmle kaplı bir prizmadan yansıyan ışığın yoğunluğunu ölçen optik bir yöntemdir. Işık prizma ve metalin sınırında yayıldığında ve geliş açısı kritik açıya ulaştığında toplam yansıma etkisi meydana gelecektir. Yüksek hassasiyet ve etiketsiz kullanılabilme özellikleri nedeniyle, SPR tabanlı sensörler biyolojik algılamada yaygın olarak kullanılmaktadır [29]. Analit miktarına bağlı olan SPR eğrisinin değişim düzeyi kayma açılarından elde edilen yanıt birimi olarak gerçek zamanlı olarak izlenebilmektedir [30]. SPR sensörler, nükleotidler, protein-protein ve ilaç-albümin arasındaki etkileşimleri araştırmak ya da hücrel morfolojik değişiklikleri incelemek için kullanılmıştır [31]. Son yıllarda klinik, çevresel ve gıda güvenliği alanlarında SPR sensörlerinin uygulamalarını rapor eden yayınların sayısı çok hızlı bir şekilde artmıştır. SPR tabanlı sensörler, kompakt tasarımları, azaltılmış analiz maliyetleri, gerçek zamanlı ve etiketsiz analizi yapabilme yetenekleri nedeniyle antibiyotik tespitinde büyük önem kazanmıştır. Yüzey plazma rezonans görüntüleme (SPRi) teknolojisinin gelişmesiyle birlikte Sabina Rebe Raz ve arkadaşları, çip üzerinde farklı antibiyotik dizilerini sabitleyerek sekiz çeşit antibiyotiği aynı anda tayin edebildiklerini göstermişlerdir [32]. Ayrıca, Fátima Fernández ve arkadaşları altın nanoparçacıklarını antibiyotik filmlerin dışına sabitleyerek, enrofloksasin saptama sınırını 14 kat azaltan lokalize yüzey plazma rezonans (LSPR) etkisinden dolayı SPR sinyallerini güçlendirmişlerdir [33]. Cacciatore

ve arkadaşları ise benzilpenisilinin tespitinde kullanılan optik sensör geliştirmişlerdir [34]. O zamandan beri sensörler süt, bal ve tavuk dokularındaki antibiyotik kalıntılarının tespiti için uygulanmakta olup, tayin edilen tespit sınırı, maksimum kalıntı sınırının çok altındadır.

Son yıllarda, MIP'ler gıda örneklerindeki farklı antibiyotiklerin tespiti için hem optik hem de elektrokimyasal sensörlerde yaygın olarak kullanılmaktadır [35]. Dalga boyu zayıflaması koşullarını tespit eden ve/veya %kırılma indisindeki değişimi ölçen SPR sensörler, vitaminlerin, mikotoksinlerin, reseptör proteinlerin, hormonların, veteriner ilaç kalıntılarının ve ayrıca *Salmonella* gibi tüm hücrelerin tespitinde kullanılmaktadır. Bununla birlikte, gıda kirleticilerinin yerinde tespitinde yüksek verimle kullanılacak, hassas, düşük maliyetli tayin ve teşhis metodlarının geliştirilmesinde hala kısıtlamalar vardır. Çünkü benzer yapıya sahip farklı moleküller arasında karşılıklı girişim ve çapraz reaksiyonlar meydana gelir [36]. Moleküler baskılama teknolojisi ile özel olarak hazırlanan tanıma bölgeleriyle antikör benzeri yapay malzemeler üretilerek biyolojik moleküller için tanıma elemanları oluşturulmaktadır. Mükemmel seçiciliğe, yüksek kimyasal ve fiziksel kararlılığa sahip MIP'ler'in hazırlanması ucuz olup her ilgili hedef için tasarlanabilmektedirler. MIP tabanlı sensörler, farmasötiklerin tayininde de başarıyla kullanılmaktadır [37].

Sensör tasarımındaki son gelişmelerden birisi, benzersiz optik, elektrik, mekanik ve kimyasal özelliklerinden dolayı daha iyi performans elde etmenin bir yolu olarak nanomalzemelerin kullanılmasıdır. Nanomalzemeler, hedef analiti tespit etmek için gerekli olan gereksinimleri karşılamaya yönelik bir sensörün hassasiyetini ve tepki hızını artırabilir [38]. Nano-MIP'lerin sentetik afinite reseptörleri olarak sensör cihazlarına entegrasyonu, tanıma alanında önemli bir etki yaratmıştır. Altıntaş ve arkadaşları, vankomisini hedefleyen nano-MIP'leri sentezlemek için hesaplama simülasyonları ve polimer bileşimi kullanmıştır [39]. Doğru moleküler tanıma ve adsorpsiyon elde etmek için MIP'ler, farklı fonksiyonel substratlar veya kaplamalar olarak tasarlanabilir. MIP'lerin etkinliğinin nasıl artırılacağı, antibiyotik tayininde kullanılan sensörlerdeki uygulama alanını genişletmek açısından hala önemli bir parametredir. MIP'lerin tasarlanabilir özelliği nedeniyle, etkin baskılama elde etmek için çok sayıda malzeme ve yöntem kullanılabilir. Bununla birlikte, malzemelerin ve yöntemlerin etkinliğinin incelenerek güçlü afiniteye sahip MIP'lerin nasıl elde edileceği, MIP tabanlı sensör geliştirmenin ana odak noktalarıdır [40].



Karbon nanotüpler (CNT'ler), grafen (GR), karbon nanolifler (CNF'ler), grafen kuantum noktaları (GQD'lar) ve fulleren dahil olmak üzere karbon nanomalzemeler, mükemmel elektriksel iletkenlikleri, büyük mekanik mukavemetleri, yüksek kimyasal kararlılıkları ve optik özellikleri sayesinde sensörlere entegrasyonunun yapılabilmesi nedeniyle çeşitli uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır [41].

Sunulan tez çalışması kapsamında sentetik afinite reseptörleri olarak kullanılan MIP'lerin SPR sensör ile entegrasyonu sağlanarak tanıma elemanı olarak kullanımı sağlanmıştır. Bu amaçla benzilpenisilin baskılanmış SPR temelli sensör hazırlanarak, benzilpenisilin hem sulu çözeltiden hem de benzilpenisilin katkılanmış ve katkılanmamış süt örneğinden seçici tayini gerçekleştirilmiştir. Moleküler baskılanmış SPR sensör, benzilpenisilini tanıyacak bölgeleri içerecek şekilde hazırlanmış, hassasiyeti artırmak amacı ile sinyal yanıtını artırıcı olarak grafen oksit (GO) ortama eklenerek düşük tayin limiti elde edilmiştir. Çalışma içeriğini içeren adımlar aşağıdaki çalışma planındaki basamaklar takip edilerek tamamlanmıştır.

- Yüzey plazmon rezonans sinyal yanıtının hassasiyetini arttırmak ve tayin limitini düşürmek amacı ile eklenen GO'ların, 3-(trimetoksisilil) propil metakrilat (TMSPM) ile etkileşmesiyle silanlanmış GO'nun (GO-TMSPM) oluşturulması.
- Benzilpenisilin baskılanmış SPR sensör hazırlamak için, benzilpenisilin ile N-metakriloil-(L)-fenilalanin (MAPA) fonksiyonel monomerin koordinasyonunun sağlanarak MAPA/benzilpenisilin kompleksinin oluşturulması.
- SPR çip altın yüzeylerin pirana çözeltisi ile modifikasyona hazır hale getirilmesi.
- Çip yüzeyinde moleküler baskılanmış polimerler elde etmek için kullanılacak vinil gruplarının eklenmesi amacı ile hazırlanan GO-TMSPM kompleksin, SPR çip yüzeyi ile etkileştirilmesi.
- GO içermeyen SPR sensör için çip yüzeyinin modifikasyonu için sadece TMSPM ile etkileştirilmesi.
- MAPA/benzilpenisilin kompleksi ile 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) ve etilenglikol dimetakrilat (EDMA) çapraz bağlayıcı monomerin karıştırılarak polimerizasyon karışımının hazırlanması.
- Hazırlanan polimerizasyon karışımının vinil grubu eklenmiş SPR çip yüzeyine damlatılarak spin kaplayıcı ile yüzeye homojen yayılımının sağlanması.

- UV ışığı altında polimerizasyon işlemi ile benzilpenisilin içeren monomer karışımının benzilpenisilin baskılanmış poli (hidroksietil metakrilat-N-grafen oksit-N-metakriloil-(L)-fenilalanin) nanofilme dönüştürülerek (MIP-GO) SPR sensör hazırlanması.
- Benzilpenisilin polimerik matriksten desorpsiyon ajanı yardımı ile uzaklaştırılması.
- Baskılamanın etkinliğini tespit edebilmek amacı ile, benzilpenisilin eklenmeden hazırlanan baskılanmamış poli(hidroksietil metakrilat-grafen oksit-N-metakriloil-(L)-fenilalanin) (NIP-GO) SPR sensörün ve MIP-GO SPR sensör ile aynı koşullarda hazırlanması.
- Hassasiyeti artırmak ve tayin limitini düşürmek amacı ile sinyal artırıcı olarak kullanılan GO'ler eklenmeden hazırlanan benzilpenisilin baskılanmış poli (hidroksietil metakrilat-N-metakriloil-(L)-fenilalanin) SPR sensörün (MIP), MIP-GO SPR sensör ile aynı koşullarda GO eklenmeden hazırlanması.
- Benzilpenisilin baskılanmış (MIP-GO), baskılanmamış (NIP-GO) ve grafen oksit eklenmemiş (MIP) SPR sensörlerin yüzeyine tutturulmuş nanofilmlerin FTIR spektrofotometre ile karakterize edilmesi.
- Benzilpenisilin baskılanmış (MIP-GO), baskılanmamış (NIP-GO) ve grafen oksit eklenmemiş (MIP) SPR sensörlerin yüzey karakterizasyonunun, atomik kuvvet mikroskobu ve temas açısı analizleri ile karakterize edilmesi.
- 10 mM pH 3.0 ortamında hazırlanan benzilpenisilin sekiz farklı derişim değeri (1, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 ppb) için (MIP-GO) SPR sensör ile tayin çalışmalarının gerçekleştirilerek %kırılma değerlerindeki değişimin plazmonik yanıt olarak ölçülmesi ve kinetik çalışmaların gerçekleştirilmesi.
- MIP-GO SPR sensörün tekrar kullanılabilirliğinin, gün-içi tekrarlanabilirlik deneyleri ile gerçekleştirilerek, üç farklı partide hazırlanan MIP-GO SPR sensör ile gerçekleştirilen analizin dört tekrarlı yapılması ve sonuçların istatistiksel olarak değerlendirilmesi.
- MIP-GO SPR sensörün seçicilik çalışmalarının, şekil ve boyut bakımından benzilpenisiline benzeyen, amoksisilin ve ampisilin ile gerçekleştirilmesi.

- Baskılamanın etkinliğini tespit etmek için benzilpenisilin olmadan hazırlanan baskılanmamış poli (hidroksietil metakrilat-grafen oksit-N-metakriloil-(L)-fenilalanin) (NIP-GO) SPR sensör ile benzilpenisilin tayin işleminin gerçekleştirilmesi.
- Hassasiyeti artırmak ve tayin limitini düşürmek amacı ile sinyal artırıcı olarak eklenen GO'lar eklenmeden hazırlanan, benzilpenisilin baskılanmış poli(hidroksietil metakrilat-N-metakriloil-(L)-fenilalanin) (MIP) SPR sensörün benzilpenisilin tayininde kullanılması.
- Gerçek örnek olarak, MIP-GO SPR sensör ile benzilpenisilin katkılanmış ve katkılanmamış süt örneğinden benzilpenisilinin seçici tayininin gerçekleştirilmesi.
- Gerçek örnek olarak, MIP-GO SPR sensör ile seçici tayin edilen benzilpenisilinin validasyon çalışmalarının, HPLC analizleri ile gerçekleştirilmesi.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Antibiyotiklerin tarihçesi ve kullanım alanları

Benzilpenisilinler, geniş bir yelpazedeki bakterilere saldıran bir grup antibakteriyel ilaçlardır. Bakteri kökenli hastalıklara kullanılan ilk ilaçlar olduğundan tıp tarihinde önemi oldukça büyüktür. Benzilpenisilinlerin keşfi ve üretimi milyonlarca insanın hayatını kurtardığı için modern tıbbın tedavi şeklinin çehresini yeniden şekillendirdiği söylenebilir. Şekil 2.1’de antibiyotiklerin ortaya çıkma kronolojisi gösterilmiştir.



Şekil 2.1 Antibiyotiklerin ortaya çıkma kronolojisi.

Penisilin, bakteri hücre duvarlarına müdahale ederek çalışır [42]. Bunu, bakteri hücrelerinde önemli bir yapısal rol oynayan peptidoglikanlar üzerinde etkisini göstererek gerçekleştirirler. Peptidoglikan, bakteri hücrelerinin plazma zarındaki hücre duvarlarının gücünü artıran ve dış sıvıların hücreye entegre olmasını önleyen bir yapı oluşturur. Bakteri çoğaldığında, hücreler bölünürken hücre duvarlarında küçük boşluklar oluşur. Penisilinler, peptidoglikanları birbirine bağlayan proteinleri bloke ederek bakterinin hücre duvarlarındaki deliklerin kapanmasını engeller. Çevreleyen sıvının su derişimi bakteri içindekinden daha yüksek olduğu için, su deliklerden hücreye akar ve bakteri patlar. Penisilin keşfi, İskoç bilim insanı Alexander Fleming tarafından yapılmıştır. Keşfin hikâyesi, Eylül 1928'de Fleming laboratuvarına döndüğünde, kapağı artık yerinde olmayan *Staphylococcus* bakterisi içeren bir petri kabı bulmasıyla başlar. Petri, *Penicillium notatum* adı verilen mavi-yeşil bir küfle kirlenmiştir. Fleming, bakterinin büyümediği küfü çevreleyen şeffaf bir halka olduğunu fark eder. Fleming, bu kalıbı keşfederek ve kullanımının farkına vararak, tıp tarihindeki en faydalı ilaçlardan birini yaratmak için çarkları harekete geçirmiştir [43]. Mart 1942'de Anne Miller, penisilin ile başarılı tedavi gören ilk hasta olarak tıp literatürüne geçmiştir. Yaptığı düşükten sonra ciddi enfeksiyon kapması sonrasında ilk antibiyotik tedavisiyle ölümden kıl payı

kurtulmuştur [44]. Fleming teknik olarak ilk antibiyotiği keşfettiysede, kabul edilmiş bir tedavi olarak uygulanabilmesi için birçok çalışmaya da ihtiyaç duyulmuştur. Üstün bir laboratuvara ve Fleming'den daha derin bir kimya bilgisine sahip bilim adamları, işin büyük kısmını gerçekleştirmeyi başarmıştır. Howard Florey, Norman Heatley ve Ernst Chain, ilaçla ilgili ilk derinlemesine ve odaklanmış çalışmaları ortaya koymuşlardır [45]. Fleming'in Nobel Ödülü kabul konuşmasında, penisilinlerin aşırı kullanımının bir gün bakteri direncine yol açabileceği konusunda bilim insanlarını uyarmasıyla yeni bir sürece girilmiştir.

Sanılanın aksine penisiline direnç geliştiren kişi değil, bakterinin kendisidir. Bakteriler milyarlarca yıldır dünyada bulunmaktadır. Bu süre zarfında zorlu ortamlara dayanmış ve sonuç olarak son derece ve etkili adaptasyon mekanizmaları geliştirmişlerdir. Ayrıca çok hızlı bir şekilde yenilenirler ve bir popülasyonda nispeten hızlı genetik değişiklikleri mümkün kılabilirler [46]. Bakterilerin penisiline karşı bağışıklık geliştirmesinin üç yaygın yolu vardır. Bakteriler bazen penisilinleri parçalayan bir enzim olan penisilinaz üretebilir. Bu yetenek, konjugasyon adı verilen bir süreçte küçük bir DNA halkası aracılığıyla bakteri popülasyonu boyunca yayılabilir. Bu, bireysel organizmaların aralarında yeni genetik bilgi paylaştığı, cinsel üremenin bakteriyel eşdeğeri. Değişen bakteri yapısı sayesinde bazı bakteriler, peptidoglikan duvarlarındaki penisilin bağlayıcı proteinlerin biçimini, penisilinlerin artık ona bağlanamaması için ustaca değiştirebilir. Penisiliden arınma ise diğer bakterilerin penisilinleri ihraç etmek için sistemler geliştirmesini odak alır. Bakterilerin hücreden madde salmak için kullandıkları akış pompaları vardır. Bu pompalardan bazılarının başka amaçlarla kullanılması, hücrenin penisilinleri atmasına izin verebilir [47]. Antibiyotik direnci, sağlık, veterinerlik ve tarım sektörlerinin yanı sıra yaşamın herhangi bir aşamasında insanları etkileme potansiyeline sahiptir. Bu da onu dünyanın en acil halk sağlığı sorunlarından biri haline getirmektedir.

Antibiyotikler, su ve kara ortamına farklı yollarla girebilir ve sık antibiyotik kullanımı 'kalıcı' bir organik kirletici olarak kalabilir [48]. Hayvanlarda antibiyotik kullanımı ise et, tavuk, yumurta, süt, bal ve balık gibi gıda maddelerinde antibiyotik kalıntılarının neden olabilmektedir. Bu ilaçların kalıntıları, insanlarda alerji, immünopatolojik etkiler, nefropati, hepatotoksisite, mutajenite, kanserojenite, kemik iliği toksisitesi, üreme bozuklukları ve hatta anafilaktik şok gibi çeşitli toksik etkilere yol açabilir [49]. Gıda maddelerinde bulunan antibiyotik kalıntılarının en sık görülen yan etkisi, son yıllarda ciddi bir uluslararası sorun haline gelen antimikrobiyal direncin gelişmesidir. Dirençli

bakteriyel patojenler besin zinciri yoluyla insana bulaşabilmekte ve antibiyotik tedavisinin etkisiz kalmasına neden olabilmektedir. Bakteri ve mantarların tehlikeli olması için her antibiyotiğe dirençli olması gerekmez. Tek bir antibiyotiğe direnç bile ciddi problemler anlamına gelebilir. Örneğin; ikinci ve üçüncü basamak tedavilerin kullanılmasını gerektiren antibiyotiğe dirençli enfeksiyonlar, organ yetmezliği gibi ciddi yan etkilere neden olarak hastalara zarar verebilir ve bakım ve iyileşmeyi bazen aylarca uzatabilir. Birçok tıbbi gelişme, eklem replasmanları, organ nakilleri, kanser tedavisi ve diyabet, astım ve romatoid artrit gibi kronik hastalıkların tedavisi dahil olmak üzere antibiyotik kullanarak enfeksiyonlarla savaşıma yeteneğine bağlıdır [50]. Bazı durumlarda, bu enfeksiyonların tedavi seçeneği yoktur. Antibiyotikler etkinliklerini kaybederse, enfeksiyonları tedavi etme ve bu halk sağlığı tehditlerini kontrol etme şansı ortadan kalkar. Her yeni antibiyotik sınıfının tanıtılmasından sonra ilaç direncinin ortaya çıkması ve tehdit yavaş bir ilaç geliştirme hattı ve yeni antibiyotik ajanların keşfi ve geliştirilmesine yapılan sınırlı yatırımla birleşir. Uluslararası, ulusal ve yerel antibiyotik yönetim kampanyaları, antibiyotiklerin ihtiyatlı kullanımını teşvik etmek ve gereksiz yere maruz kalmayı sınırlamak ve nihai hedef olarak ciddi ve yaşamı tehdit eden enfeksiyonlar için etkinliklerini korumak için geliştirilmiştir.

Antibiyotiğe dirençli mikroorganizmalar, gereksiz ve yüksek dozlarda antibiyotik kullanımına bağlı olarak ortaya çıkar. Avrupa Birliği'nin 2012 verilerine göre hayvansal tedavi amaçlı 1776.9 ton penisilin türevi üretilmiştir [51]. Hayvansal gıdalarda bulunması gereken üst sınır antibiyotik değerleri Avrupa Birliği tarafından beyan edilmiştir (Çizelge 2.1). Sütten bulunan penisilin grubu benzilpenisilin, amoksisilin, ampisilin için bu değer 4 µg/L iken; yine penisilin grubunda bulunan oksasilin, nafsilin, kloxacillin, dikloksasilin antibiyotikleri için bu değer 30 µg/L'dir [52].

Çizelge 2.1 Sütte bulunan maksimum kalıntı limitleri [52].

| Antibiyotik Sınıfı | Antibiyotikler  | Sütte bulunan maksimum kalıntı limitleri |  |
|--------------------|-----------------|--|--|
|                    |                 | EU<br>$\mu g - kg^{-1}$                  | Ulusal Gıda Kodeksi Komisyonu<br>$\mu g - kg^{-1}$ |
| $\beta$ -Laktamlar | Amoksilin       | 4  | 4  |
|                    | Ampisilin       | 4  | -  |
|                    | Cefazolin       | 50                                       | 4  |
|                    | Benzilpenisilin | 4  | 4  |

AB tarafından belirlenen antibiyotik üst sınır değerlerinin aşılması halk sağlığı için tehlike oluşturmaktadır. Gereksiz antibiyotik kullanımı ile dirençli mikroorganizmalar gelişerek insan sağlığını olumsuz etkiler. Bu yüzden, sütte bulunan antibiyotik kalıntılarının tespiti çok önemlidir.

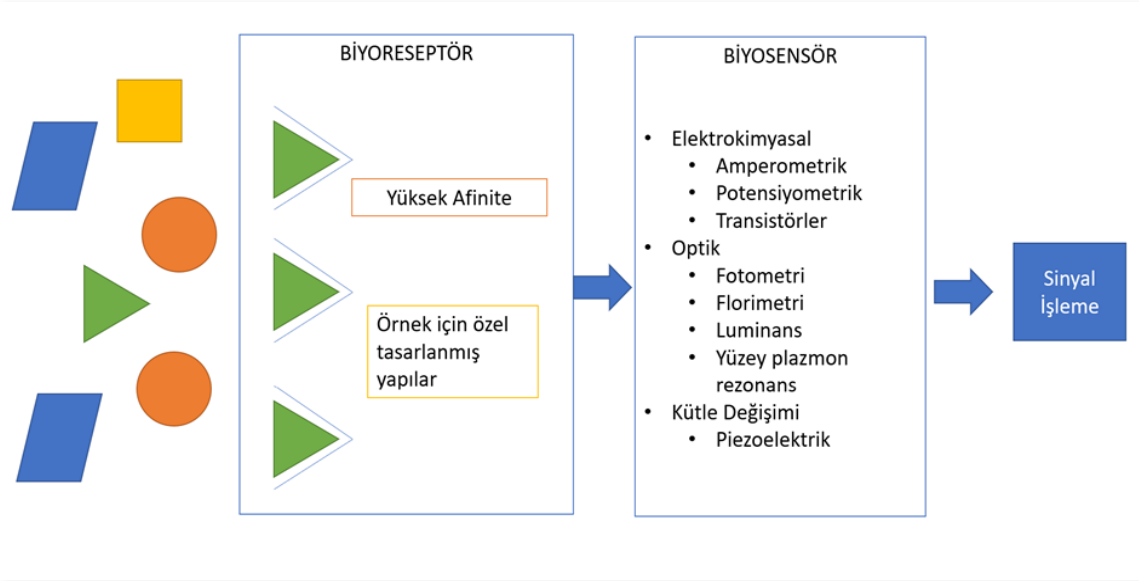
## 2.2. Antibiyotiklerin tayin yöntemleri

Antibiyotiklere maruziyeti kısıtlamayı hedefleyen protokoller sonucu antibiyotik tayinin önemi ortaya çıkmıştır. Şimdiye kadar, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), enzim bağlantılı immünosorbent tahlili (ELISA) ve sensör gibi antibiyotik tespiti için birçok analitik yöntem rapor edilmiştir [53]. Bununla birlikte, bu yöntemlerin uygulanması genellikle düşük seçicilik, yüksek zaman tüketimi ve pahalı aparat gereksinimi nedeniyle sınırlıdır. Sensör sistemleri, yüksek hassasiyet, hızlı tepki verme, kolay minyatürleştirme ve düşük fiyat avantajları ile antibiyotik tespiti için uygun yöntemler haline gelmiştir. Gıda ve biyolojik numunelerde antibiyotik kalıntılarının tespit ederken, biyosensörler basit tahlil ile sadece yüksek özgüllük ve hassasiyet avantajlarını sürdürmekle kalmaz, aynı zamanda taşınabilir olmaları nedeniyle kullanışlıdır. Bu nedenle, sensörler, antibiyotik kalıntılarının gerçek zamanlı izlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Sensör cihazı, temel olarak hedefin seçici olarak tanımlanması için bir tanıma elemanı ve sinyal dönüştürme ve amplifikasyon için bir dönüştürücü içerir.

Sensördeki moleküler tanıma elemanları olarak reseptörler, analitlere spesifik olarak bağlanabilir, böylece sensör seçiciliğinin önemli performansını da belirleyen yüksek düzeyde spesifik algılama ile sonuçlanabilir. En yaygın biyolojik reseptörler, antikorlar [54], moleküler olarak baskılanmış polimerler (MIP'ler) [55] ve nükleik maddeler gibi biyolojik tanıma yeteneğine sahip organik maddelerdir [56]. Ek olarak, hücreler veya organizmalar da dahil olmak üzere biyolojik sistemler [57] de spesifik tanıma elemanları olarak rapor edilmektedir. Seçiciliğin yanı sıra duyarlılık, sensör performansının bir diğer önemli göstergesidir. Hassas algılama elde etmek için, antibiyotik sensörleri oluşturmak için moleküler biyoteknoloji, enzim katalizli reaksiyonlar ve nanomalzemeler dahil olmak üzere çeşitli sinyal amplifikasyon stratejileri de kullanılmıştır. Bunlar arasında nanomalzemeler, iyi termal iletkenlik, mükemmel mekanik mukavemet ve kararlılık, yüksek spesifik yüzey alanı, fantastik fotoelektrik özellikleri ve üstün elektronik iletkenliği nedeniyle çok dikkat çekmiştir [58-60]. Nanomalzemeler, çeşitli sensör türlerinin sinyallerini önemli ölçüde yükseltmekle kalmaz, aynı zamanda yüksek spesifik yüzey alanı nedeniyle analit ve reseptör arasındaki etkileşimi de geliştirir. Algılama uygulamalarında nanomalzemelerin büyük potansiyeli göz önüne alındığında, giderek daha fazla çalışma sensörlerde uygulamalarını bildirmektedir.

Bir sensörün en önemli bileşenlerinden biri, hassas ve seçici bir algılama süreci sağlayabilen tanıma elemanı veya reseptördür (Şekil 2.2). Sensörler, biyolojik örnekleri tespit eden, biyolojik ve fizikokimyasal bileşenlerden oluşan analitik cihazlardır [61]. Biyolojik reseptörler (enzimler, makromolekül ya da antikor) örneği tanıyan ve örnek ile etkileşime geçen kısımdır. Fizikokimyasal kısım örneğin derişimine bağlı olarak oluşan etkileşimleri sinyale çeviren birimdir. Çıkan sinyal çevirici birimin türüne (elektrokimyasal, termal, optik ve piezoelektrik) bağlı olarak elde edilir [62].





Şekil 2.2 Sensörün tanıma elemanları.

Klinik çalışmalarda, gıda analizlerinde ve çevre uygulamalarında kullanılan sensörlerin düşük maliyetli olmaları ve kullanım kolaylığı sağlamaları beklenir. Biyosensörlerin tercih nedenlerinden biri analizlerin eş zamanlı izlenebilmesidir. Antibiyotik sensörlerinde kullanılan antikor, aptamer, DNAzim, moleküler baskılanmış polimerler ve hücre gibi farklı reseptör türleri vardır. Monoklonal ve poliklonal antikorlar, yüksek özgüllükleri ve seçicilikleri nedeniyle antibiyotiklerin taranmasında en yaygın olarak kullanılan tanıma elemanlarıdır. İnsan ve fareden elde edilen ana immüoglobulin (Ig) türleri arasında IgA, IgD, IgE, IgG ve IgM bulunur. IgG, serumdan ekstrakte edilebilen en bol antikor izotipidir. Dört sabit ve iki değişken alanlı iki ağır zincir ve iki hafif zincirden oluşur [63]. IgG oksitetrasiklin [64], sülfonamid [65], enrofloksasin [66], monensin [67], kinolonlar [68], tilozin ve tilikosin [69] gibi çeşitli antibiyotiklerin saptanması için yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, IgY, immünoassay [70] geliştirmek için de kullanılabilir. Antikor bazlı antibiyotik sensörleri her zaman diğer antibiyotiklerle çapraz reaksiyona girer ve bu da yanlış nicelemeyle sonuçlanır. Bu nedenle, diğer reseptör türlerini keşfetmek bu sorunu çözmek için önemlidir. Aptamerler, biyolojik işlem yerine kimyasal işlemle üretilen tek sarmallı oligonükleotitlerdir. Bu nedenle, seriden seriye değişkenlik potansiyeli ve antikor üretimi sırasında viral veya bakteriyel kontaminasyon sorunu önlenir. Aptamer sentezi için spesifik bir moleküler sekansın seçilmesi için tipik yöntem, ligandların üstel zenginleştirme (SELEX) ile sistematik evrimi olarak adlandırılır. SELEX işlemi, farklı dizilere sahip büyük bir kütüphaneden bir oligonükleotidin çoklu seçim ve amplifikasyon döngülerini kullanır.

Kütüphane, spesifik hedef ile inkübe edilir ve aptamer-hedef kompleksleri, bağlayıcı olmayan dizilerden ayrılır. Seçilen oligonükleotitler, PCR veya RT-PCR (DNA aptamerleri durumunda) ve RNA transkripsiyonu (DNA aptamerleri durumunda) ile amplifiye edilir. Seçim döngüsü, yüksek afiniteli nükleik asitleri hedef moleküle doğru zenginleştirmek için birçok kez tekrarlanır [71]. Aptamerler, geleneksel antikorlarla karşılaştırıldığında, daha düşük üretim maliyeti, daha küçük boyut, daha düşük immünojenisite, daha kolay modifikasyonlar, daha yüksek kararlılık ve hedefe yönelik daha yüksek veya eşit seçicilik ve afinite gibi çeşitli avantajlara sahiptir [72]. DNAzimler veya deoksiribozimler, protein enzimleri gibi katalitik aktiviteye sahip nükleik asitlerdir [73]. Yüksek katalitik aktiviteye ek olarak, kofaktörlere karşı yüksek özgüllüğe, yüksek kararlılığa, düşük maliyete ve kolay sentez ve modifikasyona sahiptirler. Yaygın bir DNAzim türü, G-dörtlü DNAzimler olarak bilinen G açısından zengin problemlerdir.  $K^+$  varlığında hemine bağlandıklarında peroksidaz taklit eden aktivite sergilerler. Yaban turpu peroksidaz konjugatları gibi ek kararsız reaktiflere ihtiyaç duyulmaması nedeniyle kolorimetrik testler geliştirmek için artan bir popülerlik kazanmıştır [74].

Moleküler baskılanmış polimerler, hedef analite karşı antikor benzeri afinite ve seçicilik nedeniyle çekici tanıma elemanlarıdır. Monomerlerin ve çapraz bağlayıcının bir kalıp mevcudiyetinde polimerizasyonunu içeren moleküler baskılama tekniği kullanılarak işlenirler. Kalıp polimerden çıkardıktan sonra, hedef molekül (yani kalıbı) yüksek seçicilikle tanımak için spesifik bağlanma yerleri olarak işlev gören tamamlayıcı boşluklar oluşturulur [75]. MIP'ler, güçlü mekanik özelliklere ve yüksek sıcaklıklara ve basınçlara karşı mükemmel dirence sahiptir. Bu da onları sensör gelişimi için uygun malzeme haline getirir [76]. Ayrıca, MIP'lerin kromatografi ve moleküler baskılanmış katı faz ekstraksiyonu için ayırma ortamı olarak geniş uygulamaları vardır [77]. Son yıllarda, MIP'ler yiyecek örneklerinde farklı antibiyotiklerin tespiti için hem optik hem de elektrokimyasal sensörlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Optik sensörler söz konusu olduğunda, çalışmaların çoğu MIP tabanlı floresan sensörlere odaklanmıştır. Metal ve manyetik nanopartiküllerin MIP'ye dahil edilmesi, geleneksel MIP'lere kıyasla daha yüksek bağlama kapasitesi, daha hızlı bağlama kinetik ve dönüştürücü yüzeyine daha kolay bağlantı sağlar.

Şimdiye kadar, antibiyotik kalıntılarının hızlı ve hassas tespiti için nanomalzemelerin (elektrokimyasal, floresan ve yüzey plazmon rezonans gibi) sinyal güçlendirmesine

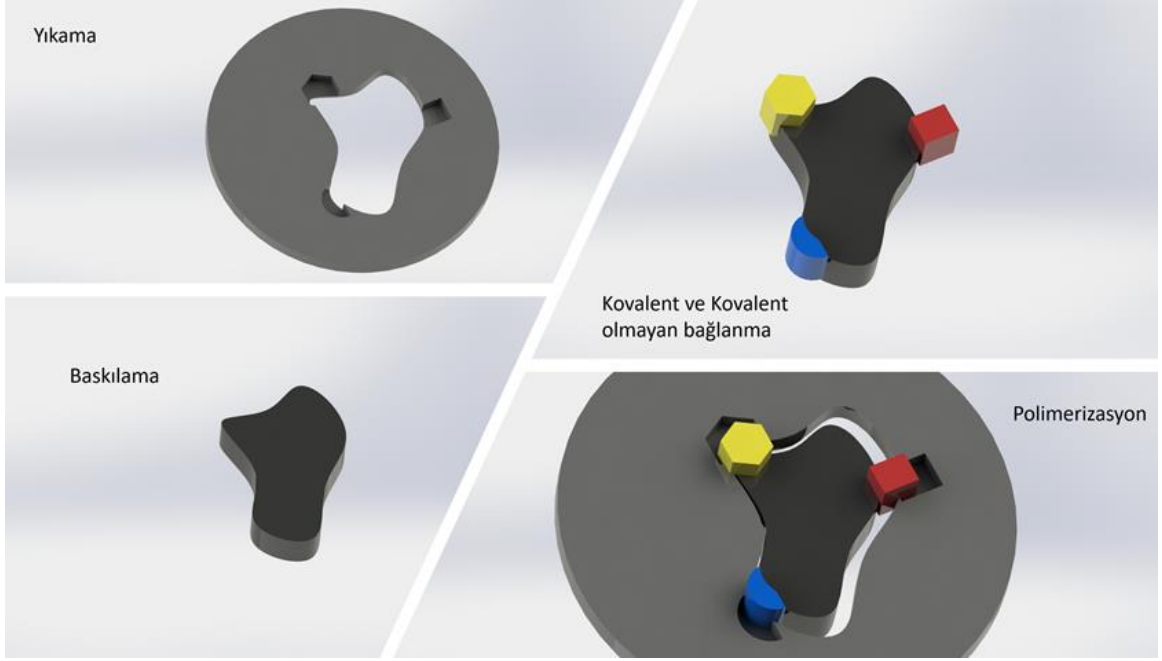
dayalı çeşitli sensörler geliştirilmiştir. Yüzey plazmon rezonansı (SPR), elektronlar ve fotonlar tarafından etkileşebilen iki bileşen arasında kenarda meydana gelen salınımlara dayanan yaygın olarak kullanılan optik tekniklerden biridir [78]. SPR uygulamasının diğer optik yöntemlere göre 2,5 kat daha üstün olduğunu belirtmekte fayda vardır. SPR, sağlamlığı, yanıtındaki duyarlılığı, hızlı analiz için uygulanabilirliği, tutarlılığı ve maliyet etkinliği nedeniyle birincil seçimdir. SPR, metal yüzeye bağlanabilen dielektrik kırılma indisine (RI) karşı çok hassastır. Bu arada, RI malzemelerin içsel karakteridir. Metale entegre edilmiş herhangi bir dielektrik fark edilebilir. Bu nedenle, bu prensibe dayanarak, SPR tabanlı sensörler genellikle metal yüzeyinde enzim, antikor ve nükleik asit gibi çeşitli biyomolekülleri birleştirir [79]. Moleküller, SPR bağlama reaksiyonu ile elde edilen değerlere güvenerek doğrudan tanımlanabilir. Son on yılda, SPR tabanlı sensörler, sıkıştırılmış tasarımları, tahlil maliyetleri ve gerçek-zamanlı ve etiketsiz analizi anlama yetenekleri nedeniyle antibiyotik tespitinde büyük önem kazanmıştır.

### **2.3. Moleküler baskılama tekniği**

Hedef molekül için özgül bağlanma bölgelerine sahip malzemelerin hazırlanmasında kullanılan yöntemlerden biri moleküler baskılamadır. Moleküler baskılanmış polimerler hedef moleküle yüksek seçicilik gösterir. Polimerik yapıda hedef molecule şekil, büyüklük ve geometrik yapı bakımından benzeyen hafıza bölgeleri oluşturulur.

Moleküler baskılanmış polimerleri (MIP) hazırlarken birinci basamağında hedef molekülü etkileşen monomer(lerin) kullanılarak bir ön-kompleks hazırlanır. Daha sonra uygun çapraz bağlayıcı(lar) varlığında polimerizasyon işlemi başlar ve son olarak bir desorpsiyon çözeltisi ile hedef molekül polimerden uzaklaştırılır. MIP'lerin hazırlanması basit, düşük maliyetli, kararlı ve seçicidir. Farklı pH ve sıcaklıklarda yapılarını koruyabildikleri gibi tekrar tekrar kullanılabilirler [80,81].

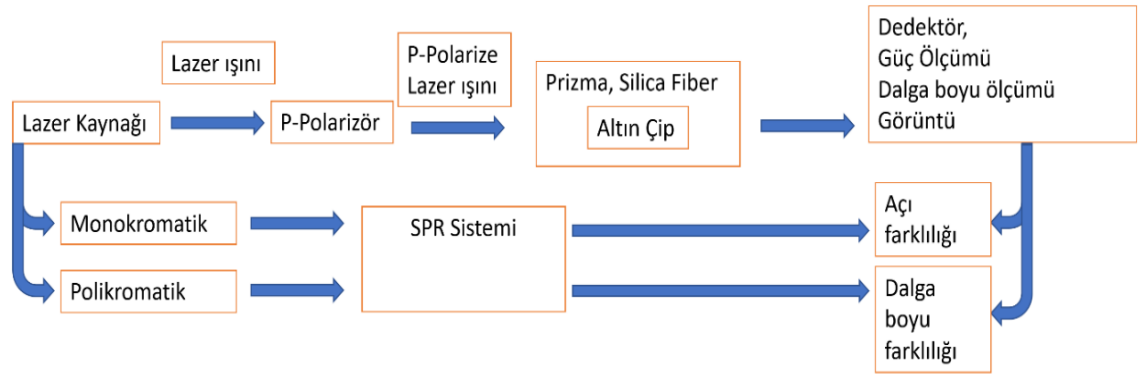
Hedef molekül, kovalent, kovalent olmayan, ya da ligand-aracılı metal etkileşimler sayesinde fonksiyonel gruplar ile etkileşerek baskılanacak molekül ile fonksiyonel monomer arasında kompleks oluşur [82]. Baskılanan molekül yıkama ile uzaklaştırılır. Polimer matrikste fonksiyonel grupları içeren spesifik boşluklar kalır. Sonrasında hedef molekül bu spesifik boşlukları tanır [83,84]. Şekil 2.3'te moleküler baskılama yöntemini şematize etmektedir.



Şekil 2.3 Moleküler baskılama yönteminin basamakları.

#### 2.4. Yüze plazmon rezonans

Yüze plazmon rezonans (SPR) sensörleri farklı ölçüm yöntemlerine sahip gerçek zamanlı ölçüm lazer-optik temelli cihazlardır. SPR cihazlarının ölçüm metodolojileri temel olarak lazer kaynaklarının cinsi ve kullanılan dedektör sistemlerine göre değişiklik gösterebilir (Şekil 2.4).

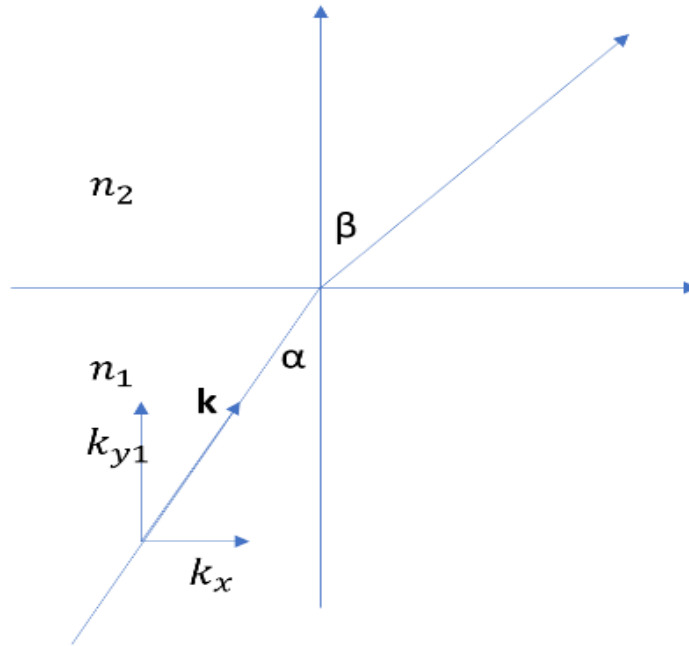


Şekil 2.4 SPR sensörlerin temel çalışma prensibi.

Biyomolekül etkileşimlerin incelenmesi ilk olarak 1983 yılında Liedberg ve grubu tarafından beyan edilmiştir [85]. SPR bir film ile ayrılmış ve iki farklı kırılma indisine sahip metal ve dielektrik ortamdaki dalga boyunda gönderilen ışığın metal yüzey ile etkileşmesi sonucu oluşur. Gönderilen ışığın bir kısmı yansımaya uğrar ve dedektör

tarafından ölçülür. Işığın diğer kısmı ise sensör yüzeyindeki metal atomları ile etkileşir ve plazmon metal yüzey ile dielektrik kısmın sınır noktasında oluştuğundan bu yüzeyde oluşan değişikliklere karşı hassas olması analitik uygulamalar için avantaj sağlar [86].

Monokromatik lazer kaynakları tek dalga boylu ışığa yapan, sayısal açıklık (NA) ve dalga boyu gibi fiziksel parametreleri olan kaynaklardır. Lazer ışığı 3-boyutlu bir düzlemde yayılır. Yönü  $k$  dalga vektörü ile belirlenir. Işığın yayılım yönüne dik her iki düzlemde sinüsoidal dalga formunda olması ve dolayısıyla lazer kaynaklarından çıkan ışınların polarize olmayan bir formda oluştuğu söylenebilir. Yüzey plazmonunun oluşması için yüzey yük yoğunluğunun  $P$  düzleminde gerçekleşen polarizasyon işlemi ile yüzey üzerindeki elektriksel alana dik olması gerekmektedir. S polarizasyonu altın çip üzerinde plazmon oluşturmadan tam yansıma yapacaktır. Snell yasası ile gelen ışığın  $n_1$  kırılma indisine ait bir ortamdan  $n_2$  kırılma indisine ait bir ortama geçişinin ve oluşabilecek tam yansımaların açıklaması yapılabilir (Şekil 2.5).

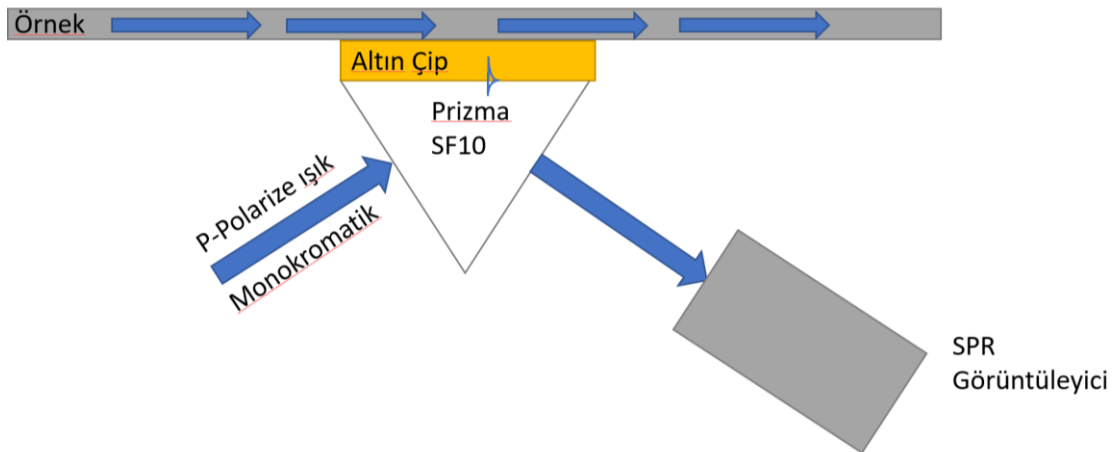


Şekil 2.5 Snell yasasının gösterimi.

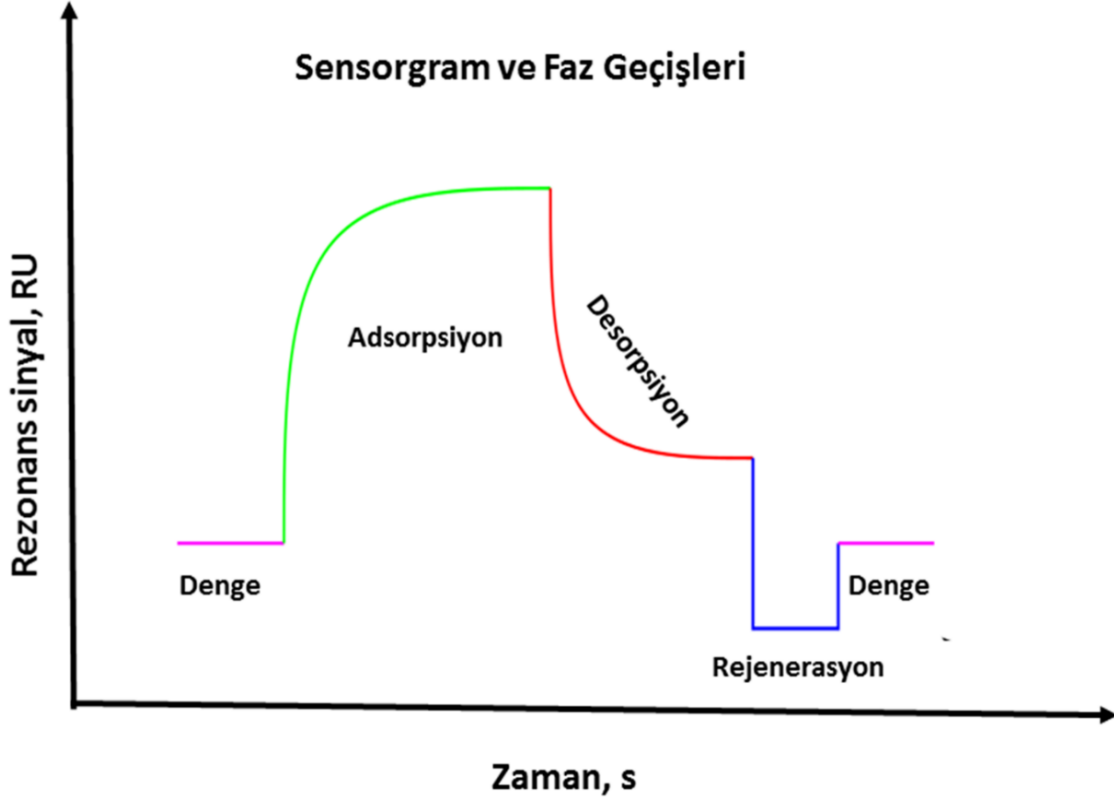
Plazmon frekansı ve dispersiyon denklemleri ortamlara bağlı plazmon frekansı ile ilişkili yüzey plazmonları uyarılma durumunu belirtir. Bulunan ortamın dielektrik katsayısı oluşan yüzey plazmon frekansını etkiler. Yüzey plazmonunu oluşumu ve örneklerin bağlanma durumundaki kırılma indisindeki değişimler neticesinde sistemin kinetik analizleri ile birlikte bağlanan etkileşimlerin saptanma işlemi gerçekleştirilir. Sensör

yüzeyinde tespit edilmek istenen hedef molekülün yüzey ile etkileşmesi söz konusu olursa ışığın kırılma indisi değişikliğe uğrar ve bu da açının değişikliğe uğramasına neden olur. Zamana (genellikle saniye) bağlı olarak bu açılarda gerçekleşen değişimler eş-zamanlı olarak izlenerek kinetik analizler gerçekleştirilir. Biyomolekül-biyomolekül etkileşimleri gerçek-zamanlı gözlemlenmesi ile elde edilen sensorgramlardan afinite sabitlerinin saptanması da kolaydır ve herhangi bir işaretleyici moleküle ihtiyaç yoktur. Böylece düşük tayin aralıklarında analiz yapılabilirken analiz süresinin kısalması sağlanabilir.

Kretschmann yapısı en çok tercih edilen prizmadır. Şekil 2.6'de gösterildiği gibi iç kırınım oluşması sonucu meydana gelen elektron salınımları mevcuttur. Bununla birlikte gelen ışığın bir kısmının absorbe edilmesiyle yüzeyde oluşan plazmon yine şekildeki gibi gözlenir. Şekil 2.7 ise SPR ile analiz sonucu oluşan sensorgram sürecini ifade eder. Metal filmde plazmon oluşumunu sadece p-polarize ışık sağlayabilir. S-polarize ışık ise metal filme paralel oluşması sebebiyle yüzeyde plazmon oluşturamaz [87].

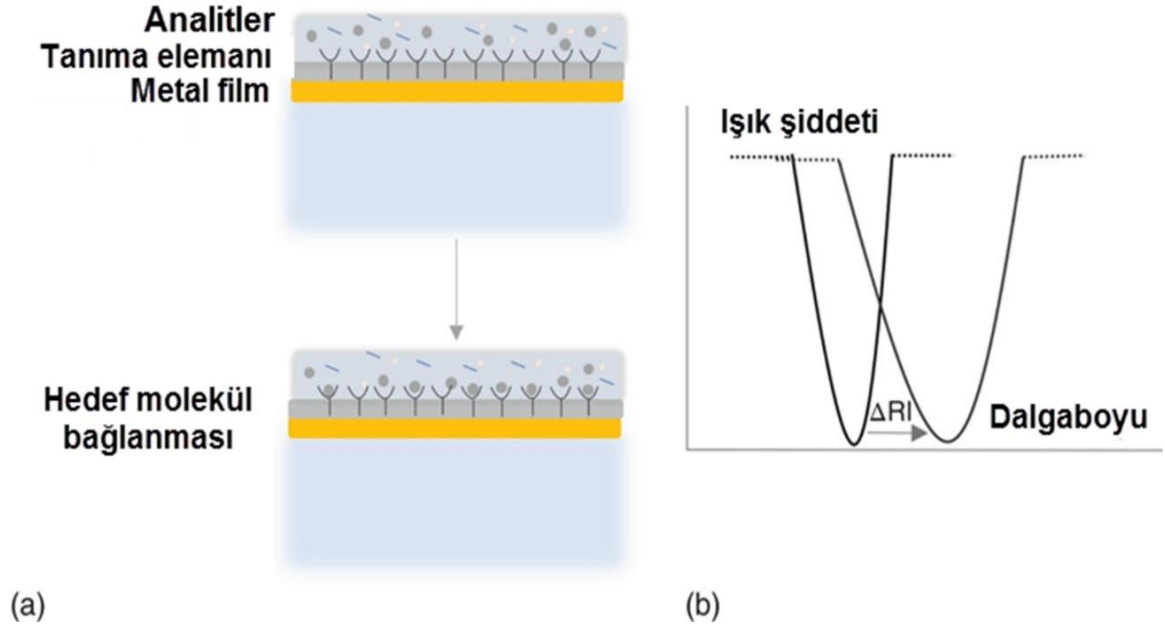


Şekil 2.6 Dielektrik sınırlarda meydana gelen iç kırınım.



şekil 2.7 SPR sensöründen elde edilen sensorgram.

Optik temelli sensörlerin bir sınıfı olan plazmonik sensörler hedef molekülün etkileşime girdiği tanıma elemanlarını kapsayan metal veya metal-dielektrik yapıların bulunduğu destek malzemelerinden oluşurlar [88]. Analit çözeltisi sensöre verildiğinde hedef molekülün yüzeydeki alıcı ile yakalanır ve tanıma elemanı kırılma indisinde değişikliğe sebep olur. Kırılma indisindeki değişiklik şekil 2.8 gösterilmektedir.



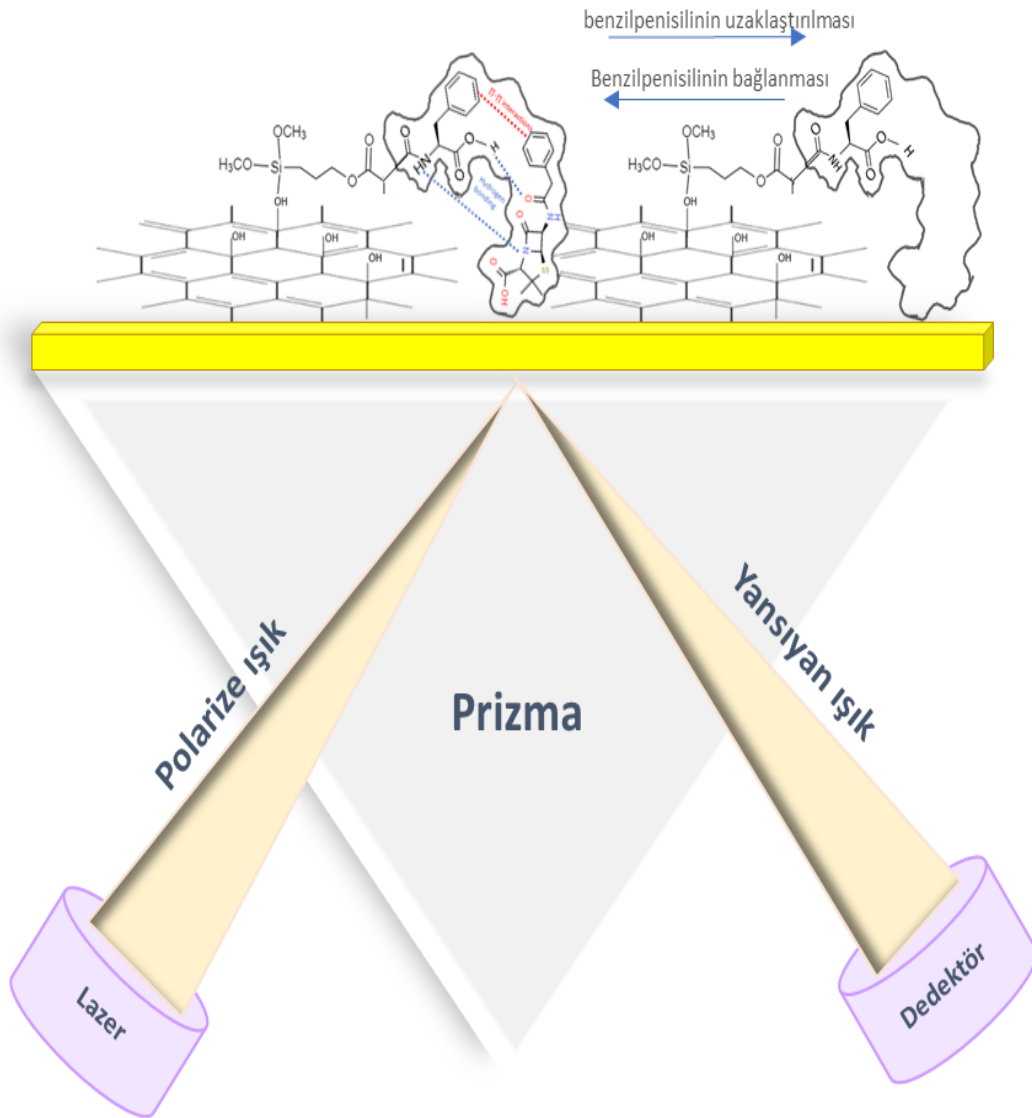
Şekil 2.8 Plazmonik sensörlerin çalışma şekli. Hedef molekülün tanıma elemanlarına bağlanması (a) ve analit ile etkileşen sensör yüzeyindeki RI artışına bağlı olarak spektrumda meydana gelen değişiklik (b).

Grafen, karbon atomlarının yanal ekseninde  $\sigma$ -bağları ile bağlandığı ve yarı dolu  $\pi$  orbitalinin elektronların delokalizasyonunun sağlandığı, altıgen olarak düzenlenmiş  $sp^2$ -hibritleşmesine sahip karbon ağından oluşmaktadır. Grafen, mükemmel termal iletkenliğe, olağanüstü elektron hareketliliğine, yüksek teorik spesifik yüzey alanına ve yüksek mekanik mukavemete sahiptir [89]. Birçok araştırma grubu, günümüzde grafenin kimyasal ve fiziksel özelliklerini incelemekte olup, grafenin çeşitli alanlardaki uygulamalarını (alan etkili transistörler, sensörler, şeffaf iletken filmler, tuzdan arındırma membranları, güneş pilleri vb.) çalışmaktadır. Grafen üretiminin en popüler yöntemlerinden biri kimyasal indirgemedir. Bu teknikte, grafit önce oksitlenerek grafit oksit tozu üretilir. Grafitin kimyasal oksidasyonu ilk olarak 1859'da İngiliz kimyager B. C. Brodie tarafından rapor edilmiştir. Brodie, nitrik asitli ( $HNO_3$ ) grafiti oksitlemek için "potasyum klorat" ( $KClO_3$ ) kullanmıştır [90].

Bu tez çalışmasında, moleküler baskılama tekniği kullanılarak yüzey plazmon rezonans temelli sensör ile hem sulu çözeltilerden hem de süt örneklerinden hassas ve seçici benzilpenisilin tespiti yapılmıştır. Bunun için benzilpenisilin baskılanmış GO içeren poli (hidroksietil metakrilat)-grafen oksit-N-metakriloil-L-fenilalanin (MIP-GO) SPR sensör hazırlanmıştır. Eklenen GO'in yüzey plazmon rezonans sinyali



üzerine etkisini anlamak amacıyla GO içermeyen MIP SPR sensör kontrol deneyi olarak tasarlanmıştır. Baskılama verimliliğini incelemek için benzilpenisilin baskılanmamış GO içeren (NIP-GO) SPR sensör, benzilpenisilin molekülü eklenmeden aynı polimerizasyon reçetesi ile sentezlenmiştir. Şekil 2.9’da MIP-GO SPR sensörünün benzilpenisilin için adsorpsiyon-desorpsiyon işleminin şematik gösterimi görülmektedir.



Şekil 2.9 MIP-GO SPR sensörün benzilpenisilin için adsorpsiyon-desorpsiyon işleminin şematik gösterimi.

### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Kimyasal malzemeler

Hassasiyeti artırmak ve tayin limitini düşürmek amacı ile sinyal artırıcı olarak kullanılan grafen oksitler (GO) Grafen-Supermarket'ten temin edilmiştir. Benzilpenisilin ile kompleks yapıcı hidrofobik N-metakriloil-(L)-fenilalanin (MAPA) fonksiyonel monomer, Nanoreg firmasından satın alma yoluyla temin edilmiştir. Göreceli hidrofilisite sağlayan, 2-hidroksietilmetakrilat (HEMA) monomeri, azoizobisbütironitril (AIBN) polimerizasyon başlatıcısı, etilenglikol dimetakrilat (EDMA) çapraz bağlayıcı, benzilpenisilin sodyum tuzu, yarışmacı olarak kullanılan amoksisilin ve ampisilin antibiyotikleri Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından satın alınmıştır. SPR yüzeyler (SPR-1000-050, GWC) Genoptics tarafından temin edilmiştir. Diğer kimyasalların hepsi analitik saflıkta olup Merck (Darmstadt, Almanya) tarafından alınırken, gerçek örnek olarak analiz edilen süt örneği lokal marketten satın alınmıştır. Deneylede kullanılan deiyonize su 18 MΩ/cm'dir.

#### 3.2. MIP-GO, NIP-GO ve MIP SPR sensörlerin modifikasyonu

MIP-GO ve NIP-GO sensörlerin hazırlanmasında kullanılan GO'in yüzeyine polimerleşmede kullanılacak vinil gruplarının takılması için silanlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 50 µL GO (5 g/L stok grafen oksit çözeltisi) ve 50 µL TMSPM çözeltisi (50% TMSPM, 50% metil alkol) 3 saat süresince rotatörde döndürülerek etkileştirilmiştir. GO içermeyen MIP SPR sensörde ise 50 µL hazırlanan TMSPM çözeltisi (50% TMSPM, 50% metil alkol) GO eklenmeden çip yüzeyi ile etkileşime sokulmuştur.

#### 3.3. MIP-GO ve NIP-GO SPR sensörlere GO-TMPSM'nin ve MIP SPR sensöre TMSPM'nin bağlanması

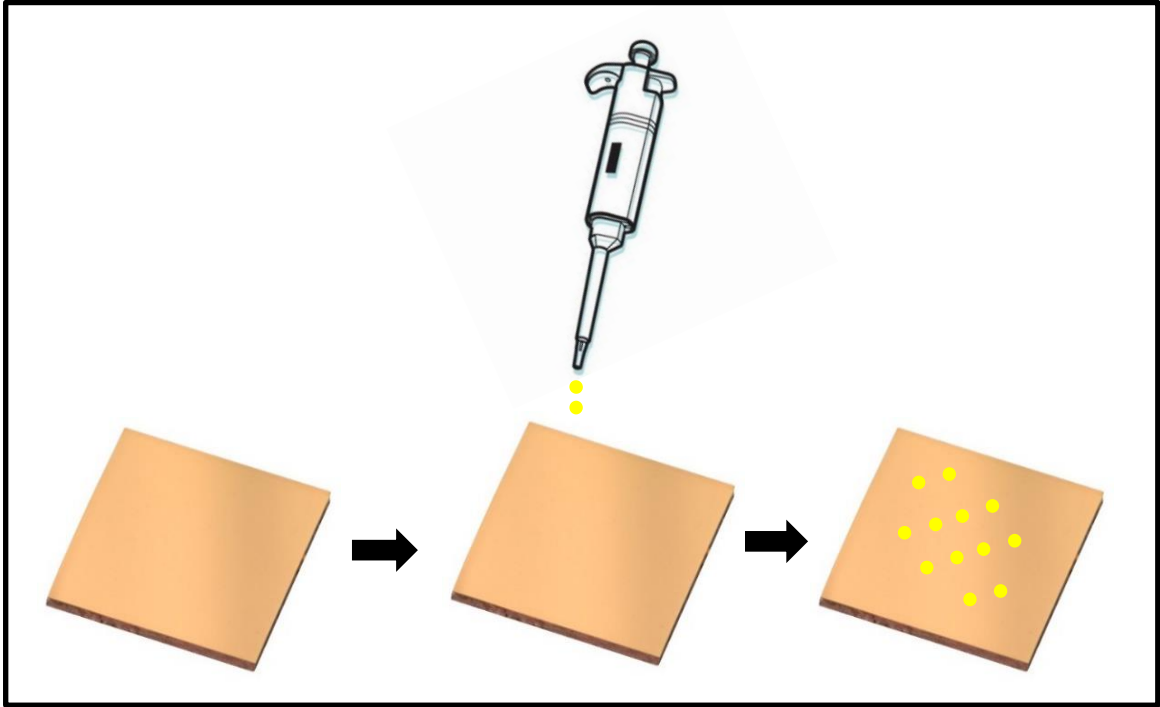
SPR sensör olarak hazırlanacak çiplerin yüzeylerini temizlemek için 10 mL asidik pirana çözeltisi (3:1 v/v: konsantre H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; %30 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) hazırlanmış ve çipler bu çözelti ile yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra SPR sensör çip yüzeyinden saf etil alkol geçirilmiş ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. Altın yüzeye vinil grubu takılmış GO'in bağlanması için hazır hale getirilmiştir. Hazırlanan GO-TMSPM karışımından, yüzeyi temizlenmiş

ve kurutulmuş çip yüzeyine 20 µL damlatıldıktan sonra 30 saniye süreyle spin kaplayıcıda döndürülmüştür. Sensör çip yüzeyinde ince film şeklinde dağıtılması sağlanmıştır. 2 saat boyunca kovalent etkileşim için bekletilen SPR yüzey, etil alkolle yıkandıktan sonra etkileşmeyen GO-TMSPM grupları uzaklaştırılmıştır. MIP SPR sensörde ise aynı protokol takip edilerek bu sefer GO içermeyen TMSPM çözeltisinden 20 µL sensör çip yüzeyine damlatılmıştır. Daha sonra etil alkol ile yıkanan çipten bağlanmayan TMSPM grupları uzaklaştırılmıştır.

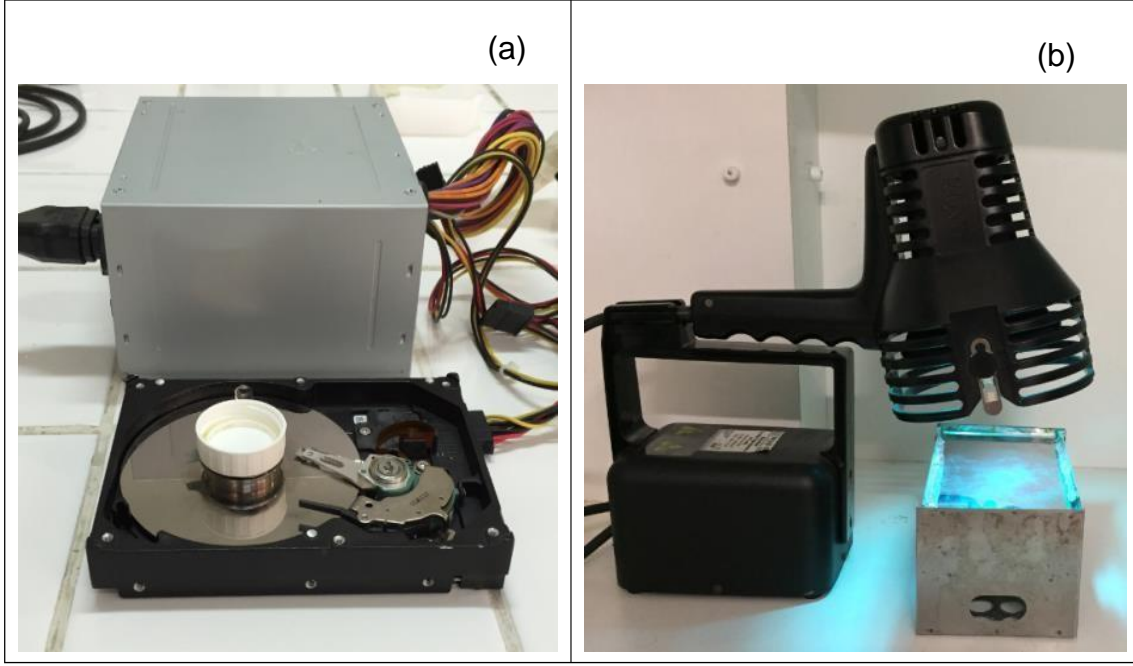
### **3.4. MIP-GO, NIP-GO ve MIP SPR sensörlerin hazırlanması**

Benzilpenisilin baskılanmış GO içeren MIP-GO ve GO eklenmeden hazırlanan benzilpenisilin baskılanmış MIP SPR sensörlerin yüzeyindeki nanofilmlerin hazırlanabilmesi için öncelikle MAPA/benzilpenisilin ön-kompleksinin hazırlanması gerekmektedir. Bu amaçla hidrofobik MAPA fonksiyonel monomeri benzilpenisilin ile koordinasyon yapıcı monomer olarak kullanılmış ve MAPA/benzilpenisilin ön-kompleksi oluşturulmuştur. SPR sensör çip yüzeyine bağlanan GO ise sinyal ve hassasiyet artırıcı olarak kullanılmıştır. Benzilpenisilin ile kompleksleşecek fonksiyonel MAPA monomerinin 35 µL'si (0.01 mmol), 3.56 mg benzilpenisilin (0.01 mmol) ile 1 saat süresince etkileştirilip (1:1, MAPA:benzilpenisilin) MAPA/benzilpenisilin ön-kompleksi oluşturulmuştur. NIP-GO SPR sensör için MAPA monomeri benzilpenisilin ile ön-kompleks oluşturulmadan polimerizasyon için hazırlanacak monomer karışımına eklenmiştir. MIP-GO, NIP-GO ve MIP SPR sensör yüzeylerinde nanofilmlerin oluşturulması için ilk olarak monomer karışımı oluşturulmuştur. Bunun için, HEMA (0.01 mmol) monomeri ve EDMA (0.04 mmol) çapraz bağlayıcısı MIP-GO ve MIP SPR sensörleri için daha önce oluşturulmuş MAPA/benzilpenisilin ön-kompleksine eklenirken, NIP-GO SPR sensörü için MAPA monomerine eklenmiştir. Benzilpenisilin baskılanmış MIP-GO, baskılanmamış NIP-GO ve GO içermeyen MIP SPR sensörler için herbir çip yüzeyine başlatıcı olarak 1.5 mg AIBN içeren 10 µL polimer çözeltisi damlatılmıştır. SPR çipler polimerleşmek için 1 saat süreyle UV ışığı altına bırakılmıştır. 10 mM NaCl çözeltisi benzilpenisilin hedef molekülünü polimerik yapıdan uzaklaştırmak için kullanılmıştır. Bu amaçla benzilpenisilin baskılanmış MIP-GO, benzilpenisilin baskılanmamış NIP-GO ve MIP SPR sensörler 20 mL desorpsiyon çözeltine konularak çalkalamalı banyoda hedef molekülün uzaklaşması sağlanmıştır. Desorpsiyonun tamamlanması işlemi UV-VIS spektrofotometrede 291 nm'de absorbans vermeyinceye

kadar takip edilmiştir. Sonuç olarak MIP-GO ve MIP SPR sensörler için MAPA/benzilpenisilin ön-kompleksi kullanılırken, baskılanmamış NIP-GO SPR sensörün hazırlanması için kullanılan yöntem, MIP-GO SPR sensörün hazırlandığı yöntem ile aynı olup benzilpenisilin eklenmeden uygulanmıştır. GO eklenmeyen benzilpenisilin baskılanmış MIP SPR sensör aynı şekilde MIP-GO SPR sensörün hazırlandığı yöntemle GO eklenmeden hazırlanmıştır. Şekil 3.1 MIP-GO, NIP-GO ve MIP SPR sensörler hazırlanırken çip yüzeyinde polimerik nanofilm sentezlemek için hazırlanan monomer karışımının çip yüzeyine damlatılmasını şematize eder. Şekil 3.2’de sensör yüzeyindeki nanofilmin hazırlanması sırasında kullanılan spin kaplayıcı ve UV lambası gösterilmiştir.



Şekil 3.1 SPR altın çip yüzeyinde nanofilm oluşumunun şematik gösterimi.



Şekil 3.2 MIP-GO, NIP-GO ve MIP SPR sensörlerin elde edilmesinde kullanılan spin kaplayıcı (a) ve UV lamba (b).

### 3.5. MIP-GO, NIP-GO ve MIP SPR sensörlerin karakterizasyon çalışmaları

#### 3.5.1 Fourier dönüştümlü kızılötesi (FTIR) spektrofotometresi

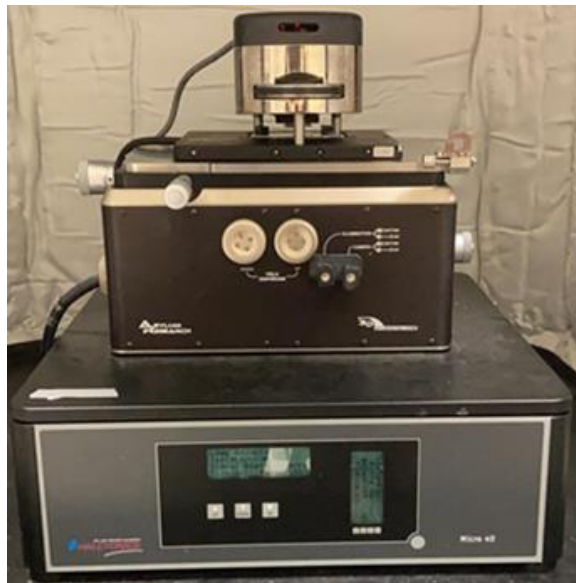
Benzilpenisilin baskılanmış MIP-GO, baskılanmamış NIP-GO SPR sensörlerin hazırlanması aşamasında kullanılan GO'in, silanlama ajanı olarak kullanılan TMSPM ile gerçekleşen reaksiyonun sonucu elde edilen GO-TMSPM kompleksinin karakterizasyonu FTIR spektrofotometresi (Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS10) ile gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, benzilpenisilin baskılanmış MIP-GO, baskılanmamış NIP-GO ve GO eklenmemiş MIP SPR sensörleri oluşturan (poli-hidroksietil metakrilat-N-metakriloil-(L)-fenilalanin) temelli nanofilmlerin fonksiyonel grup karakterizasyonu aynı şekilde FTIR spektrofotometresi (Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS10) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.3'te cihazın görüntüsü mevcuttur. Ayrıca polimerleştirilen örnekler vakum etüvünde kurutulduktan sonra analiz edilmiştir. %2 örnek %98 KBr ile karıştırılmış ve hidrolik preste 600 kg/cm basınç ile 120 saniye bekletilerek tablet haline gelmesi sağlanmış ve 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  dalga sayısı aralığında spektrumları elde edilmiştir.



Şekil 3.3 FTIR spektrofotometre cihazının görüntüsü.

### 3.5.2. Atomik kuvvet mikroskobu (AFM)

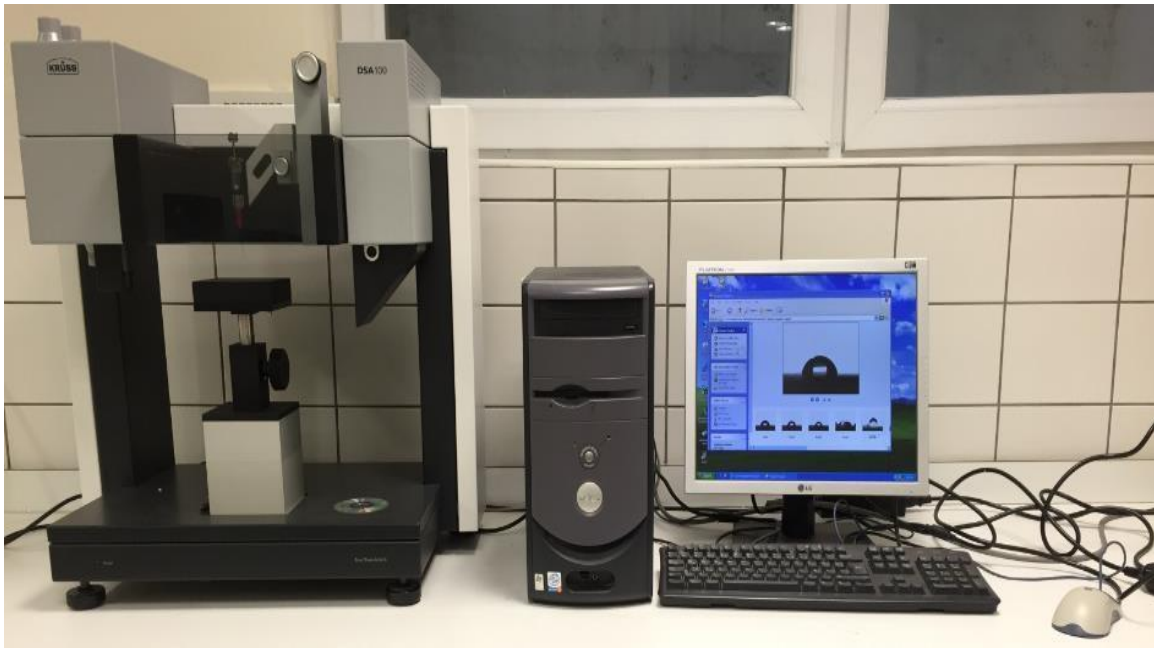
Modifiye edilmemiş boş SPR yüzey, benzilpenisilin baskılanmış MIP-GO, baskılanmamış NIP-GO ve GO eklenmemiş MIP SPR sensör yüzeylerinin karakterizasyonu yarı değen modda serbest kantileverli interferometre özelliği ile belli bir piksel çözünürlükte ölçüm alan AFM (Veeco MultiMode V) ile gerçekleştirilmiştir. Ölçümler tarama hızı 2  $\mu\text{m/s}$  ile ve 5 x 5, 2 x 2 ve 1 x 1  $\mu\text{m}$ 'lik bölgelerin görüntüsü alınarak yapılmıştır. Şekil 3.4 AFM cihazının görüntüsünü göstermektedir.



Şekil 3.4 AFM cihazının görüntüsü.

### 3.5.3. Yüzey ıslanabilirlik ölçümleri

Modifiye edilmemiş boş SPR yüzey, MIP-GO ve NIP-GO ve MIP SPR sensörlerin temas açısının ölçüm değerleri KRÜSS DSA100 cihazı ile ölçülerek gerçekleştirilmiştir. MIP-GO, NIP-GO ve MIP SPR sensör çiplerinin üzerindeki farklı noktalara damıtılmış su damlatılarak yapışık damla yöntemi ile temas açıları belirlenmiştir. Sensör yüzeylerindeki üç noktanın temas açısı ölçümlerinin ortalaması damlacığın katı yüzey ile sağ temas noktasından alınan sağdan ve sol temas noktasından alınan soldan temas açılarının ölçülmesiyle saptanmıştır. Şekil 3.5 temas açısı cihazının görüntüsünü göstermektedir.



Şekil 3.5 Temas açısı değerlerinin ölçüldüğü cihazın görüntüsü.

### 3.6. MIP-GO, NIP-GO ve MIP SPR sensörlerin kinetik analizleri

MIP-GO, NIP-GO ve MIP SPR sensörlerin kinetik analizleri plazmon eğrilerinin SPRImagerII (GWC Technologies) cihazı ile görüntülenmesi ile gerçekleştirilmiştir. MIP-GO, NIP-GO ve MIP SPR sensörlerin üretilmesinde kullanılan 25 mm x 12.5 mm yüzey alanına sahip olan 50 nm kalınlığında altın kaplı SPR yüzeyler (SPR-1000-050 SPR CHIP GWC) Genoptics'ten satın alınmıştır. Işığın MIP-GO, NIP-GO ve MIP SPR sensörlere ulaşma açısı değiştirilmiş ve ışığın %kırılma değerleri alınmıştır. Yüzey plazmon eğrileri, zamana karşı %kırılma değişimi grafiğe geçirilerek raporlanmıştır.

### 3.6.1. Kinetik çalışmalar

Benzilpenisilin baskılanmış MIP-GO SPR sensörün kinetik analizleri farklı derişimlerdeki (1, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 ppb) benzilpenisilin çözeltilerinin SPR sistemine uygulanması ile gerçekleştirilmiştir. pH 3.0 denge çözeltisi içerisinde hazırlanan benzilpenisilin antibiyotiginin çözeltileri cihaza verilerek adsorpsiyon-desorpsiyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.6'da MIP-GO, NIP-GO ve MIP SPR sensörler için kinetik analizlerin yapıldığı SPR ölçüm cihazı ve SPRimagerII sistemindeki lazer kaynağı, kamera, ayna sistemi, peristaltik pompa ve yazılımın olduğu bilgisayar görülmektedir. Kinetik analizleri gerçekleştirmeden önce, benzilpenisilin baskılanmış MIP-GO ve baskılanmamış NIP-GO ve MIP SPR sensörlerin yüzeyi deiyonize su ile yıkanmıştır. Daha sonra, yüzey plazmon eğrileri sisteme pH 3.0 denge çözeltisi uygulanarak alınmıştır. Rezonans kırılma açısı belirlendikten sonra deneyler belirlenen bu açı üzerinden gerçekleştirilmiştir. SPRview yazılımı kullanılarak kinetik analizler gerçekleştirilmiştir. Program sayesinde dakika başına yaklaşık olarak 150, % kırılma değişimi ölçülebilir ve gerçek-zamanlı olarak % kırılma değişiminin oluşmasına olanak sağlanır. Sistemdeki ayna rezonans açısı değerine ayarlandıktan sonra pH 3.0 denge çözeltisi 10 dakika süre ile sistemden geçirilir. Farklı derişimlerdeki benzilpenisilin çözeltileri 0.15 mL/dk akış hızında sırayla sistem dengeye ulaştıktan sonra SPR sistemine peristaltik pompa ile verilmiştir. Anlık olarak gözlenen rezonans frekansındaki kayma değerleri kayıt edilir. Desorpsiyon için sinyal dengeye geldikten sonra sisteme 10 mM NaCl çözeltisi verilmiştir. Desorpsiyon tamamlandıktan sonra veriler kaydedilmiş ve sistemden tekrar deiyonize su, ardından pH 3.0 denge çözeltisi geçirilerek sistem bir sonraki deney için hazır hale getirilmiştir. Farklı derişimlerdeki benzilpenisilin sulu çözeltileri için kinetik çalışmalar da aynı yöntem ile tekrarlanmıştır.





Şekil 3.6 Kinetik analizlerin yapıldığı SPR cihazının görüntüsü.

### 3.6.2. Yarışmacılar ile yapılan kinetik analizler

MIP-GO SPR sensörün benzilpenisiline olan seçiciliğini belirlemek amacıyla 100 ppb derişimindeki amoksisilin ve ampisilin antibiyotiklerinin pH 3.0 ortamında hazırlanan ayrı ayrı çözeltilerinin SPR sistemine sırası ile verilerek sensorgramlar alınmıştır. Yarışmalı kinetik analizler için aynı yöntem izlenmiş olup rezonans frekansının belirlenmesinden sonra adsorpsiyon ve desorpsiyon çalışmaları yapılmıştır.

### 3.6.3. Baskılama etkinliğinin hesaplanması

Benzilpenisilin içeren sulu örneklerin hassas, düşük maliyetle ve seçici tayin edilebilmesi amacıyla SPR temelli bir yöntem tasarlanmıştır. MAPA fonksiyonel monomeri benzilpenisilin ile hidrofobik gruplar üzerinden kompleks yapması için kullanılmıştır. Hazırlanan MIP-GO SPR sensörün ppb derişimdeki benzilpenisilini tekrar kullanılabilir şekilde tayin edebildiği gösterilmiştir. Tanıma elemanı olarak görev yapan moleküler baskılanmış film tabakası büyüklük ve şekil yönünden hedef moleküle benzeyen baskılanmış bölgelere sahiptir. Baskılanmış bu bölgeler hedef molekülü seçici tanır [91]. MIP-GO SPR sensörün baskılama seçiciliğini kanıtlamak amacıyla benzilpenisilin baskılanmamış NIP-GO SPR sensör, MIP-GO SPR sensör ile aynı koşullar altında sentezlenmiştir. Benzilpenisilin çözeltisi (100 ppb) MIP, MIP-GO ve NIP-GO SPR sensör sistemine aynı koşullarda verilmiş ve kinetik analizler yapılmıştır. Böylece

baskılama seçiciliği hesaplanmıştır. MIP-GO SPR ve NIP-GO SPR sensörlerin benzilpenisilin çözeltisi için çakıştırılmış plazmon grafiği çizilmiştir. Eşitlik 3.1 amoksisilin ve ampisilin için dağılma ve seçicilik katsayısının nasıl hesaplandığı gösterilmektedir:

$$K_d = [(C_i - C_e)/C_e]xV/m \quad (3.1)$$

Eşitlik 3.2 de seçicilik katsayının (k) nasıl hesaplandığı görülmektedir.

$$k = K_{d \text{ hedef}}/K_{d \text{ yarışmacı}} \quad (3.2)$$

Eşitlik 3.3 de bağıl seçicilik katsayısı (k') nın nasıl hesaplandığı görülmektedir.

$$k' = k_{MIP}/k_{NIP} \quad (3.3)$$

Baskılama faktörünün (k') Eşitlik 3.4'e göre hesaplanması ile baskılama etkinliği bulunmuştur.

$$k' = \Delta R_{MIP}/\Delta R_{NIP} \quad (3.4)$$

#### **3.6.4. MIP-GO SPR sensörün tekrar kullanılabilirliği ve istatistiksel analizler**

MIP-GO SPR sensörün tekrar kullanılabilirliğini incelenmek için 25 ppb derişiminde benzilpenisilin içeren çözeltiler kullanılmıştır. Uygun rezonans frekansına ayarlanan SPR sistemi pH 3.0 çözeltisi ile dengeye getirilmiştir. Sistem dengeye geldikten sonra sistemden benzilpenisilin çözeltisi geçirilmiş ve rezonans kayma değerleri anlık olarak görülmüştür. Daha sonra sisteme desorpsiyon çözeltisi verilerek benzilpenisilin uzaklaşması sağlanmıştır. Bu işlemler sistemde gün-içi olarak üç defa dört tekrarlı gerçekleştirilmiştir. MIP-GO SPR sensör için istatistiksel olarak değerlendirilen gün-içi tekrarlanabilirlik çalışmaları tamamlanmış ve kesinlik değerleri %bağıl standart sapma (%RSD) olmak üzere verilmiştir.

### **3.6.5. GO'lerin sinyal artırma etkisi**

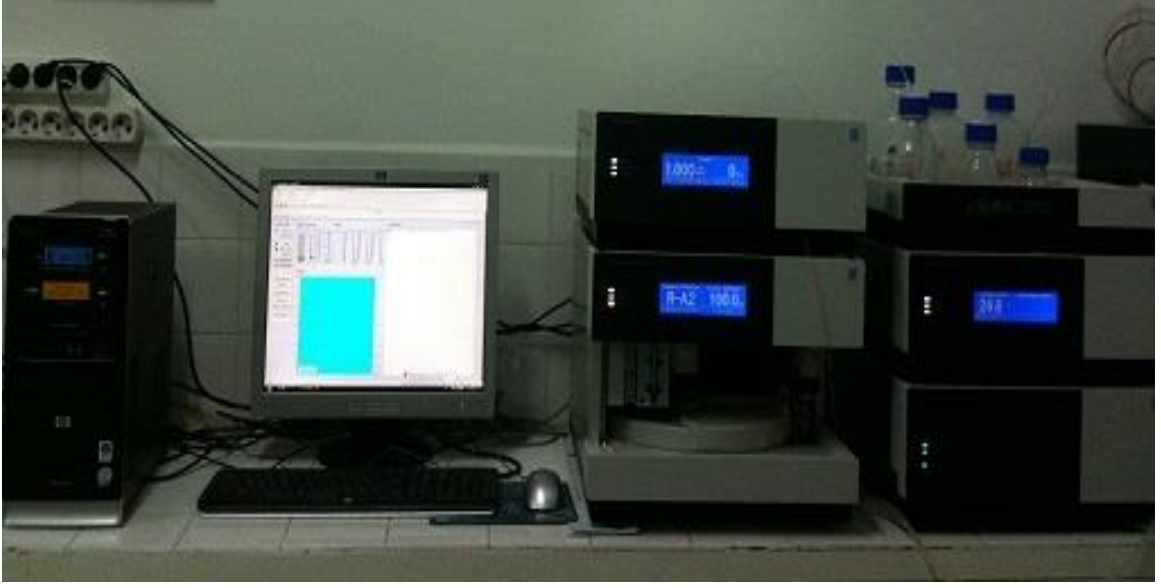
Benzilpenisilin tespiti için SPR sinyal yanıtına GO etkisini incelemek amacıyla benzilpenisilin baskılanmış MIP-GO SPR sensör hazırlanmıştır. GO eklenmeden hazırlanan MIP SPR sensörün benzilpenisiline karşı verdiği yanıt kontrol deneyi olarak tasarlanmıştır. Bu çalışmada MAPA ve GO ile moleküler baskılama tekniği kullanılarak benzilpenisilin seçici tayini için yeni MIP-GO SPR sensör hazırlanmıştır. Kinetik analizler 100 ppb benzilpenisilin çözeltileri ile MIP-GO and MIP SPR sensörlere sırası ile verilmiştir. GO'in sinyal artırıcı etkisi elde edilen sonuçlara göre tespit edilmiştir.

### **3.7. Sütteki benzilpenisilin tayini ve kinetik çalışmalar**

Süt ve süt ürünleri temel besin kaynaklarından biridir. Süt üreticisi olan ineklerde enfeksiyon riskini önlemek ve halk sağlığını korumak için antibiyotik kullanımı yaygındır. Ancak ilaçların yanlış kullanılması sonucu sütteki ilaç kalıntıları büyük bir sorun yaratmaktadır ve belirlenen limitlerin altında olması gereklidir [92,93]. Süt içerisindeki benzilpenisilin MIP-GO SPR sensör ile tayini sırasında matriks etkisi incelenmiştir. Marketten alınan süte 100 ppb olacak şekilde benzilpenisilin eklenmiş ve benzilpenisilin baskılanmış MIP-GO SPR sensöre uygulanarak kinetik analizler yapılmıştır. Benzilpenisilin, hazırlanan MIP-GO SPR sensör ile süt örneğinde bulunan diğer moleküllerin varlığında yüksek özgüllük ve hassasiyetle tespit edilmiştir.

### **3.8. Validasyon çalışmaları**

MIP-GO SPR sensör ile süte bulunan benzilpenisilin tayini HPLC sisteminde valide edilmiştir. Farklı derişimlerdeki (1, 6.25, 12.5, 25, 50 ve 100 ppb) benzilpenisilin çözeltileri ile kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Her derişimdeki benzilpenisilin çözeltisi, amonyum asetat: asetonitril (75:25, v/v%) çözelti karışımı içinde 10 mM olacak şekilde  $10^3$  ppb derişimdeki stok benzilpenisilin çözeltisinden hazırlanmıştır. Benzilpenisilin içeren süt numunesi, marketten alınan süte 6.25 ppb benzilpenisilin eklenerek hazırlanmıştır. Numune ters faz HPLC C18 kolonu ile izokratik elüsyon sistemi kullanılarak 220 nm'de analiz edilmiştir.



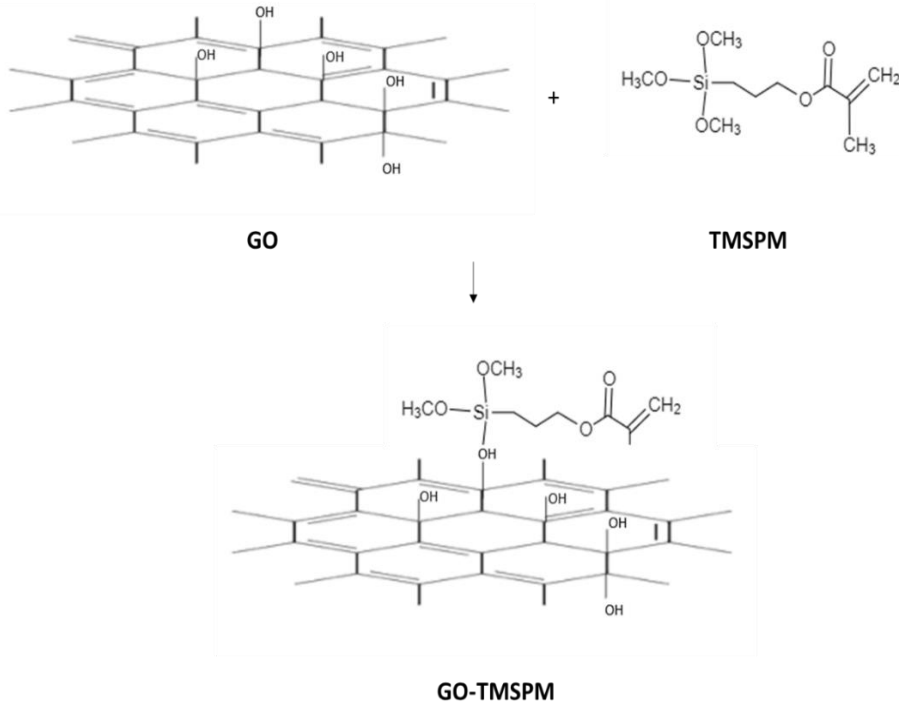
Şekil 3.7 Validasyon çalışmalarının gerçekleştiği HPLC cihazının görüntüsü.

## 4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA

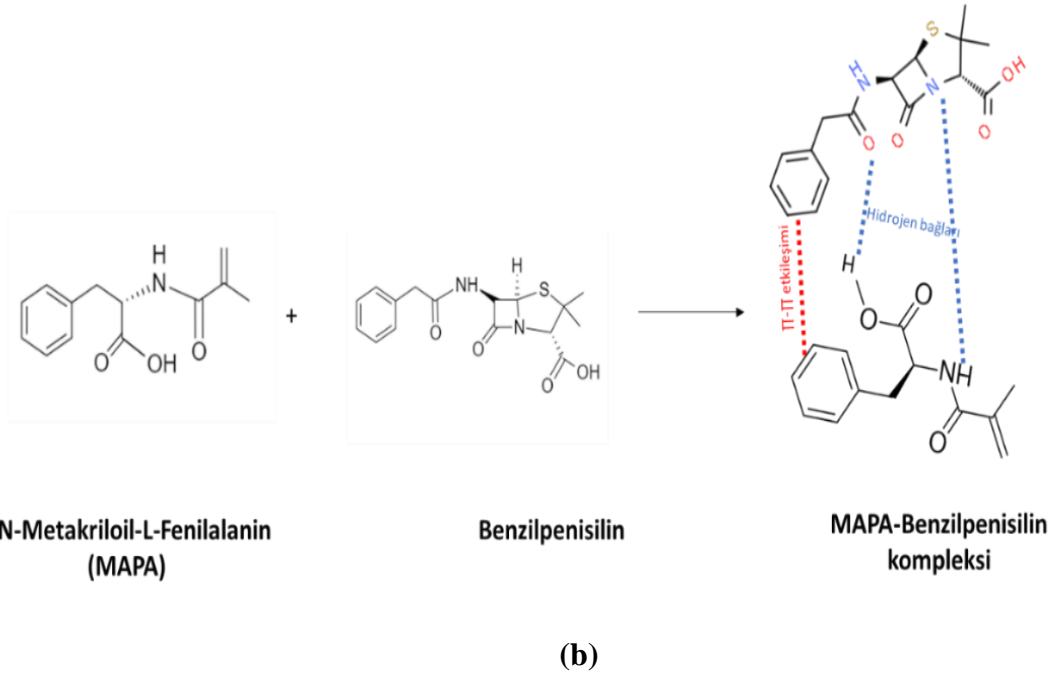
### 4.1. GO-TMSPM kompleksinin karakterizasyonu

Sinyal artırıcı olarak kullanılan GO'in, silanlama ajanı olarak kullanılan TMSPM ile oluşturduğu GO-TMSPM kompleksinin karakterizasyon işlemi FTIR spektrofotometresi ile gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.1a'da sinyal artırıcı olarak kullanılan GO'in ve GO'in TMSPM ile etkileşmesi ile oluşan GO-TMSPM kompleksinin moleküler formülleri görülmektedir. Şekil 4.1b ise MAPA monomerinin benzilpenisilin ile MAPA/benzilpenisilin ön-kompleksini oluşturmasının moleküler formülü görülmektedir.

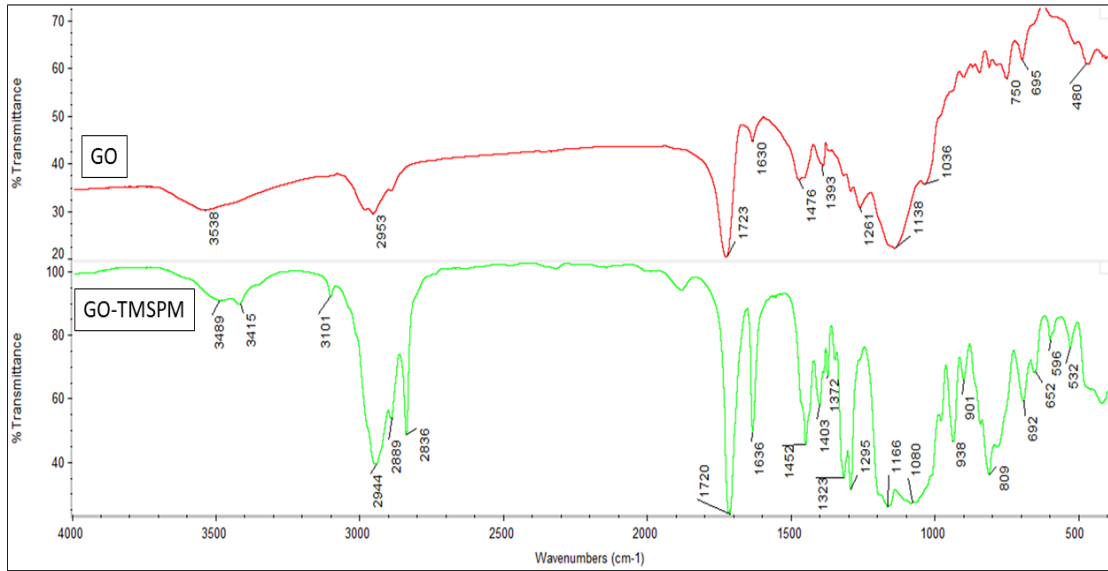
Şekil 4.2'de sinyal artırıcı olarak kullanılan GO'in ve GO'in TMSPM ile etkileşmesi ile oluşan GO-TMSPM kompleksin FTIR spektrofotometre ile karakterizasyonu görülmektedir. FTIR spektrumunda görüldüğü üzere, GO-TMSPM kompleksin yapısında GO'e ait fonksiyonel grupların pikleri tespit edilmiştir. -OH fonksiyonel grubuna ait gerilme bandı  $3538\text{ cm}^{-1}$ 'de, C=O gerilme bandı  $1720\text{-}1740\text{ cm}^{-1}$ 'de,  $\text{sp}^2$  C-C hibritleşmesine sahip oksitlenmemiş C=C bağına ait band  $1636\text{ cm}^{-1}$ 'de görülürken, GO'e ait  $1261\text{ cm}^{-1}$ 'de görülen C-O-C titreşim bandının GO-TMSPM kompleksinde  $1295\text{ cm}^{-1}$ 'e kayması kompleksleşmenin gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 4.2).



(a)



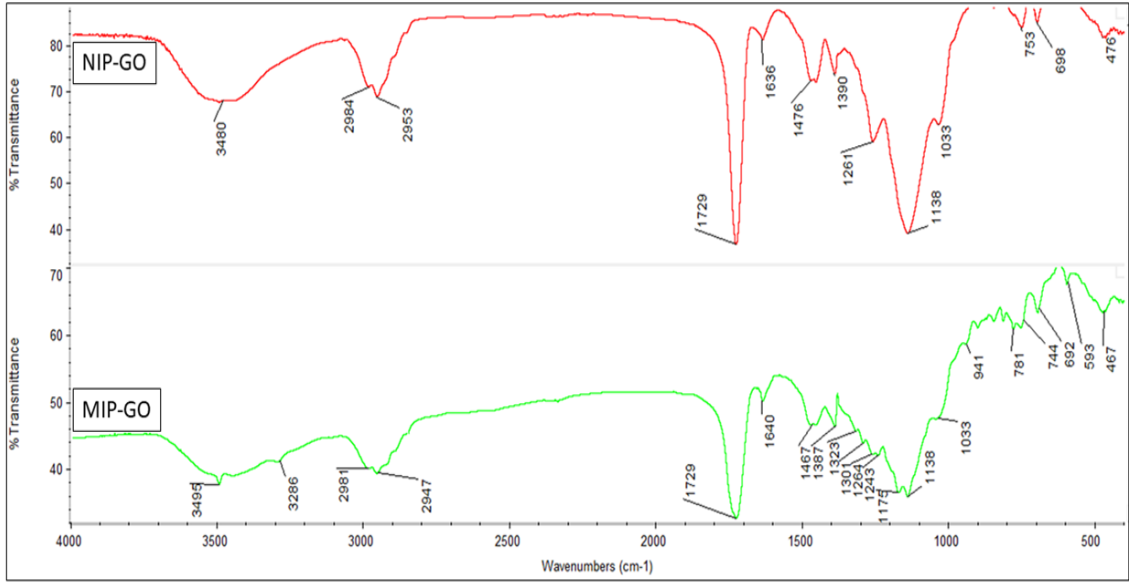
Şekil 4.1 GO ile TMPSP'nin oluşturduğu GO-TMSPM kompleksinin moleküler formülü (a) ve MAPA monomerinin benzilpenisilin ile MAPA/benzilpenisilin ön-kompleksini oluşturması (b).



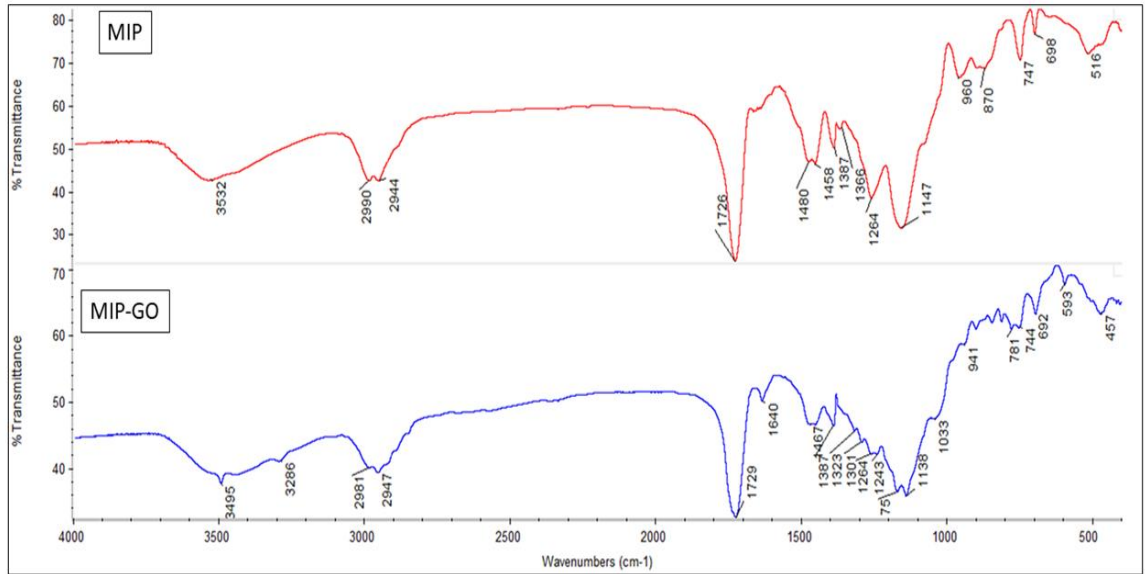
Şekil 4.2 GO'in ve TMSPM ile yaptığı GO-TMSPM kompleksin FTIR spektrumu.

## 4.2. MIP-GO, NIP-GO ve MIP SPR sensörlerin karakterizasyonu

Moleküler baskılamanın sinyal yanıtına etkisini incelemek için benzilpenisilin baskılanmış MIP-GO SPR sensörün baskılama verimliliği benzilpenisilin baskılanmamış NIP-GO SPR sensör ile karşılaştırılarak incelenmiştir. Eklenen GO'ler hassasiyeti ve sinyal yanıtını artırmak için kullanıldığından, GO eklenmeden hazırlanan MIP SPR sensör ile GO'in katkısı araştırılmıştır. Bu amaçla hazırlanan MIP SPR sensör sırası ile FTIR spektrofotometre, AFM ve temas açısı analizleri ile karakterize edilmiştir. Öncelikle MIP-GO, NIP-GO ve MIP SPR sensörleri oluşturan nanofilmlerdeki fonksiyonel gruplar FTIR spektrofotometre ile tayin edilmiştir. MIP-GO, NIP-GO ve MIP SPR sensörlerinin FTIR spektrumu karşılaştırıldığında, polimerik nanofilm yapısına benzilpenisilin molekülünün ve sinyal artırıcı GO'in girdiği tespit edilmiştir. FTIR spektrumu incelendiğinde MAPA/benzilpenisilin ön-kompleksinin, MIP-GO SPR sensörü oluşturan polimerik yapıya katıldığı anlaşılmaktadır. Şekil 4.3'deki MIP-GO SPR sensörün FTIR spektrumu incelendiğinde  $1175\text{ cm}^{-1}$  dalga sayısında görülen tetrasiklik yapıdaki -CN bağının polimerik nanofilm yapısına entegre olduğu görülmektedir. Aynı şekilde  $3495\text{ cm}^{-1}$ 'deki benzilpenisilin molekülünün -NH bağına ait gerilme bandı, nanofilm yapısına dahil olduğunu göstermektedir. NIP-GO SPR sensördeki MAPA amino asidine ait amid I bandı  $1476\text{ cm}^{-1}$ 'de görülürken, MIP-GO SPR sensörde aynı band  $1467\text{ cm}^{-1}$ 'e kaymıştır. GO'in MIP-GO'un yapısına dahil olduğu MIP ve MIP-GO spektrumları karşılaştırıldığında, GO'ye ait  $1630$ 'daki -C=C bağına ait bandın MIP-GO ya ait spektrumunda  $1640\text{ cm}^{-1}$ 'e kayması ile anlaşılmıştır. Sonuç olarak hem benzilpenisilin hem de GO'nin MIP-GO SPR yapısına katıldığı anlaşılmaktadır. Şekil 4.4'te ise MIP-GO ve MIP SPR sensörlere ait FTIR spektrumu görülmektedir. Şekilde sinyal artırma amacıyla eklenen GO'in etkisini incelemek amacıyla hazırlanan MIP-GO SPR sensörün ve GO eklenmeden hazırlanan MIP SPR sensörün FTIR spektrumunu göstermektedir.



Şekil 4.3 MIP-GO ve NIP-GO SPR sensör yüzeylerindeki nanofilme ait FTIR spektrumu.



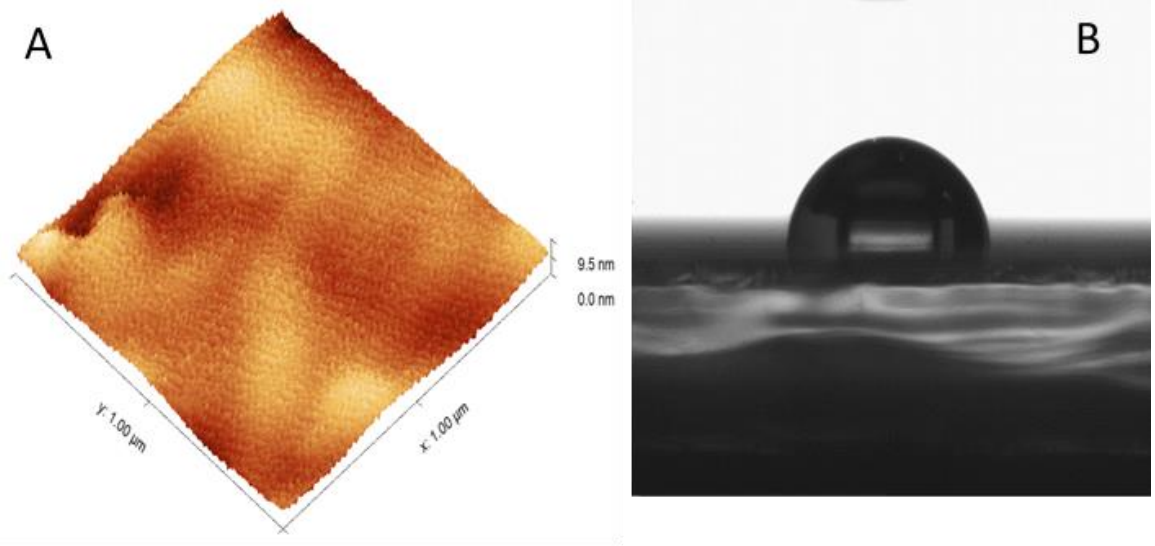
Şekil 4.4 MIP-GO ve MIP SPR sensör yüzeylerindeki nanofilme ait FTIR spektrumu.

Modifiye edilmemiş boş SPR yüzeyin, MIP-GO, NIP-GO ve MIP SPR sensörlerinin yüzey morfolojisi AFM ile yarı degen modda karakterize edilmiştir. Benzilpenisilin baskılanmış MIP-GO SPR sensörünün yüzey derinliği AFM görüntüleri ile  $119 \pm 1.46$  nm olarak tespit edilirken, yüzey pürüzlülük değeri 8.43'tür. Benzilpenisilin baskılanmış fakat GO içermeyen MIP SPR sensörün yüzey derinliği  $34 \pm 2.49$  nm iken, yüzey

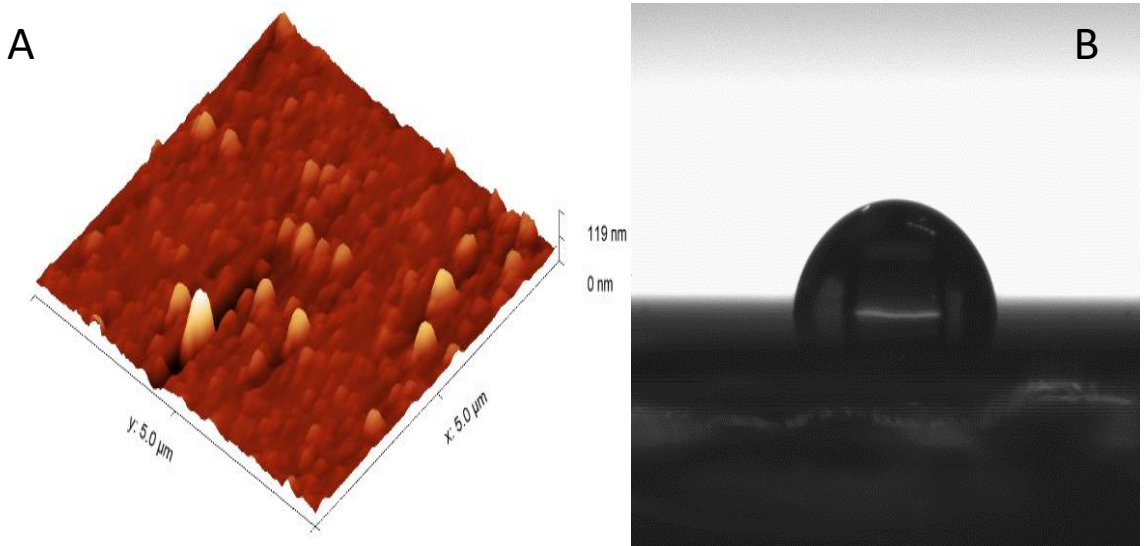


pürüzlülük değeri 2.89'dur. NIP-GO SPR sensörün yüzey derinliği  $112\pm 1.01$  nm iken, yüzey pürüzlülük değeri 6.26 nm'dır. Boş SPR çipin ise yüzey derinliği  $9.5\pm 0.91$  nm olarak ölçülürken yüzey pürüzlülük değeri 1.12'dir. MIP-GO ve MIP SPR sensörlerin yüzey derinlik değerleri arasındaki fark GO'lerin polimer yapısına başarıyla katıldığını gösterir. Diğer yandan, MIP-GO SPR sensörün yüzeyindeki pürüzlülük dağılımından benzilpenisilin molekülünün SPR sensör yüzeyine homojen baskılandığı anlaşılmaktadır. Boş SPR altın çipin, MIP-GO, MIP ve NIP SPR sensörün yarı degen modda ölçülen AFM görüntüleri Şekil 4.5.A, Şekil 4.6.A, Şekil 4.7.A ve Şekil 4.8.A'da gösterilmektedir. Ayrıca derinlik ve pürüzlülük değerleri Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

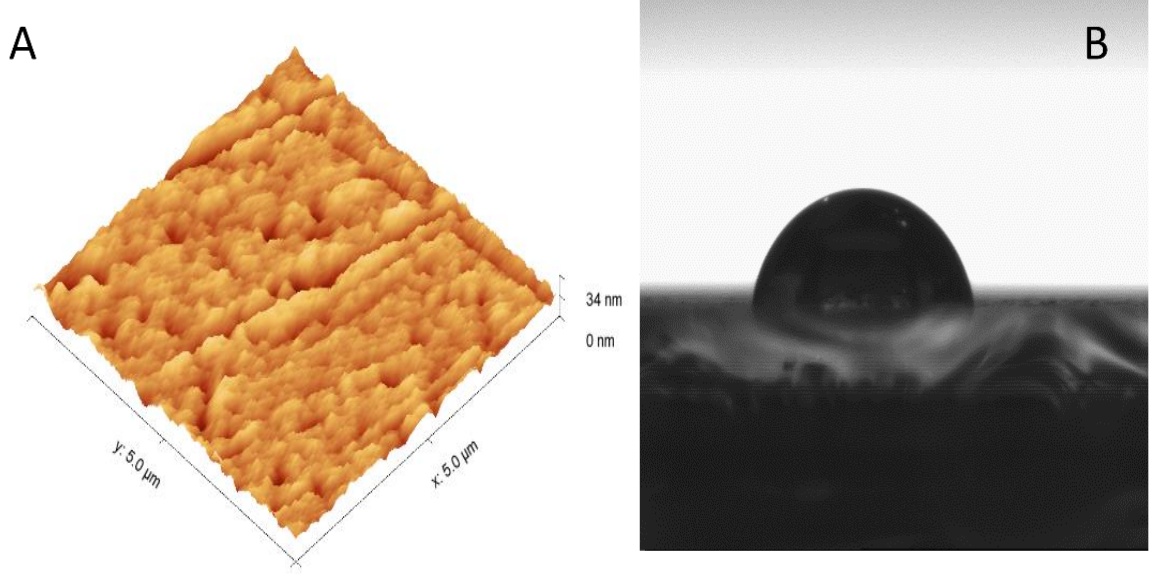
Temas açısı cihazı (Krüss DSA100) kullanılarak, yüzeyinde herhangi bir modifikasyon işlemi yapılmamış olan boş SPR çip yüzeyinin, benzilpenisilin baskılanmış MIP-GO, baskılanmamış NIP-GO ve GO içermeyen MIP SPR sensörlerin yüzey ıslanabilirlik özellikleri incelenmiş olup, temas açısı değerlerini hesaplamak için DSA2 yazılımı kullanılmıştır. Çizelge 4.1'de modifiye edilmemiş boş SPR yüzeyin, MIP-GO, NIP-GO ve MIP SPR sensörlerin yüzeylerinin temas açısı değerleri rapor edilmiştir. Temas açısı değerleri sonuçlarından görüldüğü gibi MIP-GO SPR sensörün yüzeyin temas açısı değeri  $69.0^\circ\pm 1.8$  olarak kaydedilirken, NIP-GO SPR sensör için temas açısı  $68.6^\circ\pm 0.4$  olarak ölçülmüştür. GO içermeyen MIP SPR sensörün temas açısı değeri ise  $70.8^\circ\pm 2.1$  olarak ölçülmüştür. Modifiye edilmemiş boş SPR yüzeyin temas açısı değeri ise  $66.8^\circ\pm 2.6$ 'dir. Temas açısı sayısal değerleri incelendiğinde benzilpenisilin baskılandıktan sonra temas açısı değerinin arttığı görülmektedir. Bunun muhtemel sebebi moleküler baskılama işlemi gerçekleştirilirken benzilpenisilin molekülünün hidrofobik MAPA monomeri ile koordine olarak, yüzey hidrofobikliğini artırmasıdır. Şekil 4.5.B, Şekil 4.6.B, Şekil 4.7.B ve Şekil 4.8.B sırasıyla boş SPR çipin, benzilpenisilin baskılanmış MIP-GO SPR sensörün, benzilpenisilin baskılanmış fakat GO içermeyen MIP SPR sensörün ve benzilpenisilin baskılanmamış NIP-GO SPR sensörün temas açısı ölçümlerine ait görüntüleri göstermektedir.



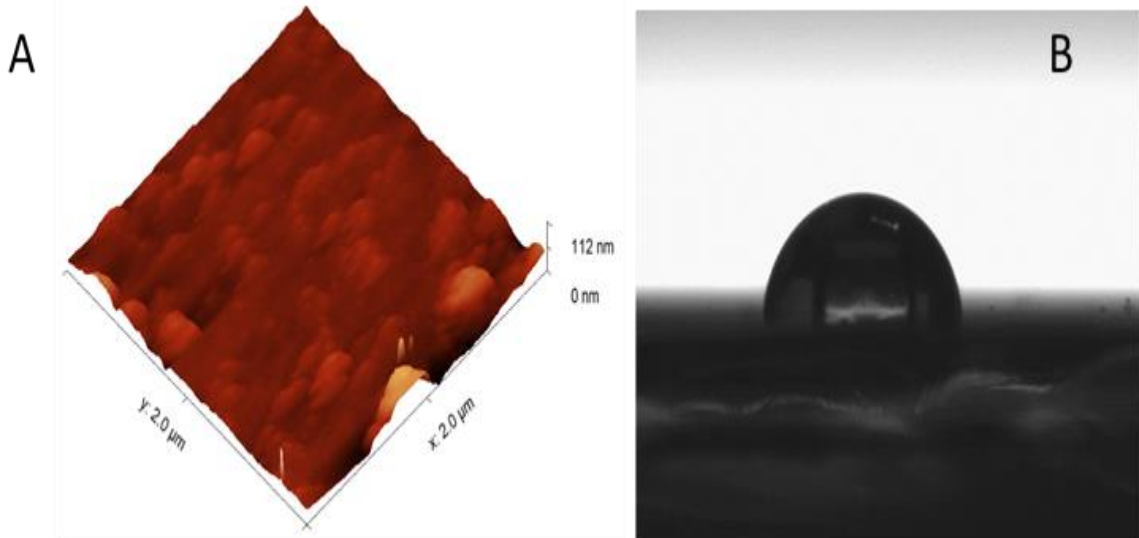
Şekil 4.5 Boş SPR sensörünün karakterizasyonu. AFM (A) ve temas açısı (B) görüntüsü.



Şekil 4.6 MIP-GO SPR sensörünün karakterizasyonu. AFM (A) ve temas açısı (B) görüntüsü.



Şekil 4.7 MIP SPR sensörünün karakterizasyonu. AFM (A) ve temas açısı (B) görüntüsü.



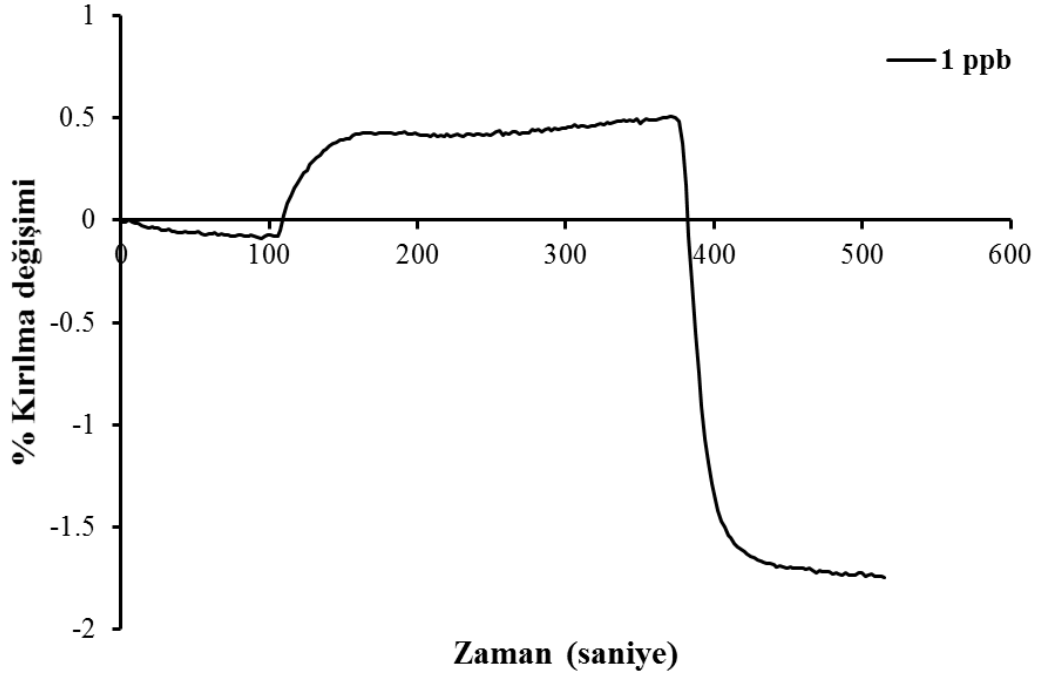
Şekil 4.8 NIP-GO SPR sensörünün karakterizasyonu. AFM (A) ve temas açısı (B) görüntüsü.

Çizelge 4.1 Boş SPR çipin, MIP-GO, NIP-GO ve MIP SPR sensörlerin temas açısı, derinlik ve pürüzlülük değerleri.

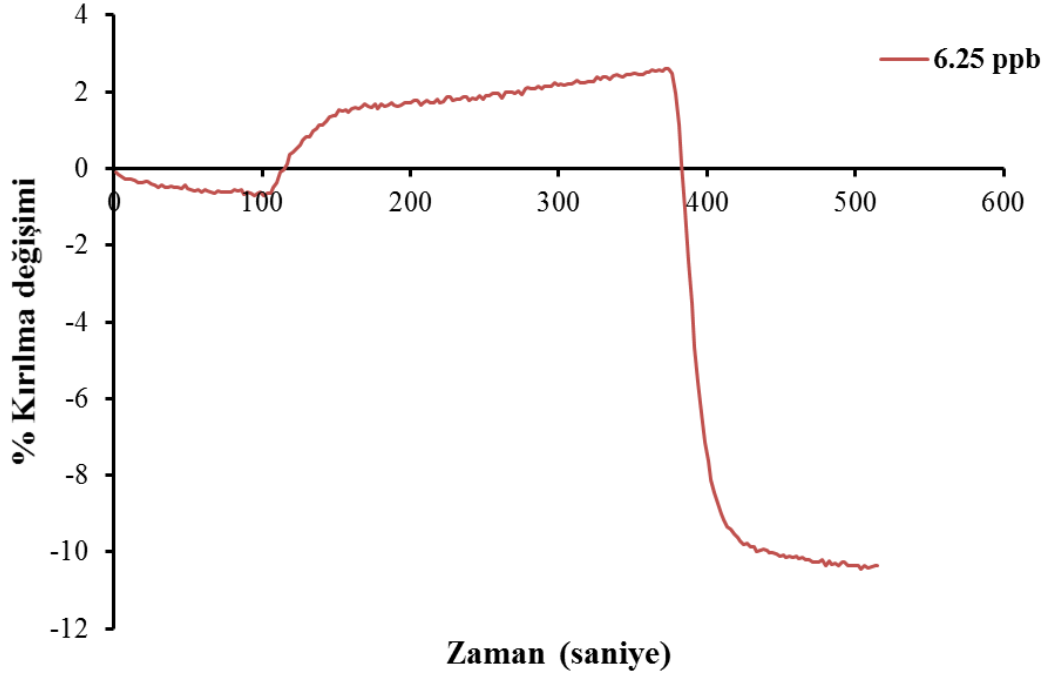
| Yüzey       | Temas açısı | Derinlik | Pürüzlülük |
|-------------|-------------|----------|------------|
| Boş SPR çip | 66.8°±2.6   | 9.5±0.91 | 1.12       |
| MIP-GO      | 69.0°±1.8   | 119±1.46 | 8.43       |
| NIP-GO      | 68.6°±0.4   | 112±1.01 | 6.26       |
| MIP         | 70.8°±2.1   | 34±2.49  | 2.89       |

#### 4.3. SPR sensörler ile gerçekleştirilen kinetik analizler

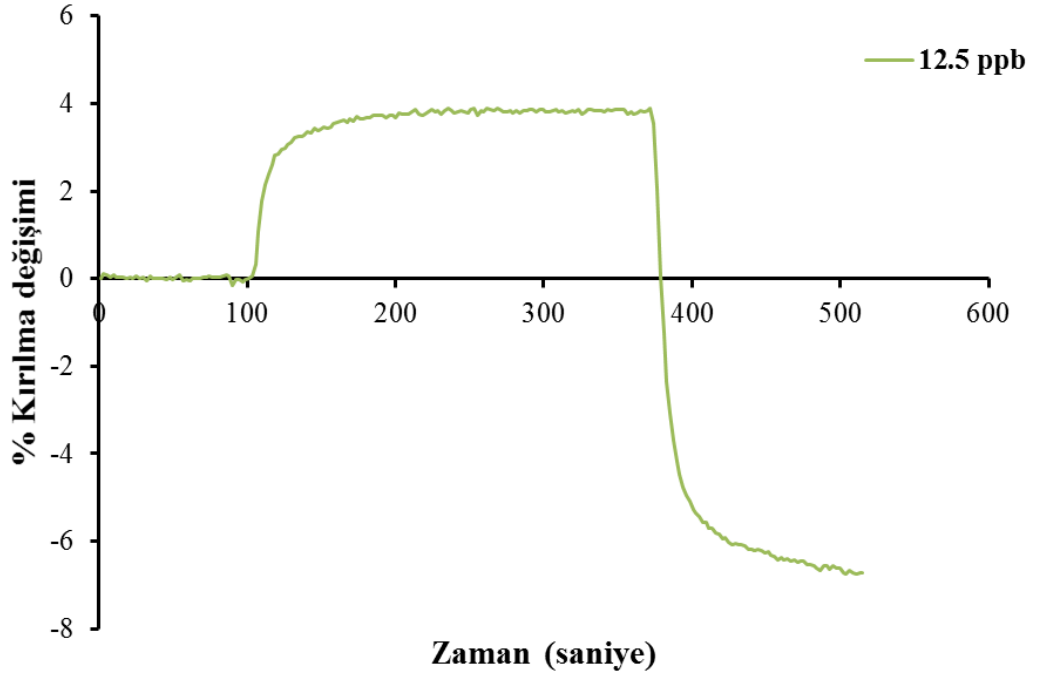
Günümüzde herhangi bir işaretleme elemanına ya da etiketleme işlemine ihtiyaç duymadan gerçekleştirilen moleküler düzeydeki analizler için SPR temelli sensörler sıklıkla kullanılmaktadır [94]. Analizlerin kısa sürede gerçekleştirilmesi ve maliyetinin düşük olması gibi avantajları olan SPR sensörler ile moleküllerin hem kinetik analizleri hemde nicel ve nitel karakterizasyonları yapılabilmektedir [95]. Bu tez kapsamında MIP-GO, NIP-GO ve MIP SPR sensörler hazırlanmış ve benzilpenisilin 1-100 ppb derişim aralığında hazırlanan çözeltileri ile kinetik analizler gerçekleştirilmiştir. Moleküler baskılama yöntemi; bir polimer matriks içerisinde, seçilmiş olan hedef molekülün büyüklük, şekil ve geometrik yapı bakımından tanıyan hafıza bölgelerinin oluşturulması olarak tanımlanabilir. Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'te farklı derişimlerde hazırlanmış benzilpenisilin çözeltilerinin MIP-GO SPR sensör tarafından verilen sensör cevaplarının sensorgramları verilmiştir. Şekil 4.15'te ise 1-100 ppb derişim aralığındaki benzilpenisilin çözeltilerinin MIP-GO SPR sensör ile etkileşimlerin çakışık kinetik analizleri gösterilmektedir. Şekiller incelendiğinde artan benzilpenisilin derişimi ile MIP-SPR sensörün verdiği sinyal yanıtının arttığı görülmektedir.



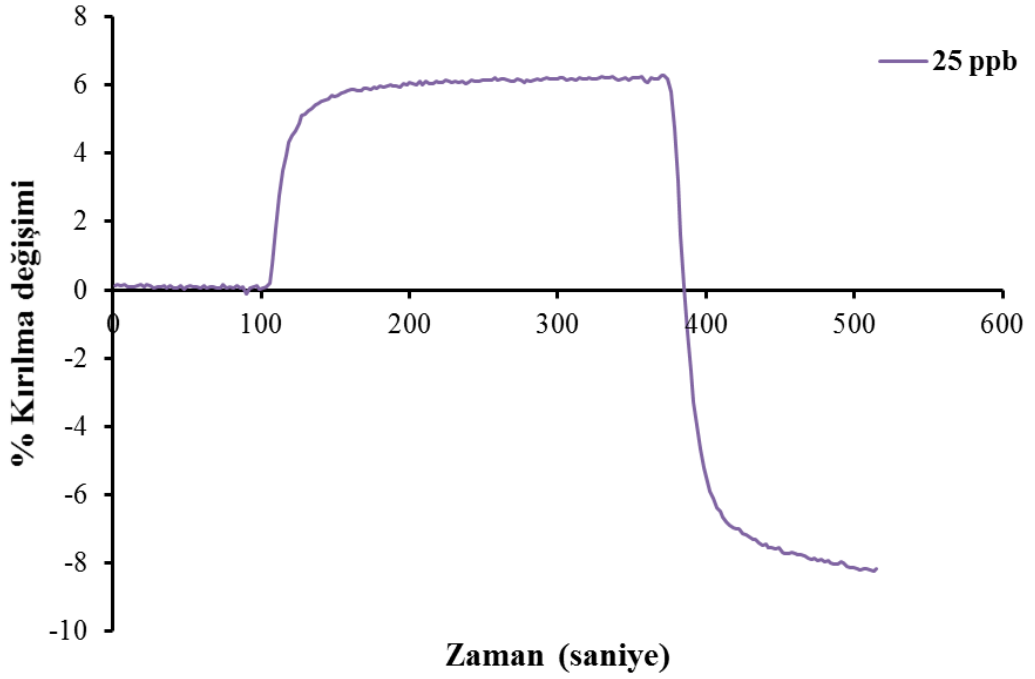
Şekil 4.9 1 ppb benzilpenisilin derışımi için elde edilen sensorgram.



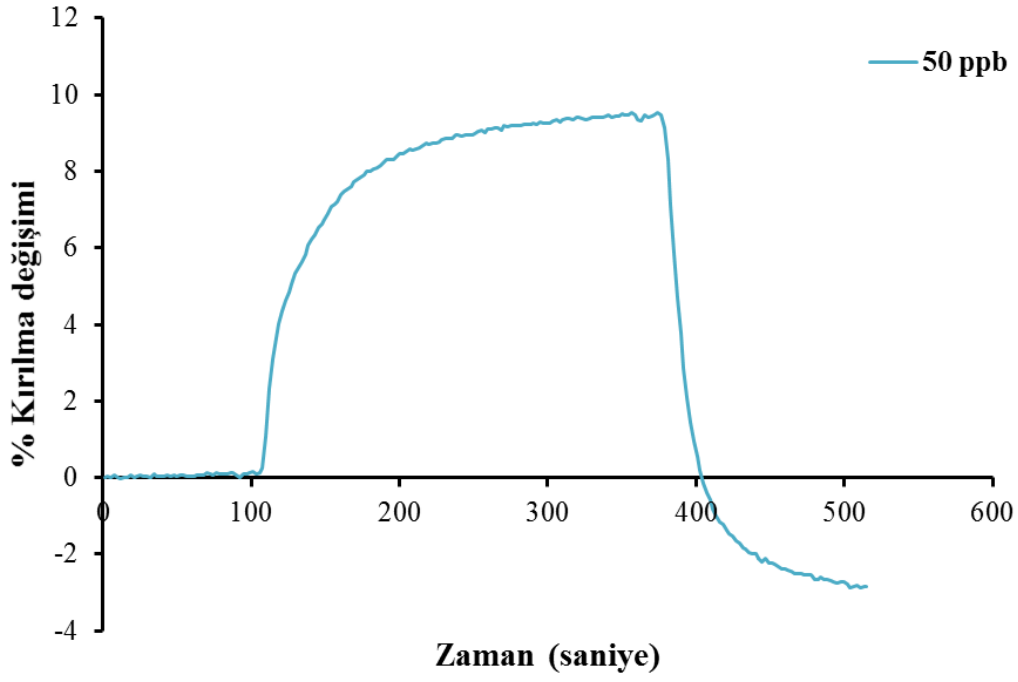
Şekil 4.10 6.25 ppb benzilpenisilin derışımi için elde edilen sensorgram.



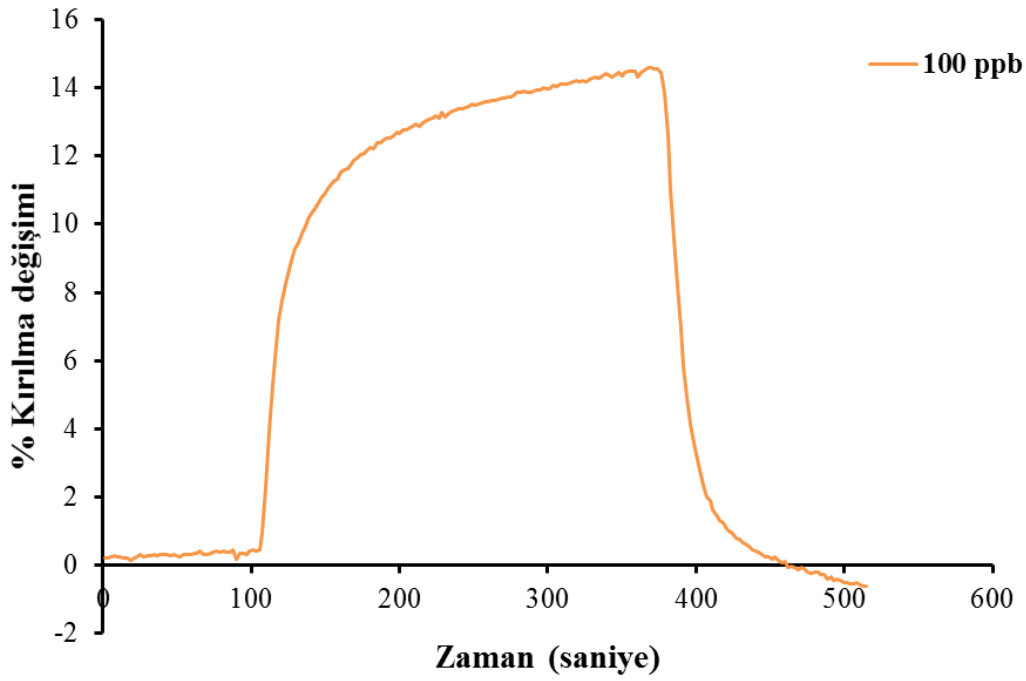
Şekil 4.11 12.5 ppb benzilpenisilin derışımi için elde edilen sensorgram.



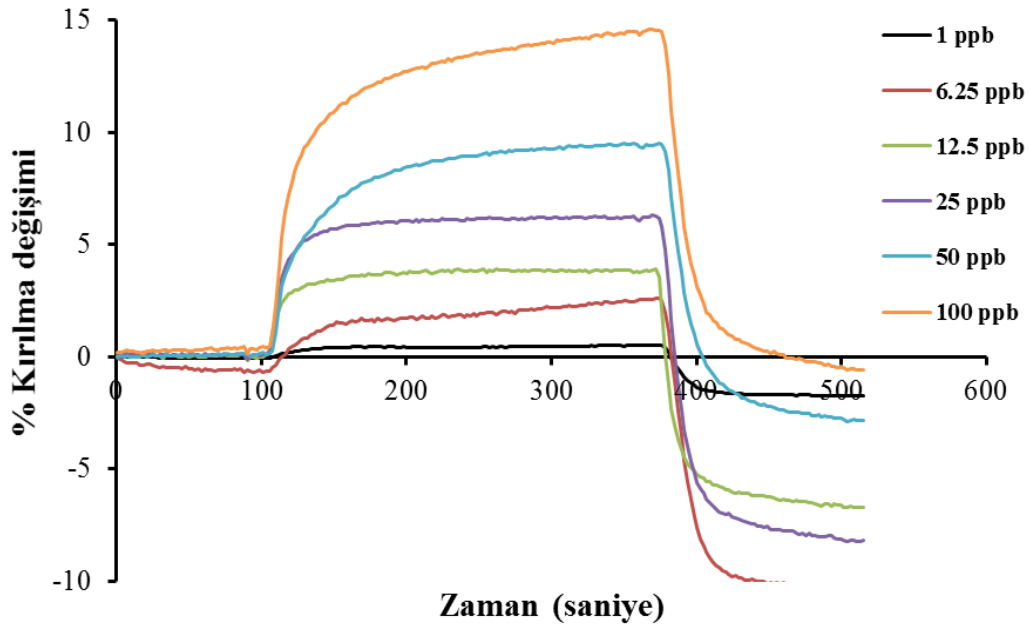
Şekil 4.12 25 ppb benzilpenisilin derışımi için elde edilen sensorgram.



Şekil 4.13 50 ppb benzilpenisilin derişimi için elde edilen sensorgram.



Şekil 4.14 100 ppb benzilpenisilin derişimi için elde edilen sensorgram.

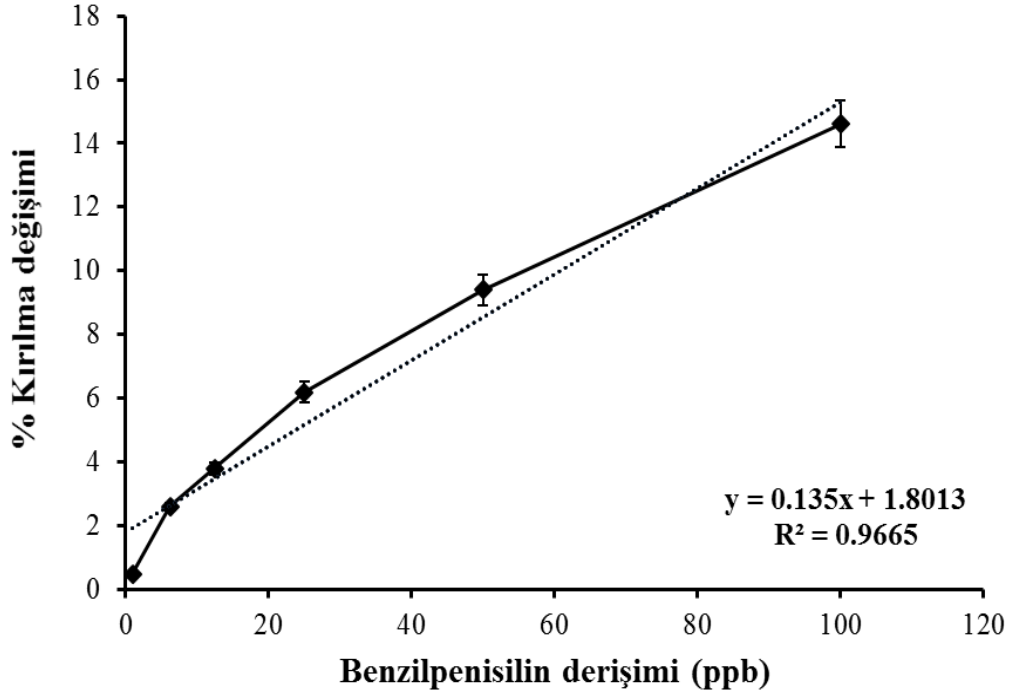


Şekil 4.15 1-100 ppb derişim aralığındaki benzilpenisilin çözeltilerinin MIP-GO SPR sensör ile elde edilen sensorgramları.

Şekil 4.15 farklı derişimlerdeki benzilpenisilin çözeltilerinin MIP-GO SPR sensör ile etkileştirilmesi ile oluşan sensorgramları göstermektedir. Grafikteki sensorgramlar, zamana (saniye) karşılık çizilen %kırılma değişimi göstermektedir. Şekil incelendiğinde %kırılma değişim değerinin, benzilpenisilin molekülünün artan derişimlerdeki çözeltilerinin SPR sensör yüzeyi ile etkileştirildiğinde arttığı anlaşılmaktadır. Şekildeki sensorgramların elde edilmesi için başlangıçta benzilpenisilin çözeltilerini hazırlamak için kullanılan denge çözeltisinin, sonrasında farklı derişimlerde hazırlanmış olan benzilpenisilin çözeltilerinin ve son işlem olarak desorpsiyon çözeltisinin spr sistemine uygulanması gerekir.

Şekil 4.16 MIP-GO SPR sensöre uygulanan benzilpenisilin çözeltisi için, derişim %kırılma değişim değerine karşı çizilerek elde edilen grafiğin yüksek doğrusallık değerini ifade eder. Şekilden de görüldüğü gibi 1-100 ppb derişim aralığındaki doğrunun denklemi  $y=0.135x+1.8013$  ( $R^2=0.9665$ ) olarak hesaplanmıştır. Yani tasarlanan MIP-GO SPR sensörün, 1-100 ppb derişim aralığında %96.65 doğrulukta ölçüm yapabildiğini göstermektedir.





Şekil 4.16 MIP-GO SPR sensörün kalibrasyon grafiği.

#### 4.3.1. Denge Analizi

Benzilpenisilin farklı derişimlerdeki çözeltilerinin uygulanması sonucu elde edilen bağlanmalar ile oluşan SPR yanıtının sinyal olarak değeri Eşitlik 4.1 ve Eşitlik 4.2’de ifade edilmekte olup, denklemlerdeki  $d\Delta R/dt$  sinyal değişim hızını,  $R$  ve  $R_{maks}$  bağlanma sonucu elde edilen yanıtın sinyal değerini,  $C$  benzilpenisilin derişimini,  $K$  bağlanma olayı gerçekleşirken elde edilen hız sabitinin oranını belirtmektedir. Bağlanma sabiti  $K_A$ ’yı hesaplamak için  $\Delta R_{denge}/C$ ’ye karşı  $\Delta R_{denge}$  grafiği çizilirken, ayrılma sabiti  $K_D$ ’yi hesaplamak için  $K_D=1/K_A$  eşitliği ile kullanılır.

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

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

### 4.3.2. Bağlanma Kinetik Analizi

Eşitlik 4.3, Eşitlik 4.1'in yeniden düzenlenmesiyle elde edilmiş olup, bağlanmanın hız sabitini hesaplamak için Eşitlik 4.4 kullanılır:

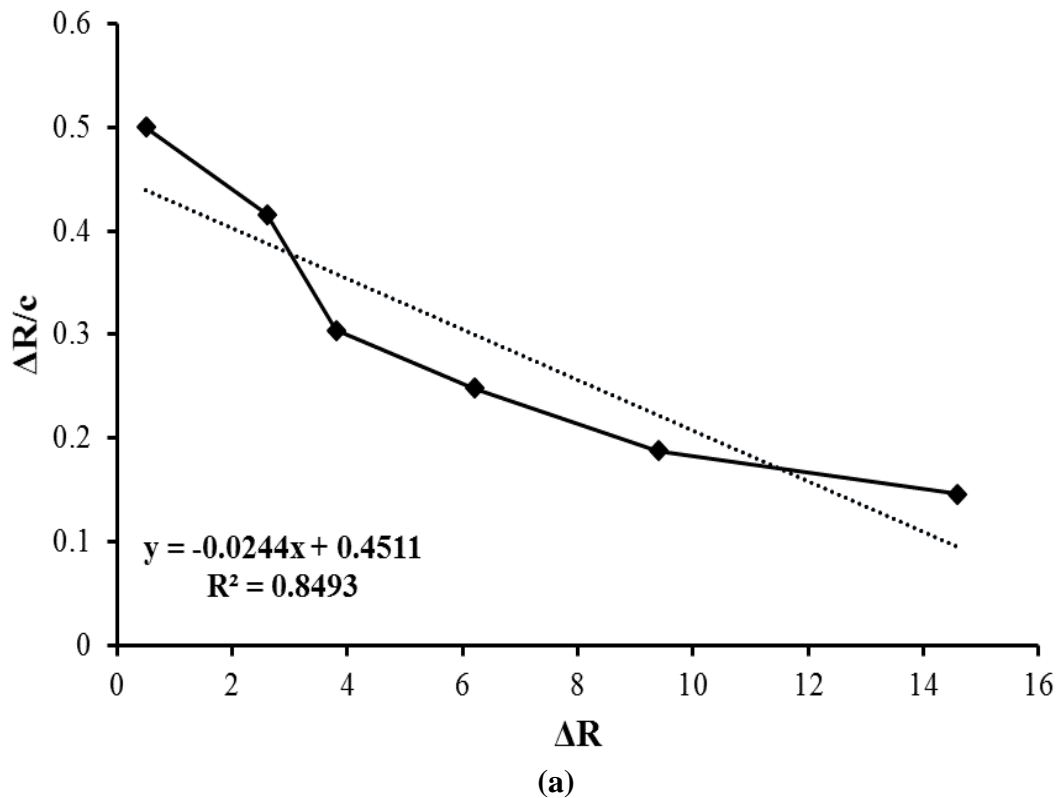
$$d\Delta R/dt = k_a C \Delta R_{maks} - (k_a C + k_d) \Delta R \quad (4.3)$$

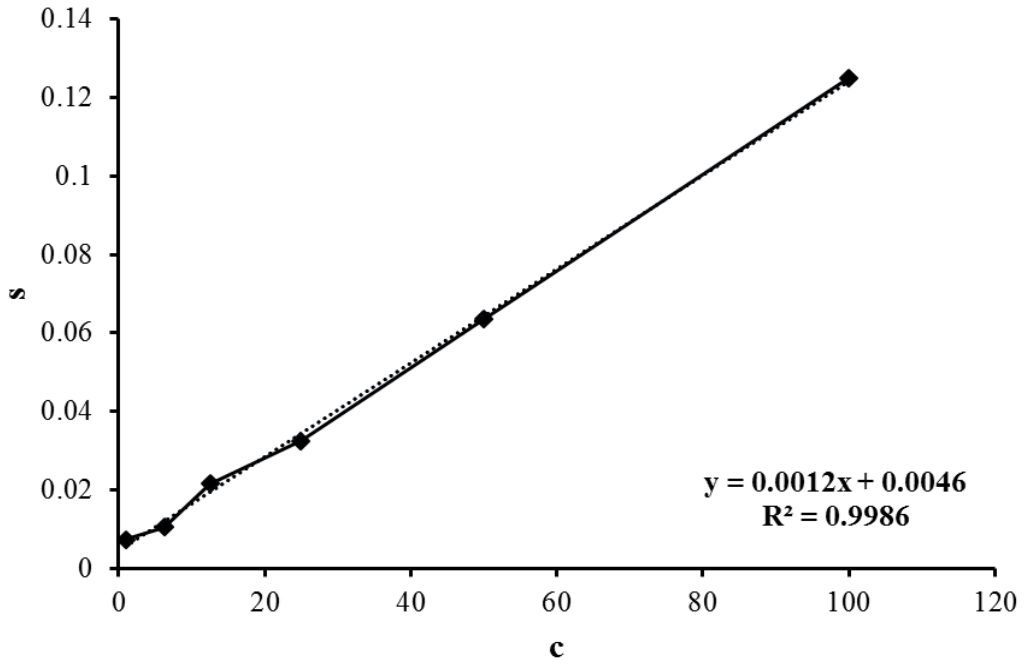
$$S = k_a C + k_d \quad (4.4)$$

Bu eşitlikteki  $k_a$  ifadesi çizilen doğrunun eğimi aracılığı ile hesaplanırken,  $k_d$  ise çizilen doğrudaki kesim noktasına karşılık gelmektedir.  $k_d$ 'nin hesaplanırken  $k_a C \gg k_d$  olduğu durumlarda kesinlikten sapmalar oluşmaktadır. Eşitlik 4.5 teki denklem en kesin ve doğru çözümü ifade etmektedir [96].

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

Şekil 4.17.a ve Şekil 4.17.b sırası ile denge analizi ve bağlanma kinetik analizi için oluşturulan doğruların grafiğini göstermekte olup çizilen grafiklerin değerlendirilmesiyle elde edilen  $\Delta R_{maks}$ ,  $k_a$ ,  $k_d$ ,  $K_A$  ve  $K_D$ 'ye ait sayısal değerler Çizelge 4.2'de tablo halinde özetlenmiştir.





(b)

Şekil 4.17 Denge analiz (Scatchard) (a) ve bağlanma kinetik (b) yaklaşımları.

Çizelge 4.2 Denge ve bağlanma kinetik analizleri ile elde edilen parametreler.

| DDenge Analizi (Scatchard) |        | Bağlanma Kinetik Analizi |        |
|----------------------------|--------|--------------------------|--------|
| $\Delta R_{maks}$          | 14.082 | $k_a$                    | 0.0012 |
| $K_A$                      | 0.0244 | $k_d$                    | 0.0046 |
| $K_D$                      | 4.0983 | $K_A$                    | 0.2609 |
| $R^2$                      | 0.8493 | $K_D$                    | 3.8333 |
|                            |        | $R^2$                    | 0.9986 |

### 4.3.3. Denge İzoterm Modelleri

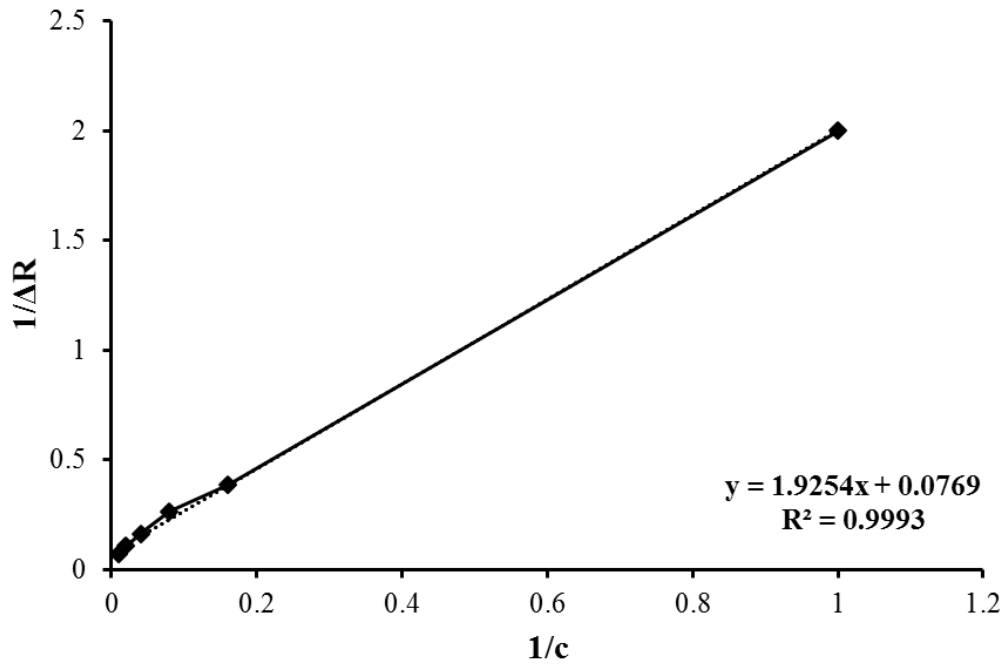
Benzilpenisilin molekülünün baskılanması ile elde edilen MIP-GO SPR sensöre benzilpenisilin çözeltilerinin uygulanması sonucu oluşan etkileşimlerin ve bu etkileşimler yoluyla elde edilen bağlanmaların mekanizmasını açıklamak amacı ile Scatchard, Langmuir ve Freundlich izoterm modelleri uygulanmıştır. Eşitlik 4.6, Eşitlik 4.7 ve Eşitlik 4.8’de sırası ile Scatchard, Langmuir ve Freundlich izoterm modellerini ifade eden denklemler gösterilmektedir.

$$\text{Scatchard;} \quad \Delta R_{\text{denge}}/[C]=K_A(\Delta R_{\text{maks}}-\Delta R_{\text{denge}}) \quad (4.6)$$

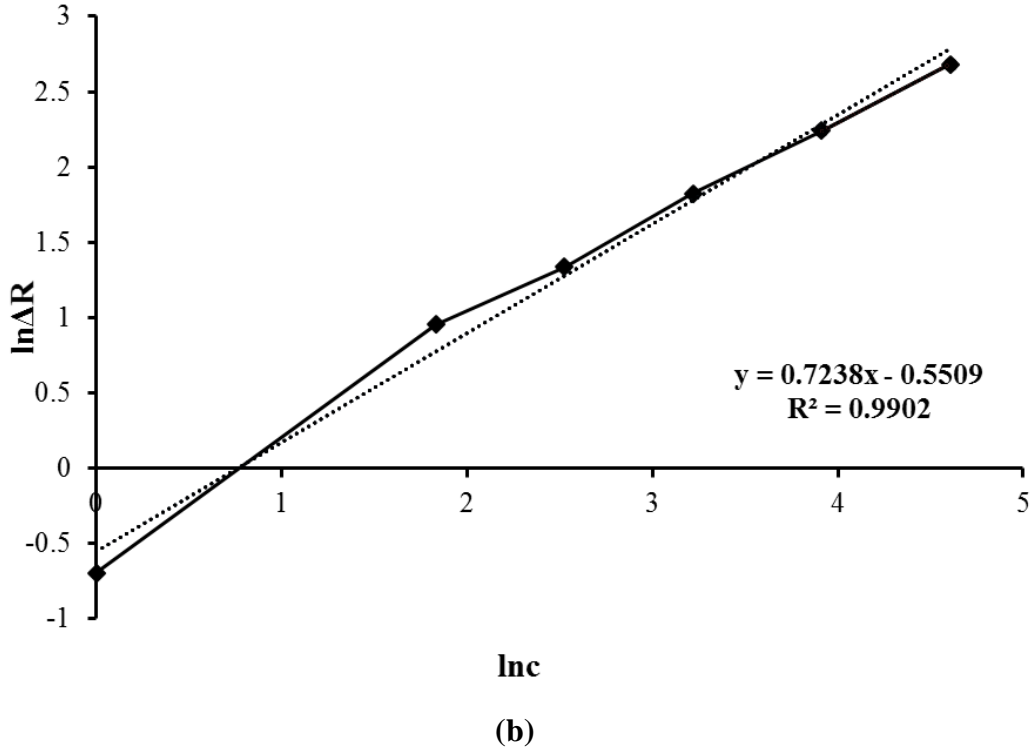
$$\text{Langmuir;} \quad \Delta R=\{\Delta R_{\text{maks}}[C]/K_D+[C]\} \quad (4.7)$$

$$\text{Freundlich;} \quad \Delta R=\Delta R_{\text{maks}}[C]^{1/n} \quad (4.8)$$

Şekil 4.18 incelendiğinde benzilpenisilin tayini için en uygun adsorpsiyon izoterm modelinin en yüksek korelasyon katsayısına sahip Langmuir adsorpsiyon modeli olduğu tespit edilmiştir ( $R^2 = 0.9993$ ). Modellere ilişkin sonuçlar Çizelge 4.3’te ifade edilmiştir. Bağlanmanın hızını belirleyen hız sabitleri Eşitlik 4.4 ile hesaplanmıştır.



(a)



Şekil 4.18 Langmuir (a) ve Freundlich (b) adsorpsiyon izoterm modellerine ait grafikler.

Çizelge 4.3 Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izoterm modellerine ait parametreler.

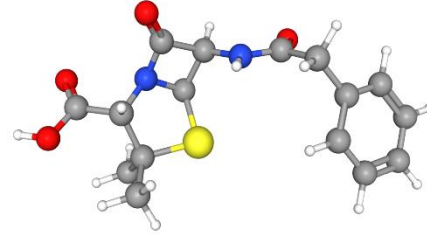
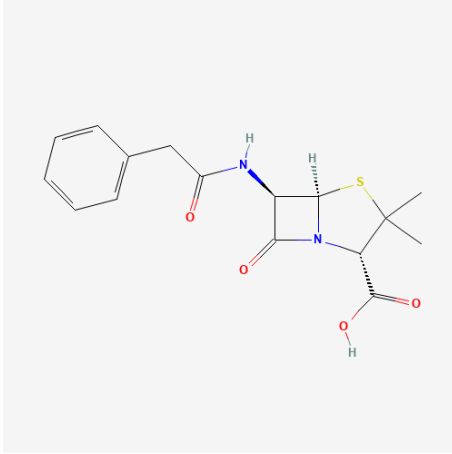
| <b>Langmuir Adsorpsiyon İzotermi</b> |        | <b>Freundlich Adsorpsiyon İzotermi</b> |        |
|--------------------------------------|--------|--|--------|
| $\Delta R_{maks}$                    | 13.00  | $\Delta R_{maks}$                      | 1.735  |
| $K_A$                                | 6.754  | $1/n$                                  | 0.724  |
| $K_D$                                | 0.148  | $R^2$                                  | 0.9902 |
| $R^2$                                | 0.9993 |  |        |

#### 4.4. Seçicilik çalışmaları

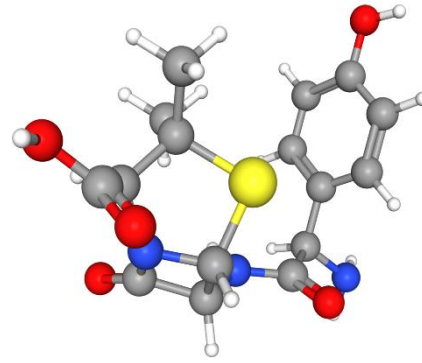
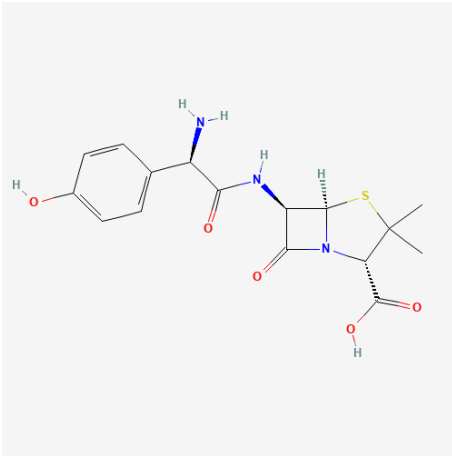
Çalışma kapsamında benzilpenisilini hem düşük maliyetle hemde hassas ve seçici olarak tayin etmeye yönelik SPR temelli tayin yöntemi geliştirilerek, geliştirilen yöntem benzilpenisilinin hem sulu çözeltisine hemde gerçek örnek olarak seçilen süte uygulanmıştır. Hassasiyeti artırmak amacı ile eklenen GO sinyal artırıcı olarak kullanılırken, seçiciliği artırmak amacı ile uygulanan MIP yönteminde baskılama işlemini

gerçekleştirmek için kullanılan hidrofobik MAPA monomeri fenilalanin molekülünün sağlayıcısı fonksiyonel monomer olarak görev yapmıştır. Amino asit bazlı MAPA monomerinin kullanılmasıyla hazırlanan MIP-GO SPR sensör, sulu çözeltilerdeki benzilpenisilin antibiyotiğini ppb derişim düzeyinde tayin etmiş ve tekrar tekrar kullanılarak yeniden kullanılabilirliği rapor edilmiştir. MIP'lerde baskılama işleminin gerçekleştirilmesiyle hem boyut hemde şekil bakımından şablon moleküllere benzeyen baskılanmış bölgeler oluşturulabildiği için bu bölgeler tanıma elemanı olarak görev yapmaktadırlar. Bu baskılanmış bölgelerin tayin edilecek molekülü bulunduğu ortamdan seçici olarak tanınması yeniden bağlanma aşamasındaki verimliliği artırmaktadır [97]. Şekil 4.19a'da Benzilpenisilin, 4.19b'de Amoksisilin, 4.19c'de ise Ampisilin moleküllerinin, iki boyutlu (2D) ve üç boyutlu (3D) yapıları gösterilmektedir. Şekil 4.20'de gösterildiği gibi, MIP-GO SPR sensörün benzilpenisilin antibiyotiğinin seçici tayinini incelemek için yarışmacı adsorpsiyon çalışmaları yapılmış, şekil ve boyut bakımından benzilpenisiline benzeyen amoksisilin ve ampisilin gibi bazı yapısal benzer moleküllerin eşliğinde analizler gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, amoksisilin (100 ppb) ve ampisilin moleküllerinin hazırlanmış çözeltileri (100 ppb), MIP-GO SPR sensörüne sırası ile uygulanarak test edilmiştir.

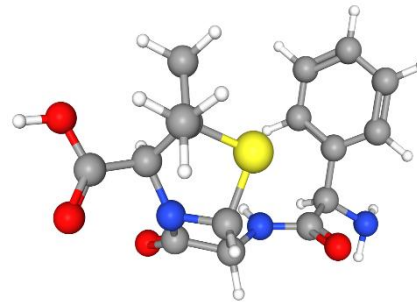
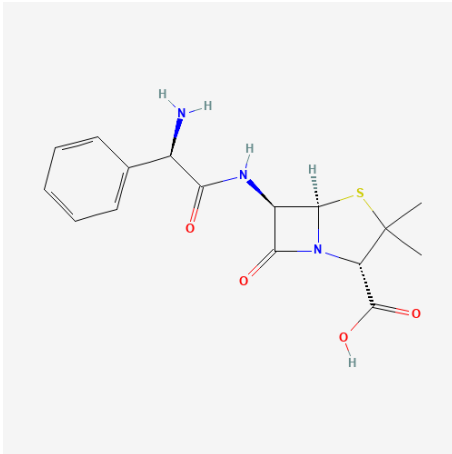
Çizelge 4.4'te görüldüğü gibi, MIP-GO SPR sensörün benzilpenisilini, amoksisilin ve ampisilinden sırası ile 8.16 ve 14.04 kat seçici tayin ettiği hesaplanmıştır.



(a)

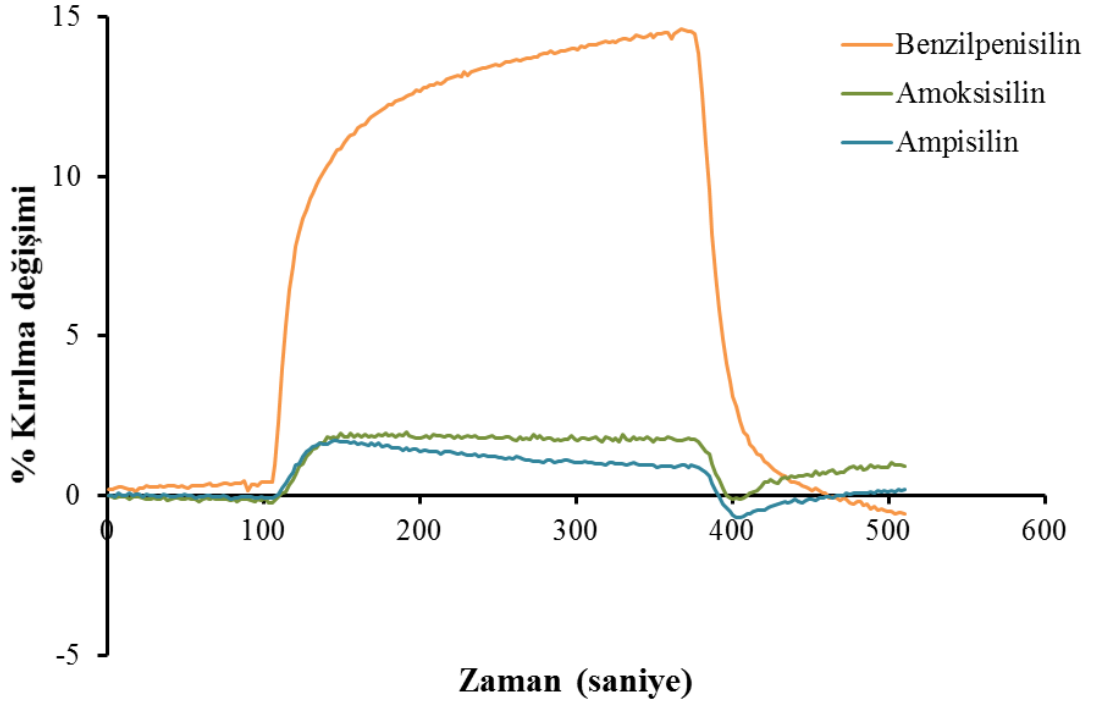


(b)

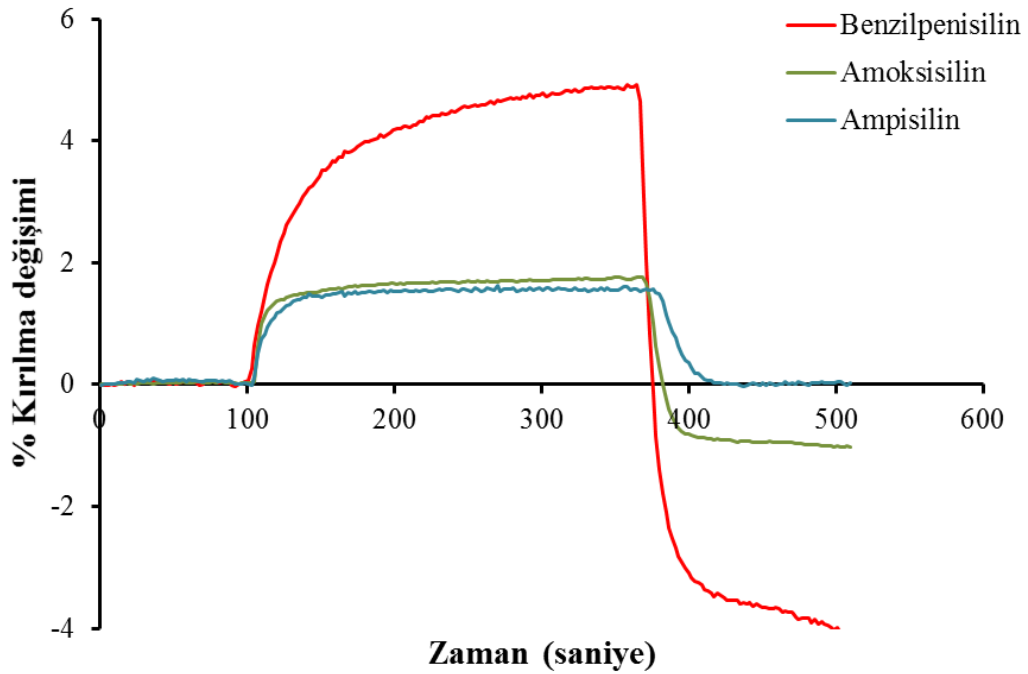


(c)

Şekil 4.19 Benzilpenisilin iki boyutlu (2D) ve üç boyutlu (3D) yapısı (a), Amoksisilin iki boyutlu (2D) ve üç boyutlu (3D) yapısı (b), Ampisilin iki boyutlu (2D) ve üç boyutlu (3D) yapısı (c).



Şekil 4.20 MIP-GO SPR sensörün benzilpenisilin, amoksisilin ve ampisilin çözeltileri için verdiği sensorgram. Benzilpenisilin derişimi: 100 ppb.



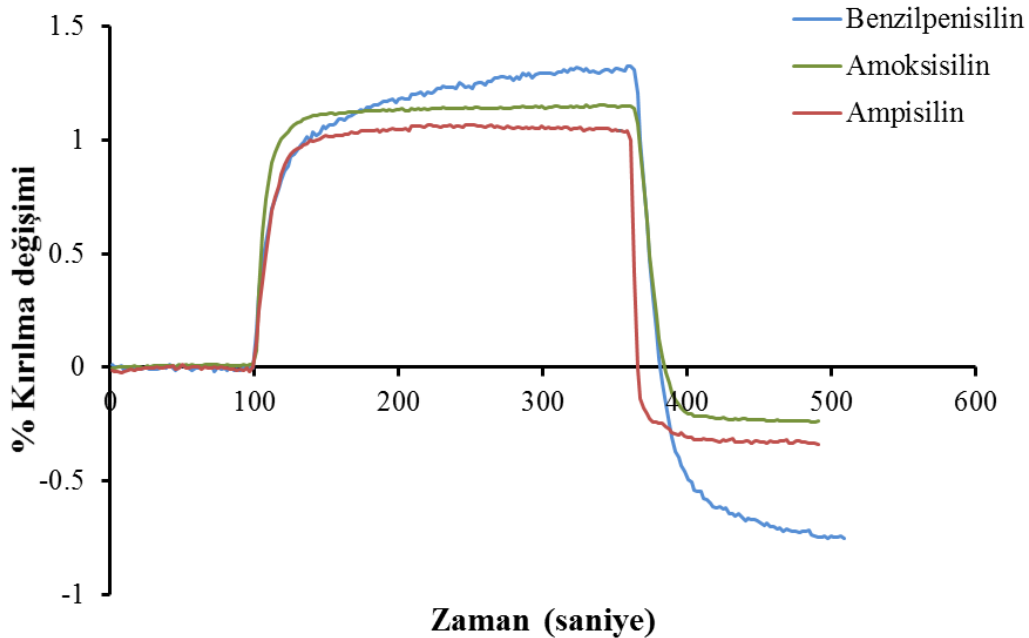
Şekil 4.21 MIP SPR sensörün benzilpenisilin, amoksisilin ve ampisilin çözeltileri için verdiği sensorgram. Benzilpenisilin derişimi: 100 ppb.



Şekil 4.20'deki MIP-GO SPR sensörün amoksisilin ve ampisilin için verdiği sensör yanıtlarının sensorgramları incelendiğinde, spesifik olmayan bağlanmalar, düşük %kırılma sinyal yanıtları ile doğrulanmış olup MIP-GO SPR sensörün benzilpenisilini seçici bir şekilde tayin ettiği tespit edilmektedir. Şekil 4.21 ise MIP SPR sensör için seçicilik çalışmalarını göstermektedir. GO içermeyen MIP SPR sensörün benzilpenisilini MIP-GO SPR sensörden yaklaşık 3 kat daha az seçici tayin ettiği tespit edilmiştir.

#### 4.5. MIP-GO SPR sensörün baskılama etkinliğinin belirlenmesi

MIP-GO SPR sensörün benzilpenisilin baskılama verimliliği benzilpenisilin kullanılmadan hazırlanan NIP-GO SPR sensör ile karşılaştırılarak gösterilmiştir. NIP-GO SPR sensörün seçicilik katsayısı aynı şekilde amoksisilin ve ampisilin (100 ppb) çözeltileri için hesaplandığında, NIP-GO sensörün benzilpenisilini amoksisiline göre 1.16 kat, ampisiline göre 1.28 kat seçici tayin ettiği belirlenmiştir. Şekil 4.22 NIP-GO SPR sensörün sırası ile amoksisilin ve ampisilin çözeltileri için verdiği sinyal yanıtlarının sensorgramlarını göstermektedir.

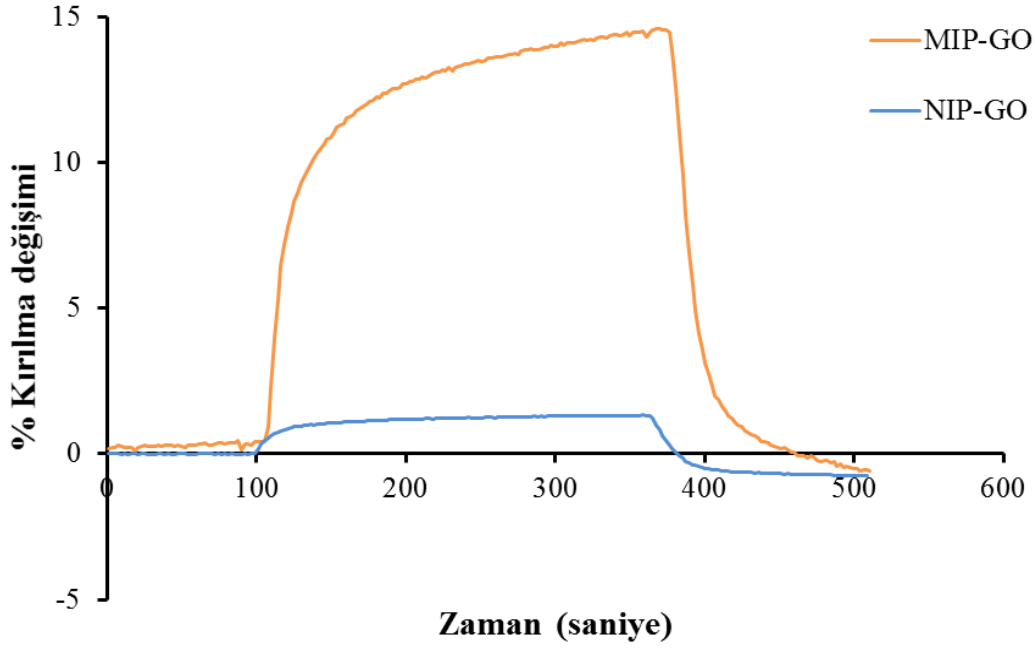


Şekil 4.22 NIP-GO SPR sensörün benzilpenisilin, amoksisilin ve ampisilin çözeltileri için verdiği sensorgram. Benzilpenisilin derişimi: 100 ppb.

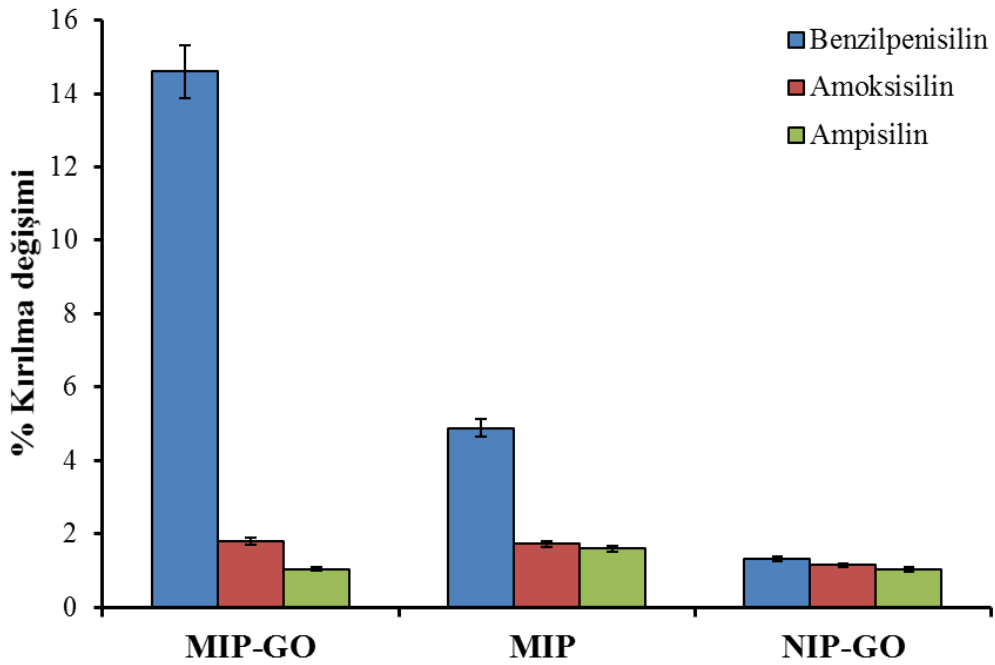
MIP-GO SPR sensörün baskılama verimliliğini hesaplamak için, MIP-GO SPR sensörün benzilpenisilin taininde elde edilen sensör yanıtının sayısal değeri, NIP-GO SPR sensörün benzilpenisilin taininde elde edilen sensör yanıtının sayısal değeri karşılaştırıldı ve sonuçlar incelenerek değerlendirildi. Tain işlemleri için hem MIP-GO SPR sensör hemde NIP-GO SPR sensör 100 ppb benzilpenisilin ile etkileştirildi. Şekil 4.23 benzilpenisilin baskılanmış MIP-GO SPR sensörün ve benzilpenisilin baskılanmamış NIP-GO SPR sensörün 100 ppb benzilpenisilin için verdiği sinyal cevaplarının, %kırılma-zaman grafiklerinin çizilmesiyle elde edilen sensorgramlarının karşılaştırılması göstermektedir. Şekil 4.23 grafiği incelendiğinde düşük sinyal şiddetinin sayısal değerinden NIP-SPR sensörün benzilpenisilin ile kayda değer bir etkileşim göstermediği tespit edilmiştir. Benzilpenisilin baskılanmış MIP-GO SPR sensörün benzilpenisilin için verdiği sinyal yanıtının sayısal değeri 14.6 olup, benzilpenisilin baskılanmamış NIP-GO SPR sensörün benzilpenisilin için verilen sinyal yanıtının sayısal değeri 1.32 olarak tespit edilmiştir. Benzilpenisilin için MIP-GO ve NIP-GO SPR sensörlerin bağıl seçicilik değerleri kıyaslandığında MIP-GO SPR sensörün NIP-GO SPR sensöre göre amoksisilini 7.04 kat, ampisilini 10.9 kat seçici tain ettiği tespit edilmiştir. Baskılamanın etkin bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediğinin göstergesi olan baskılama faktörü  $IF: \Delta R_{MIP} / \Delta R_{NIP} = 11.06$  olarak hesaplanmış, elde edilen yüksek sayısal değer etkin bir baskılama işleminin başarı ile gerçekleştirildiğini göstermiştir. Çizelge 4.4, MIP-GO ve NIP-GO SPR sensörlerin amoksisilin ve ampisilin taininde gösterilen seçicilik ve bağıl seçicilik katsayılarının özetlemektedir. Şekil 4.24 ise MIP-GO, MIP ve NIP-GO SPR sensörün 100 ppb benzilpenisilin çözeltisi için verdiği zamana karşı %kırılma değerlerini gösterir.

Çizelge 4.4 MIP-GO ve NIP-GO SPR sensörlerin benzilpenisilin taini için seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları.

|                 | MIP-GO     |       | NIP-GO     |      |      |
|-----------------|------------|-------|------------|------|------|
|                 | $\Delta R$ | k     | $\Delta R$ | k    | k'   |
| Benzilpenisilin | 14.6       | -     | 1.32       | -    | -    |
| Amoksisilin     | 1.79       | 8.16  | 1.14       | 1.16 | 7.04 |
| Ampisilin       | 1.04       | 14.04 | 1.03       | 1.28 | 10.9 |



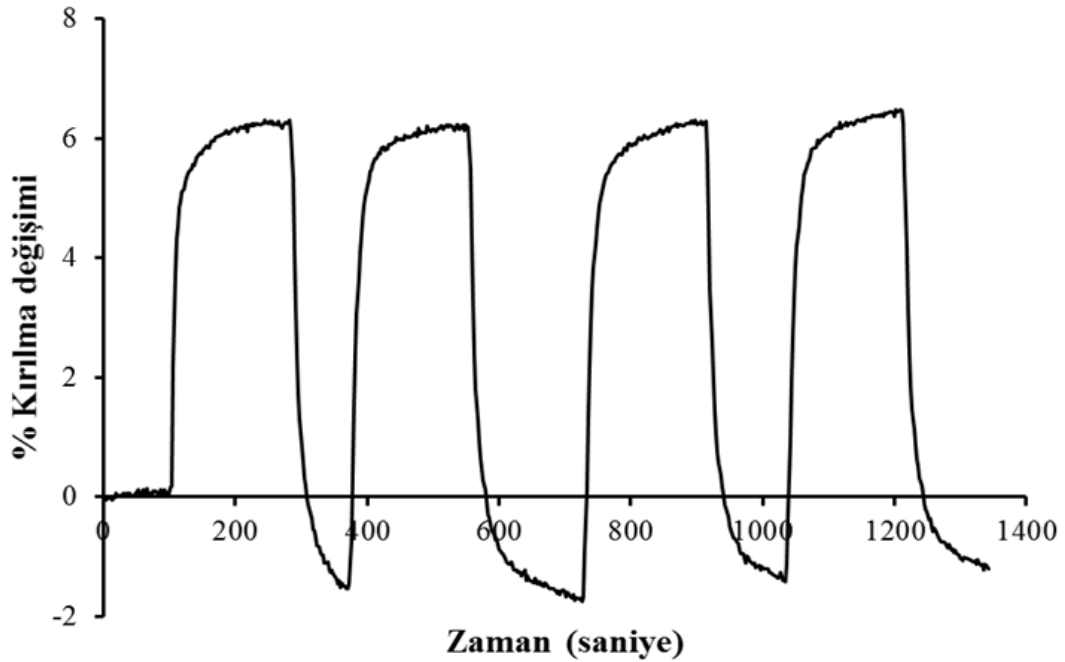
Şekil 4.23 MIP-GO ve NIP-GO SPR sensörün benzilpenisilin çözeltisi için verdiği sensorgram. Benzilpenisilin derişimi: 100 ppb.



Şekil 4.24 MIP-GO, MIP ve NIP-GO SPR sensörlerin seçicilik örnekleri için verdiği %kırılma değişimi değerlerini gösteren sensorgram. Benzilpenisilin derişimi: 100 ppb.

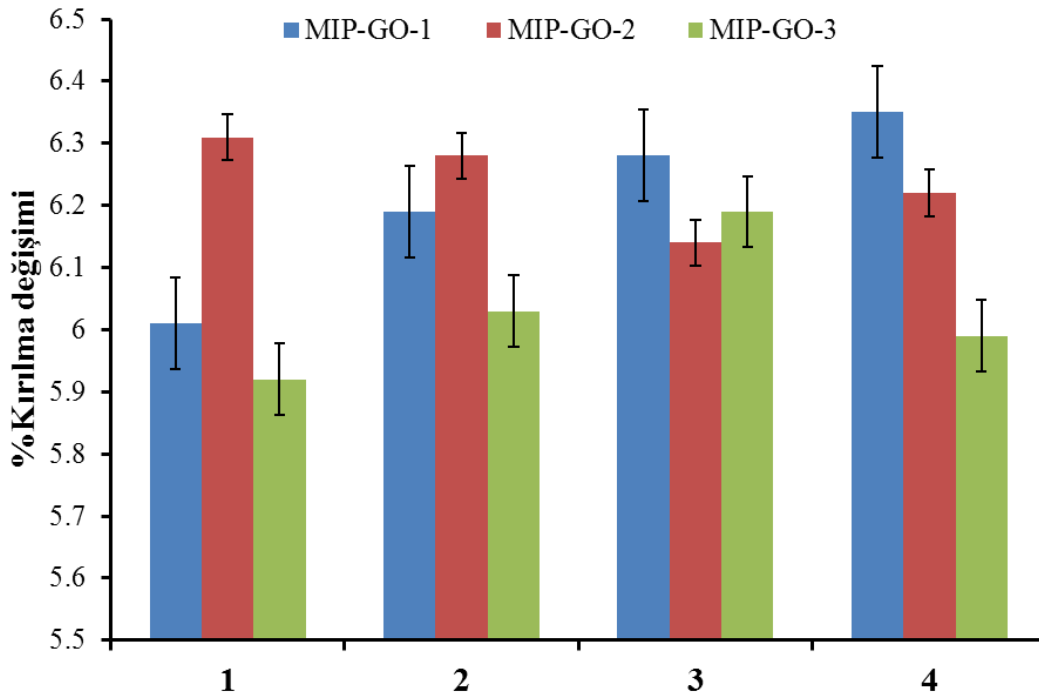
#### 4.6. MIP-GO SPR sensörünün tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi

Biyolojik sistemlerdeki moleküllerin analizleri gerçekleştirilirken uygulanan rejenerasyon aşamasında kolayca denatüre olmaları sebebi ile sensörlerde tanıma elemanı olarak kullanılmaları oldukça zordur. MIP'lerin ise polimerik yapıları oldukça kararlı olduğundan zorlu çevresel şartlara dayanıklıdırlar. Bu özellikleri sayesinde MIP temelli SPR sensörler yaygın kullanım alanı bulmaktadırlar. Benzilpenisilini tayin etme üzere üretilmiş olan MIP-GO SPR sensör sisteminin tekrarlanabilir bir şekilde benzilpenisilini tayin edip edemediğini incelemek için tekrarlanabilirlik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 25 ppb derişimdeki benzilpenisilin çözeltisi SPR sistemine arka arkaya dört tekrarlı uygulanmış, MIP-GO SPR sensör sistemin verdiği sinyal yanıtı %kırılma-zaman grafiği şeklinde çizilmiştir. Şekil 4.25 MIP-GO SPR sensörün tekrarlanabilirliğini belirten sensorgramı göstermektedir. Şekil 4.25 incelendiğinde benzilpenisilin tayininde kullanılan MIP-GO SPR sensör sisteminin, benzilpenisilini tayin etme kapasitesinde kayda değer azalma (%1'den az) olmadığı görülmüş olup bu değer MIP-GO SPR sensörün tekrarlanabilir bir şekilde benzilpenisilin seçici tayin çalışmalarında kullanılabileceğini doğrulamaktadır. Çizelge 4.5 tekrarlanabilirliği gösteren kesinlik değerlerinin tek seferdeki ölçümünü gösterir.



Şekil 4.25 MIP-GO SPR sensörün tekrarlanabilirlik sensorgramı. Benzilpenisilin derişimi: 25 ppb.

MIP-GO SPR sensörün benzilpenisilini tayin ederken tekrarlanabilirliğini gösteren çalışmaların kesinlik değerleri istatistiksel olarak doğrulanmıştır. MIP-GO SPR sensörünün tekrarlanabilirlik çalışmaları için MIP-GO SPR sensör üç part halinde hazırlanmış olup, her parti için gün-içi testler tek seferde dört tekrarlı olmak üzere her parti için en az üç sefer gerçekleştirilmiştir. Sonuçların doğruluğunu göstermek amacı ile tekrarlanabilirlik çalışmalarından elde edilen sinyal yanıtlarının değerlerinin yüzde görel standart sapma (%RSD) değeri hesaplanmış ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Gerçekleştirilen deneylerin sonuçlarına ait %RSD değerlerinin <1.0'den daha düşük rapor edilmesi, MIP-GO SPR sensörün benzilpenisilini yüksek tekrarlanabilirlik ile seçici ve hassas tayin edebildiğini doğrulamaktadır. Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6 da MIP-GO SPR sensörün 25 ppb derişimindeki benzilpenisilini tayin etme çalışmalarının dört tekrarlı olan analizlerinin kesinlik değerleri gösterilmektedir. Çizelge 4.5 tekrarlanabilirliği gösteren tek seferdeki ölçümün dört tekrar için kesinlik değerlerini göstermekte iken, Çizelge 4.6 üç parti halinde hazırlanan MIP-GO SPR sensörün tek seferdeki dörtlü tekrarını göstermektedir. Şekil 4.26 ise üç partide hazırlanan MIP-GO SPR sensörlerin aynı derişimdeki (25 ppb) benzilpenisilinin tayinini gerçekleştirirken oluşturulan dört tekrarlı ölçümlerinin sonuçlarını göstermektedir.



Şekil 4.26 Farklı günlerde hazırlanan MIP-GO SPR sensörü için gün-içi %kırılma değışim değerlerini gösteren grafik. Benzilpenisilin derişimi: 25 ppb.

Çizelge 4.5 Tekrarlanabilirliğin kesinlik değerleri.

| Derişim (ppb) | %Kırılma | İstatiksel Analiz |
|---------------|----------|-------------------|
| 25            | 6,25     |                   |
| 25            | 6,19     | Ortalama- 6,23    |
| 25            | 6,33     | STD-0,03          |
| 25            | 6,28     | % RSD- 0,01       |

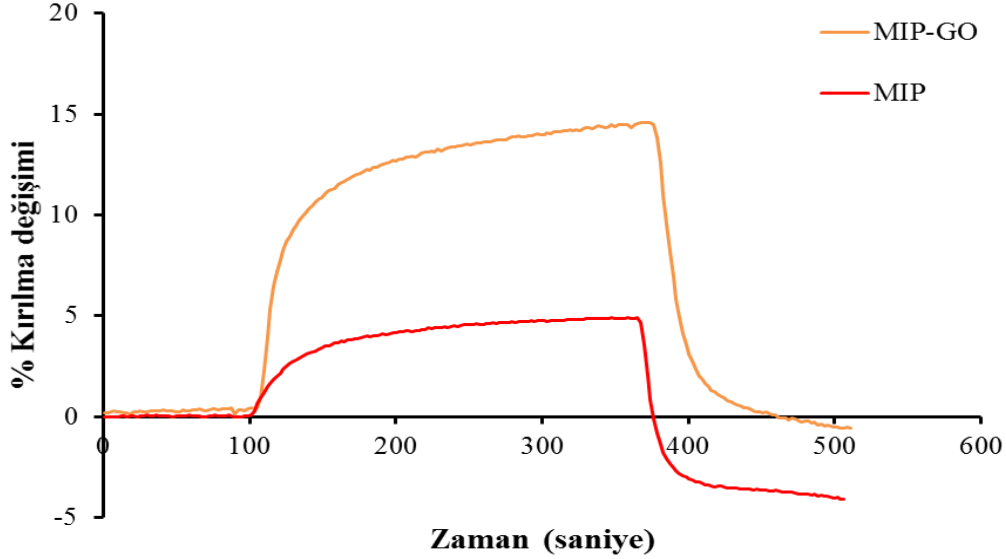
Çizelge 4.6 Gün-içi kesinlik değerleri.

| Derişim (ppb) | %Kırılma | %Kırılma | %Kırılma | Ortalama<br>%RSD |
|---------------|----------|----------|----------|------------------|
| 25            | 6,01     | 6,31     | 5,92     |                  |
| 25            | 6,19     | 6,28     | 6,03     |                  |
| 25            | 6,28     | 6,14     | 6,19     |                  |
| 25            | 6,35     | 6,22     | 5,99     |                  |
| % RSD         | 0,02     | 0,07     | 0,11     | 0,2              |

#### 4.7. GO'in GO-SPR sensörün hassasiyetini artırıcı etkisi

Moleküllerin hassas tayinini gerçekleştirmek amacı ile sinyal artırıcı olarak kullanılan iletken özellik gösteren monomerler, karbon nanotüpler, grafen oksitler sıklıkla uygulama alanı bulmaktadırlar. Bu çalışma kapsamında benzilpenisilin tayini için GO eklenerek hazırlanan MIP-GO SPR sensör, beklendiği üzere artan benzilpenisilin derişimi ile tutarlı olarak artan bir SPR cevabı vermiştir. GO'nun etkisini incelemek için GO eklenmeden hazırlanan MIP SPR sensör ile GO eklenerek hazırlanan MIP-GO SPR sensörün benzilpenisilin tayini için verdikleri sinyal yanıtları karşılaştırıldığında, GO'nun etkin bir şekilde sinyal şiddetini artırdığı tespit edilmiştir. Bu amaçla moleküler baskılama teknolojisi kullanılarak benzilpenisilin seçici tayini hedeflenirken GO eklenerek tayin limiti düşürülmüştür. Benzilpenisilin baskılanması için hidrofobik MAPA monomeri kullanılarak amino asit temelli yeni bir SPR sensör üretilmiştir. GO'lerin eklenmesi ile sinyal cevabının yaklaşık 3 kat arttığı tespit edilmiş olup, GO'nu sinyal artırıcı özelliğinin MIP-GO SPR sensörünün hassasiyetini artırdığı belirlenmiştir. Şekil 4.27, GO'nun sinyal artırıcı etkisini göstermektedir. Şekilde hem MIP-GO SPR sensörün hem GO eklenmemiş MIP SPR sensörün 100 ppb derişimdeki benzilpenisilin çözeltisi için çizilen

sensorgramın grafiği gösterilmektedir. Zamana karşı çizilen %kırılma değişim değerlerinden, GO'nu sinyal cevabını artırdığı açıkça görülmektedir.



Şekil 4.27 GO'nun benzilpenisilin tayini için sinyal yanıtını artırıcı etkisini gösteren sensorgram. Benzilpenisilin derişimi: 100 ppb.

#### 4.8. Süt örneğinden benzilpenisilin tayini

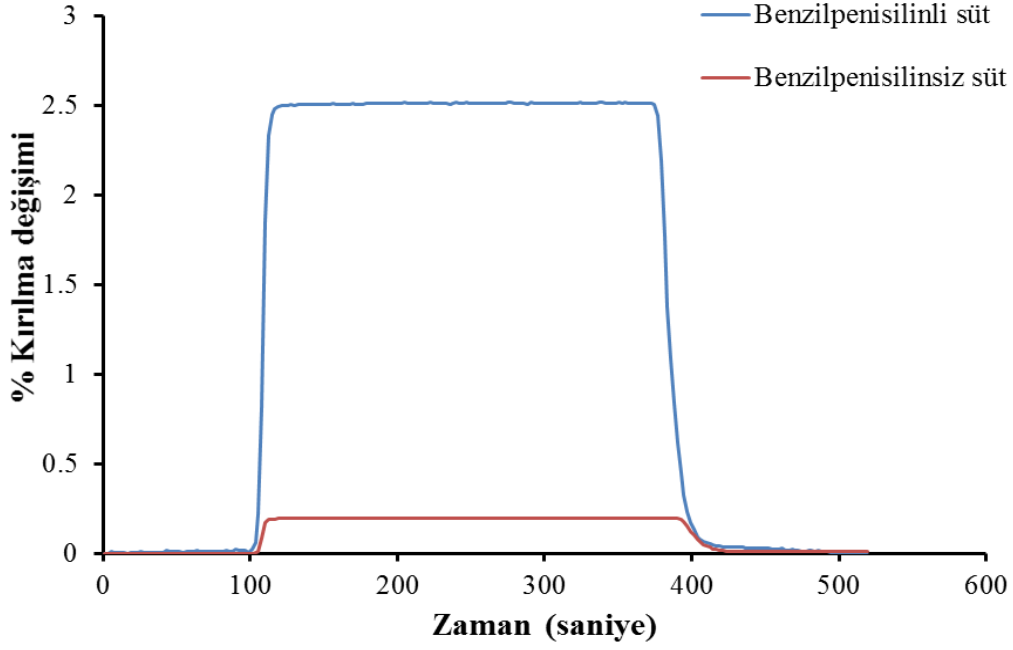
Benzilpenisilin antibiyotiği  $\beta$ -laktam sınıfına ait olup bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle süt veren ineklerde görülen ve süt ineklerini enfeksiyon hastalıkları açısından risk altında bırakan meme iltihabı mastisit korunmada antibiyotik tüketimi şart olup, oldukça etkilidir [98]. Ancak yapılan incelemelere göre mastisit kontrolüne yönelik yanlış uygulanan ilaçlar sütte ilaç kalıntılarına neden olmaktadır (WHO 1969). FAO/WHO 1969 yılında sütte bulunması gereken ilaç derişim limiti belirlemiştir. Güncellenen kalıntı limitleri ve piyasaya sokulan yeni ilaçlar ile halk sağlığı için önemli bir besin maddesi olan süt ve süt ürünlerinin kontrolüne yönelik girişimlerde bulunulması önem arz eder [93]. İneklere damar yolu ile uygulanan benzilpenisilin antibiyotiğinin %90'a kadar olan kısmı, idrar yoluyla 6 saat sonunda hayvanın vücudundan uzaklaştırılmasına rağmen, 90 saat sonra bile halen hayvan memesinde antibiyotik kalıntısı tespit edilebilmektedir.

Tez çalışması kapsamında gerçek örnek olarak seçilen süt içerisindeki benzilpenisilin

seçici tayini için hazırlanmış olan benzilpenisilin baskılanmış MIP-GO SPR sensör ile antibiyotik tayini gerçekleştirilmiştir. Böylelikle aynı zamanda süt içerisinde bulunan ve matriks etkisi yaratan diğer moleküllerin varlığında, benzilpenisilinin seçici ve hassas tayini gerçekleştirilmiştir. 6.25 ppb derişimdeki benzilpenisilin eklenmiş süt örneği hazırlanarak, MIP-GO SPR sensör sistemine uygulanmıştır. Böylelikle hazırlanmış olan MIP-GO SPR sensör, benzilpenisilin antibiyotiğini süt örneği içerisinde bulunan diğer moleküllerden seçici ve spesifik bir şekilde ayırt ederek, yüksek hassasiyetle tayin etmede kullanılmıştır. Derişimi bilinen benzilpenisilinin süt örneği içerisinde bulunan miktarının uygulanan SPR yöntemi ile tespit edilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla MIP-GO SPR sensör benzilpenisilin katkılanmış süt numunesi ile etkileştirilmiş olup %kırılma değeri not edilmiştir. Şekil 4.28 süt örneğine benzilpenisilin eklenmiş sensorgram olup elde edilen 2.51'lik %kırılma değeri, aynı derişimdeki benzilpenisilin içeren sulu çözelti örneğindeki rapor edilen %kırılma değerinden (%kırılma değişim=2.6) daha düşük sinyal cevabı elde edildiği görülür. Aynı derişimde benzilpenisilin içeren çözeltiler uygulanmasına rağmen süt örneği için daha düşük rapor edilen benzilpenisiline ait sinyal şiddeti süt örneğinde doğal olarak bulunan moleküllerin sterik etki yaratarak yarışmacı ajanlar gibi davranmasıdır. Aynı şekilde benzilpenisilin katkılanmamış süt örneği MIP-GO SPR sensör sistemine uygulanmış ve katkılanmış olandan kayda değeri az sinyal cevabı alınmıştır (%kırılma değişim=0.2).

Planlanan çalışma ile hem sulu çözeltiden hem de süt numunelerinden seçici ve hassas benzilpenisilin tayinini gerçekleştirmek amacı ile MIP temelli SPR sensör sisteminin üretilmesi tasarlanmıştır. Sinyal şiddetini artırmak amacı ile eklenen GO, MIP-SPR sensörün hassasiyetini artırırken moleküler baskılama yöntemi seçiciliği artırmaktadır. Böylelikle hazırlanan tekrar kullanılabilir işlevselleştirilmiş nanomalzeme tabanlı SPR sensör sistemi ile herhangi bir etiketleme ve referans moleküle ihtiyaç duymadan benzilpenisilin antibiyotiği süt örneği gibi karmaşık matriks ortamında bile seçici ve hassas bir şekilde tayin edilmiştir. Bu amaçla benzilpenisilin molekülünün baskılanması için fonksiyonel hidrofobik MAPA monomeri kullanılmış ve amino asit temelli MIP-GO SPR sensör hazırlanmıştır. Böylelikle benzilpenisilin tayini için herhangi bir uzatıcı kola yada ligand immobilizasyonu gibi karmaşık işlemlere ihtiyaç duyulmadan tek basamakta seçici ve hassas tayin gerçekleştirilmiştir.





Şekil 4.28 MIP-GO SPR sensörün benzilpenisilinli ve benzilpenisilinsiz süt örnekleri için sensorgram. Benzilpenisilin derişimi: 6.25 ppb

MIP temelli fonksiyonel malzemeler ile hedef moleküllere spesifik baskılama boşlukları oluşturulduğu için hedef molekülün seçici tayin işlemi gerçekleştirilebilir. Yaygın tanıma elemanı olarak kullanılan enzimler, antikorlar, nükleik asitler, aptamerler gibi moleküller ile kıyaslandığında, MIP'ler kolay, ucuz ve hızlı sentezlenebilmekte olup kararlı yapıya sahiptirler. Benzilpenisilin'in tayininde kullanılan afinite temelli biyoteknolojik malzemeler oldukça önem taşımakta olup, Xie ve arkadaşları floresan bazlı bir fiber optik biyosensör geliştirerek benzilpenisilini tayin etmişlerdir [99]. Florofor özellik gösteren karbon noktalar ile moleküler olarak baskılanmış polimer içeren floresan sensör, Jalili ve arkadaşları tarafından hazırlanmış ve süt içerisinde bulunan benzilpenisilin'in tayini gerçekleştirilmiştir [27]. Kwon ve arkadaşları ise kolorimetrik yöntem kullanarak platin nanoparçacıkları ile sütte bulunan benzilpenisilin kalıtısını tayin etmişlerdir [100]. Benzilpenisilin'in iki boyutlu fotonik kristal hidrojel ile kolorimetrik tayini Wang ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir [101]. Aghamirzaei ve grubu altın nanopartikülleri kullanarak beta-laktam antibiyotik olan benzilpenisilini kolorimetrik olarak tespit etmek için çin marul yaprağı ekstraktından (indirgeyici olarak) altın nanopartikülleri sentezlemiştir [102]. Cacciatore ve arkadaşları optik sensörü benzilpenisiline afinite gösteren protein kullanarak geliştirmişler ve sütte bulunan  $\beta$ -laktam antibiyotikleri 5.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  LOD değeri ile tayin etmişlerdir [34].

Özetle bu tez çalışması kapsamında, benzilpenisilin tayinine yönelik GO ile duyarlılığı, MIP ile seçiciliği artırılmış MIP-GO SPR sensör hazırlanmıştır. GO eklenerek SPR sinyal artırıcı etki sağlanırken seçicilik benzilpenisilin molekülü baskılanarak sağlandı. MIP-GO SPR sensör ile herhangi bir ekstra uzatıcı kol ya da ligand immobilize edilmesine ihtiyaç duyulmadan benzilpenisilin seçici ve hassas (LOD: 0.021 ppb ve LOQ: 0.069 ppb) bir şekilde tayin edilmiştir. Moleküler baskılama yöntemiyle hazırlanan MIP-GO SPR sensör, benzilpenisilini benzer moleküller olan amoksisilin ve ampisilin moleküllerinden sırasıyla 8.16 ve 14.04 olarak kat seçici tayin ederken, NIP-GO SPR sensöre göre benzilpenisilini amoksisilin ve ampisilin moleküllerinden sırası ile 7.04 ve 10.9 kat yüksek bir bağıl seçicilik değeri tayin etmiştir. Çizelge 4.7 benzilpenisilin tayininde kullanılan optik sensör çalışmalarını rapor etmektedir.

Çizelge 4.7 Benzilpenisilin tayini için kullanılan optik sensörler.

| Malzeme  | Yöntem                          | LOD                     | Ref.       |
|--|---------------------------------|-------------------------|------------|
| Penisilinaz                                      | Florimetrik                     | -                       | [99]       |
| B/YCDs@mMIPs                                     | Florimetrik                     | 0.34 nM                 | [27]       |
| Fluorasans immunoassay                           | Florimetrik                     | 2.4µg/L                 | [103]      |
| Platin-nanopartikül                              | Kolorimetrik                    | 1 ng mL <sup>-1</sup>   | [100]      |
| Penisilinaz fonksiyonlu fotonik kristal hidrojel | Kolorimetrik                    | -                       | [101]      |
| Altın nanopartiküller ile konjuge antikor        | Lokalize yüzey plazmon rezonans | 1 nM                    | [102]      |
| Immuno-nanoaltın                                 | Rezonans saçılması              | 0.78 ng/mL              | [104]      |
| Penisilin-bağılı protein 2x                      | Yüzey plazmon rezonans          | 5.2 µg kg <sup>-1</sup> | [34]       |
| MIP-AuNPs  | Yüzey plazmon rezonans          | 0.0017 ppb              | [105]      |
| NpMIPs   | Yüzey plazmon rezonans          | -                       | [106]      |
| MIP-GO   | Yüzey plazmon rezonans          | 0.021 ppb               | Bu çalışma |

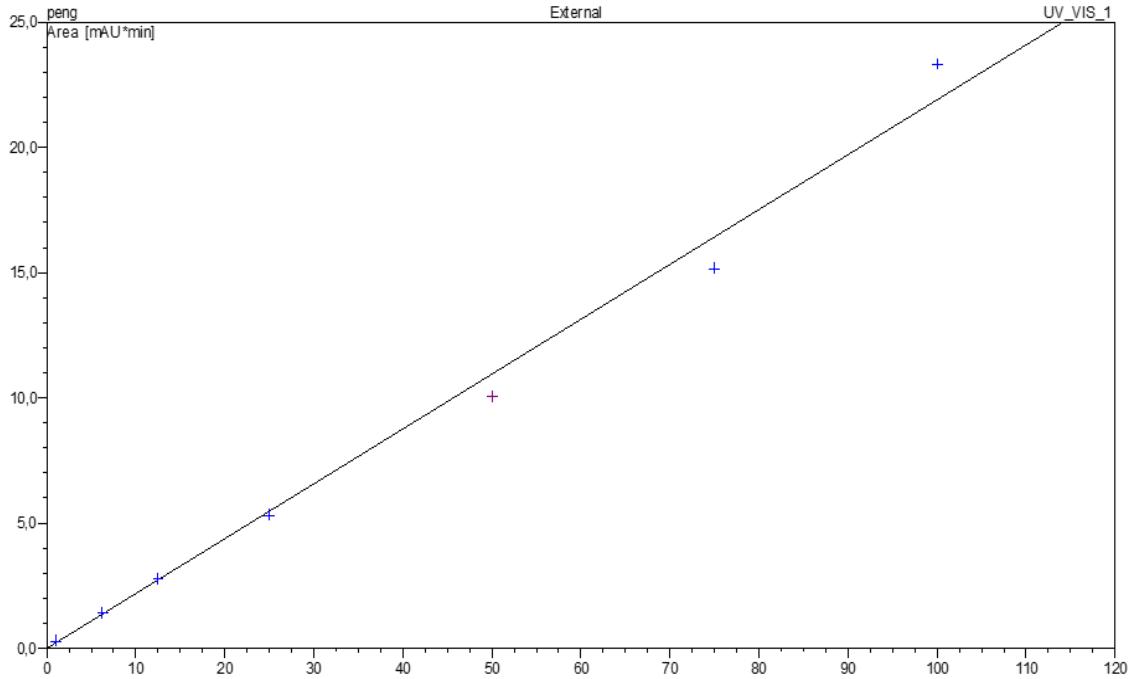
#### 4.9. Validasyon çalışmaları

Beta-laktam yapısındaki antibiyotiklerden olan benzilpenisilinler, insanlarda oluşan enfeksiyonların tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Yiyeceklerden ve sulardan insana geçen antibiyotiklere sürekli olarak maruz kalınması durumunda antibiyotiğe dirençli bakteriler gelişmekte ve bu insanlarda yüksek ölüm oranlarına neden olmaktadır. Veterinerler günümüzde çiftlik hayvanlarında hem büyümeye yardımcı olmak hemde tedavi etmek amacı ile farklı özelliklerdeki antibiyotikleri yaygın olarak kullanmaktadırlar. Ancak hayvanlarda kalan antibiyotik kalıntılarının süt hayvanları aracılığı ile insanlara geçmesi, insan sağlığını tehdit etmektedir. Halk sağlığını korumaya yönelik otoriteler, sağlık için oluşacak riskleri ve ekonomik mali kayıpları bertaraf etmek için ilaç kalıntısını izlemeye ve kontrol etmeye yönelik programlar yürütmektedirler. Sütte bulunan antibiyotik kalıntılarını tayin edebilen tarama testleri ticari olarak satılmaktadır. Ayrıca izin verilen maksimum kalıntı limitlerindeki veya bu limitlerin üzerindeki benzilpenisilinlerin miktarı çeşitli yöntemler ile tayin edilmekte olup, bunlar arasında HPLC, kapiler elektroforez, spektrofotometre ve elektrokimyasal yöntemler gibi geleneksel yöntemler bulunmaktadır. Ek olarak yüksek hassasiyet ve seçiciliğine sahip spektroskopik yöntemlerin kullanıldığı tayin yöntemleride uygulanmaktadır. Ancak bu tayin yöntemleri maliyetli olup, karmaşık örnek hazırlama süreçleri gerektirir. Analiz süreleri uzun olup, analizleri gerçekleştirmek için alanında uzman personele ihtiyaç duyulması gibi dezavantajlara sahiptirler. Süt ürünlerinde bulunan antibiyotik kalıntılarının gerçek zamanlı tespit edilmesi çözülmesi gereken sorunlardan birini teşkil etmektedir. Optik temelli sensörlerin gıdalarda bulunan antibiyotikleri yerinde tayin etmeye yönelik geliştirilmesi için yapılan çalışmalar son zamanlarda ivme kazanmıştır. Sensörler nanomalzemeler yada polimerler kullanılarak hedef molekülü düşük tayin limitlerinde spesifik ve seçici tanımaya yönelik olarak hazırlanabilirler ve bu özellik onları avantajlı kılar [107]. SPR tekniği ile bir metal film üzerinde oluşan moleküler bağlanma işlemleri etiket kullanmadan izlenebilmektedir.

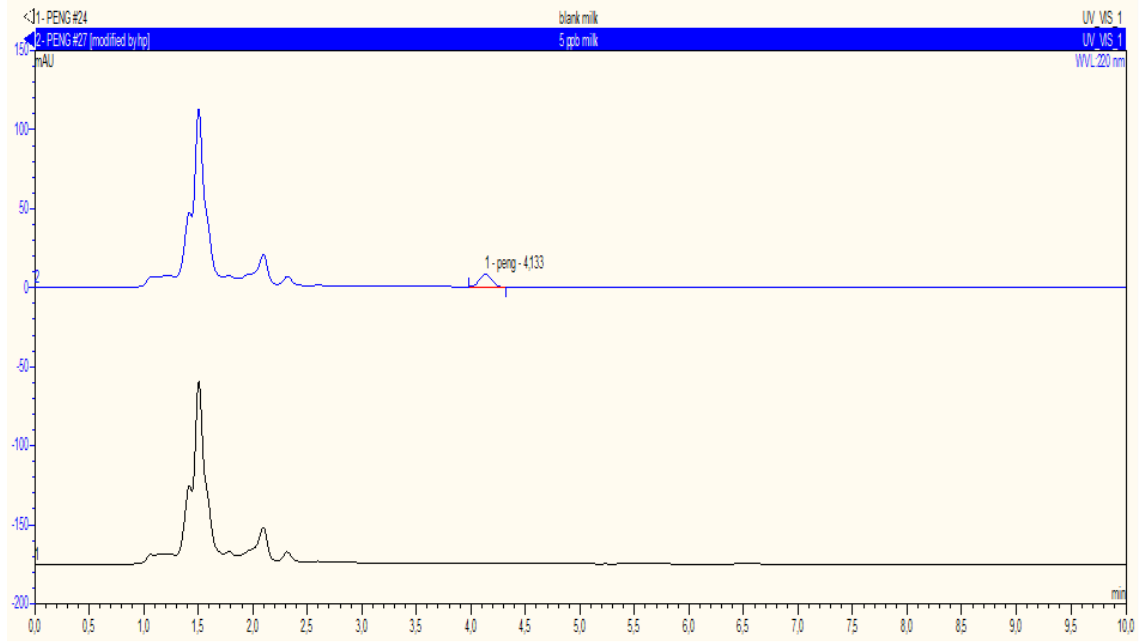
Bu araştırma ile, moleküler baskılama temelli, SPR tabanlı MIP-GO SPR sensör hazırlanarak basit, etkili, hassas, toksik olmayan ve çevre dostu bir yöntem oluşturulmuş ve benzilpenisilin antibiyotiğinin seçici ve hassas tayini için kullanılmıştır. Öncelikle benzilpenisilin antibiyotiği MIP-GO SPR sensör çipi oluşturmak için moleküler olarak baskılanmış, baskılama işleminden sonra hedef molekül benzilpenisilin antibiyotiği desorpsiyon işlemi ile uzaklaştırılmıştır. Benzilpenisilin farklı derişimlerdeki çözeltileri

SPR sensör sistemine uygulanarak 270 saniye süresince rezonans açısındaki kayma değeri ölçülerek SPR sensörü ile reaksiyona giren benzilpenisilin tayin edilmiştir. Ayrıca, MIP-GO SPR sensör süt örneğindeki benzilpenisilini seçici olarak tayin etmiş, tayin işlemi HPLC çalışmaları ile doğrulanmıştır. HPLC’de kalibrasyon eğrisi oluşturmak için 1, 6.25, 12.5, 25, 50 ve 100 ppb derişimlerde hazırlanan benzilpenisilin çözeltileri kullanılmıştır. Süt örneğine eklenmiş ve eklenmemiş benzilpenisilin antibiyotiği ters fazlı C18 kolonu kullanılarak tayin edilmiştir.

Benzilpenisilin stok olarak çözeltilisi (1000 ppb), 10 mM amonyum asetat:asetonitril (75:25, v/v) karışımı içinde hazırlanmış olup, kalibrasyon için kullanılan çözeltiler hazırlanan stok çözeltilisinin seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. İzokratik elüsyon sistemi kullanılarak, 220 nm’de yapılan analizler ile benzilpenisilin miktarı doğrulanmıştır. Stok çözeltili hazırlamada kullanılan, 10 mM amonyum asetat ve asetonitril çözeltilisi (75:25, v/v) mobil faz olarak kullanılmıştır. 6.25 ppb derişimde olacak şekilde benzilpenisilin eklenmiş süt çözeltilisindeki benzilpenisilin miktarı kalibrasyon eğrisi kullanılarak tespit edilmiştir. Kalibrasyon eğrisi ve 6.25 ppb benzilpenisilin katkılanmış ve katkılanmamış süt numunesine ait kromatogram Şekil 4.29’ de gösterilmiştir.



(a)



(b)

Şekil 4.29 Benzilpenisilinin HPLC ile analizi. 1.0-100 ppb benzilpenisilin çözeltisi için kalibrasyon eğrisi (a) ve 6.25 ppb benzilpenisilin katkılanmış ve katkılanmamış süt örneği için HPLC kromotogramları (b).

## 5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

- Benzilpenisilini seçici ve hassas tayin etmede kullanılan MIP-GO SPR sensör sinyali artırıcı benzilpenisilinin baskılanması ve GO'nin eklenmesi ile hazırlanmıştır.
- MIP-GO SPR sensör hazırlamada kullanılan fonksiyonel MAPA monomeri, hedef molekül benzilpenisilin ile MAPA/benzilpenisilin ön-kompleksini oluşturmak için kullanılmıştır.
- GO'nin TMSPM ile reaksiyonu gerçekleştirilerek nanofilm hazırlanırken polimerizasyonda kullanılacak olan yüzeye vinil grupları takılmıştır. GO içermeyen MIP SPR sensör hazırlanırken modifikasyon için sadece TMSPM kullanılmıştır.
- MIP-GO SPR sensör hazırlanmak için MAPA/benzilpenisilin ön-kompleksi, HEMA monomeri, EDMA çapraz bağlayıcısı karıştırılmış ve AIBN başlatıcısı ile nanofilm çip yüzeyinde oluşturulmuştur.
- Hedef molekül benzilpenisilinin, MIP-GO SPR sensörden uzaklaştırılması için desorpsiyon çözeltisi olarak 10 mM NaCl çözeltisi uygulanmıştır.
- Benzilpenisilin baskılanmamış NIP-GO SPR sensör, hedef molekül benzilpenisilin eklenmeden hazırlanmış ve MIP-GO SPR sensör hazırlanırken kullanılan aynı reçete kullanılmıştır.
- Çalışma kapsamında, GO kullanılarak hazırlanan MIP-SPR sensörünün duyarlılığını artırmaya yönelik yöntem geliştirilmiştir. Hassasiyeti artırmak amacı ile sinyal artırıcı olarak eklenen GO'nin etkisini görmek amacıyla GO eklenmeden üretilen MIP SPR sensör, MIP-GO SPR sensör hazırlanırken kullanılan reçete ile hazırlanmıştır.
- Benzilpenisilin baskılanmış MIP-GO, GO eklenmeyen MIP ve benzilpenisilin baskılanmamış NIP-GO SPR sensörlerin fonksiyonel grup karakterizasyonları için FTIR kullanılmıştır.
- MIP-GO, NIP-GO ve MIP SPR sensörlerin FTIR spektrumu karşılaştırıldığında, MIP-GO SPR sensörün polimerik yapısına benzilpenisilin molekülünün MAPA/benzilpenisilin ön-kompleksi ile ve GO'nin ise TMSPM ile GO-TMSPM kompleksi yaparak girdiği tespit edilmiştir.
- MIP-GO, NIP-GO ve MIP SPR sensörlerin FTIR spektrumu karşılaştırıldığında,

polimerik nanofilm yapısına hedef molekül olan benzilpenisilin ve sinyal artırıcı GO'in girdiği fonksiyonel grup analizlerinden tespit edilmiştir. MIP-GO SPR sensörün FTIR spektrumu incelendiğinde  $1175\text{ cm}^{-1}$  dalga sayısında görülen tetrasiklik yapıdaki -CN bağının polimerik nanofilm yapısına entegre olduğu görülmektedir. Aynı şekilde  $3495\text{ cm}^{-1}$ 'deki benzilpenisilin molekülünün -NH bağına ait gerilme bandı, nanofilm yapısına dahil olduğunu göstermektedir. NIP-GO daki MAPA amino asidine ait amid I bandı  $1476\text{ cm}^{-1}$  de görülürken, MIP-GO de aynı band  $1467\text{ cm}^{-1}$ 'e kaymıştır. GO'in MIP-GO'un yapısına dahil olduğu MIP ve MIP-GO spektrumları karşılaştırıldığında, GO ye ait  $1630$ 'daki  $\text{-C=C}$  bağına ait bandın MIP-GO spektrumunda  $1640\text{ cm}^{-1}$  de görüldüğü anlaşılmaktadır. Sonuç olarak hem benzilpenisilin hemde GO'nin MIP-GO SPR yapısına katıldığı anlaşılmaktadır.

- MIP-GO ve NIP-GO SPR sensörlerin yüzey karakterizasyon işlemleri AFM ve temas açısı ölçümleriyle gerçekleştirilmiştir.
- Benzilpenisilin baskılanmış MIP-GO SPR sensörünün yüzey derinliği AFM görüntüleri ile  $119\pm 1.46\text{ nm}$  olarak tespit edilirken, baskılanmamış NIP-GO sensörün yüzey derinliği  $112\pm 1.01\text{ nm}$  olarak tespit edilmiştir. GO içermeyen MIP SPR sensörün yüzey derinliği  $34\pm 2.49\text{ nm}$  ise olarak tespit edilmiştir. MIP-GO ve NIP-GO SPR sensörlerin AFM yüzey derinlik değerleri incelendiğinde benzilpenisilin başarı ile baskılandığı görülmektedir.
- Benzilpenisilin baskılanmış MIP-GO ve baskılanmamış NIP-GO SPR ve GO içermeyen ama benzilpenisilin baskılanmış MIP SPR sensörlerin yüzey ıslanabilirlik özellikleri temas açısı ölçümleri ile gerçekleştirilmiştir. MIP-GO SPR sensörün yüzeyi için elde edilen temas açısı değeri  $69^\circ\pm 1.8$  olarak kaydedilirken, NIP-GO SPR sensör için su temas açısı  $68.6^\circ\pm 0.4$  olup, MIP SPR sensör için kaydedilen temas açısı değeri ise  $70.8^\circ\pm 2.1$  dir. Benzilpenisilin baskılanması sonucu temas açısının artmış olmasının sebebi yüzeyin hidrofobikliğin artmış olmasıdır. Moleküler baskılama işlemi ile polimerik yapıya sokulan benzilpenisilin hidrofobik MAPA monomeri ile koordine olmaktadır.
- MIP-GO, NIP-GO ve MIP SPR sensörler hazırlandıktan sonra benzilpenisilin farklı derişimlerdeki çözeltilerinin uygulanması ile elde edilen sinyal yanıtlarının karşılaştırılabilmesi amacı ile çözeltiler MIP-GO SPR sensöre uygulanarak kinetik analizler gerçekleştirilmiştir. MIP-GO SPR sensör sırası ile artan derişimlerdeki

benzilpenisilin çözeltileriyle etkileştirilmiş ve artan derişimlerle birlikte %kırılma değişim değerlerinde de bir artış gözlemlenmiştir. SPR sensör ile örnekler arasındaki sürücü güç olan derişim değişimin artmasının bu artışa sebep olduğu tespit edilmiştir.

- MIP-GO SPR sensörün benzilpenisilinin 1-100 ppb derişim aralığındaki çözeltileri için alınan sinyal yanıtları ve MIP-GO SPR sensörün benzilpenisilin için, derişim-%kırılma değişimi grafiği incelendiğinde elde edilen doğrunun denklemi  $y=0.135x+1.8013$  ve korelasyon katsayısı  $R^2=0.9695$  olarak kaydedilmiştir. Denklemnin korelasyon katsayısının oldukça yüksek olması bağlanmanın yüksek afinite ile olduğunu gösterir. Yani MIP-GO SPR sensör, 1-100 ppb derişim aralığı için %96.65 doğruluk ile ölçüm yapabildiği söylenir.

- Langmuir modelinin MIP-GO SPR sensörün benzilpenisilini tayini etmede en uygun bağlanma modeli olduğu görülmüştür. Hesaplanan %kırılma değişim değerinin ( $\Delta R=13$ ) deneysel olarak bulunan %kırılma değişim değerine ( $\Delta R=14.6$ ) yakın olması bu teoriyi destekler. Langmuir denkleminin kullanımıyla hesaplanan bağlanma ( $K_A$ ) ve ayrılma ( $K_D$ ) değerleri sırası ile 6.754 ve 0.148 olarak elde edilmiştir.

- MIP-GO SPR sensörün benzilpenisilini seçici tayin ettiğini göstermek için, benzilpenisiline benzeyen yarışmacı ajanlar (amoksisilin ve ampisilin) kullanılmıştır.

- Hazırlanan MIP-GO SPR sensörün ve NIP-GO SPR sensörün benzilpenisiline karşı seçiciliğinin belirlenmesi için amoksisilin ve ampisilin örnek çözeltileri sensörler ile ayrı ayrı etkileştirilmiştir. MIP-GO SPR sensörün benzilpenisilin için verdiği %kırılma değişim değeri 14.6 iken, aynı derişimlerde hazırlanan amoksisilin ve ampisilin çözeltilerine verdiği %kırılma değişim değerleri sırasıyla 1.79 ve 1.04'dir. Bu sonuçlara göre hazırlanan MIP-GO SPR sensörün benzilpenisilini amoksisiline göre 8.16, ampisiline göre 14.04 kat hassas tayin edebildiği tespit edilmiştir. Bu duyarlılığın sebebi benzilpenisilinin 3-boyutlu yapısının baskılama işleminde yapıdaki belleğe aktarılması olabilir. Bu işlemin benzilpenisilinin seçici olarak tayinine olan etkisi, NIP-GO SPR sensörün benzilpenisilin ve yarışmacı ajanları (amoksisilin ve ampisilin) tayin ederken hesaplanan katsayılar ile belirlenmiştir. MIP-GO SPR sensör benzilpenisilini, NIP-GO SPR sensöre göre amoksisilin ve ampisilinden göre sırası ile 7.04 ve 10.9 kat daha seçici tayin etmiştir.

- Moleküler baskılama işleminin benzilpenisilinin seçici tayinine olan etkisi, benzilpenisilin baskılanmamış NIP-GO SPR sensörün benzilpenisilini tayin ederken



verdiği SPR sinyalinin %kırılma değişimi olarak ölçülmesiyle değerlendirilmiştir. MIP-GO ve NIP-GO SPR sensörlerin verdiği yanıtlara bakıldığında, %kırılma değişiminin değeri 14.6'dan 1.32'ye düştüğü görülmüştür. Baskılama faktörü  $IF:\Delta R_{MIP}/\Delta R_{NIP}=11.06$  olarak hesaplanırken bu sonucun baskılama işleminin etkin bir şekilde gerçekleştiğini gösterir.

- MIP-GO SPR sensörünün tekrarlanabilirlik çalışmaları için gün-içi testler yapılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Tekrarlanabilirliğin doğruluğunu göstermek için %RSD değeri hesaplandığında sonuçların <1.0'den daha düşük olduğu görülmüş ve MIP-GO SPR sensörünün benzilpenisilin tayininde verdiği sensör performansında kayda değer düşüş olmadığını görülmüştür.

- GO'nun, MIP-GO SPR sensörün hassasiyetini yükseltmek amacıyla kullanılması etkisini göstermek için GO eklenmeden hazırlanan MIP SPR sensörle karşılaştırılmıştır. Aynı derişim (100 ppb) için MIP-GO SPR sensörün verdiği %kırılma değişim değeri 14.6 iken, MIP SPR sensörün verdiği %kırılma değişim değeri 4.6 olup, GO'nun hassasiyeti 3.04 kat artırdığı tespit edilmiştir.

- Benzilpenisilin süt örneği içindeki miktarı, süt içerisinde doğal olarak bulunan bileşenlerin matriks etkisi yaparak penisilin tayini üzerindeki etkisi incelenerek tespit edilmiştir. Bu amaçla benzilpenisilin süt örneği içindeki miktar tayini için MIP-GO SPR sensör kullanılmış olup, bilinen benzilpenisilin içeren süt örneği benzilpenisilin süt örneğine eklenmesiyle hazırlanmıştır. Benzilpenisilin seviyesini belirlemek için, MIP-GO SPR sensör, benzilpenisilin eklenmiş (6.25 ppb olacak şekilde) süt örneği ile etkileştirilmiş ve %kırılma değişim değerinin 2.04 olduğu belirlenmiştir. Bu sonucun, 6.25 ppb benzilpenisilin içeren sulu çözelti uygulanarak elde edilen sinyal değerinden daha düşük şiddete (%kırılma=2.6) sahip olduğu tespit edilmiştir. Süt örneklerinde bulunan moleküller sterik etki yaratarak yarışmacı ajan gibi davranmış ve düşük yanıtına sebep olmuştur.

- MIP-GO SPR sensörün verdiği yanıtların doğrulanması HPLC analizleri ile gerçekleştirilmiştir. Süt örneklerindeki benzilpenisilin MIP-SPR sensörü ile seçici tayininin gerçekleşmesi, HPLC sistemi ile valide edilmiştir. Kalibrasyon grafiğini oluşturmak için 1-100 ppb derişim aralığındaki benzilpenisilin çözeltileri hazırlanarak HPLC sistemine verilmiştir. Benzilpenisilin içeren süt örneğinin hazırlanması için benzilpenisilin süte eklenmiş ve C18 kolonu ile analiz edilmiştir. 6.25 ppb derişiminde

benzilpenisilinli süt çözeltisindeki benzilpenisilin miktarını tespit edilerek, benzilpenisilinsiz süt rnekleleriyle kıyaslanmış ve validasyon işlemleri tamamlanmıştır.

## KAYNAKLAR

- [1] P. Boerlin, A. Wissing, F.M. Aarestrup, J. Frey, J. Nicolet, Antimicrobial Growth Promoter Ban and Resistance to Macrolides and Vancomycin in Enterococci from Pigs, *Journal of Clinical Microbiology*, 39 (2001) 4193-4195.
- [2] W. Liu, Z. Zhang, Z. Liu, Determination of  $\beta$ -lactam antibiotics in milk using micro-flow chemiluminescence system with on-line solid phase extraction, *Anal Chim Acta*, 592 (2007) 187-192.
- [3] A.C. Palmer, E. Angelino, R. Kishony, Chemical decay of an antibiotic inverts selection for resistance, *Nature Chemical Biology*, 6 (2010) 105-107.
- [4] G. Van Royen, P. Dubruel, S. Van Weyenberg, E. Daeseleire, Evaluation and validation of the use of a molecularly imprinted polymer coupled to LC-MS for benzylpenicillin determination in meat samples, *Journal of Chromatography B*, 1025 (2016) 48-56.
- [5] K. Kummerer, Resistance in the environment, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54 (2004) 311-320.
- [6] R. Denooz, C. Charlier, Simultaneous determination of five  $\beta$ -lactam antibiotics (cefepim, ceftazidim, cefuroxim, meropenem and piperacillin) in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection, *Journal of Chromatography B*, 864 (2008) 161-167.
- [7] O.G. Nagel, M.C. Beltrán, M.P. Molina, R.L. Althaus, Novel microbiological system for antibiotic detection in ovine milk, *Small Ruminant Research*, 102 (2012) 26-31.
- [8] A.Z. Samuel, S. Horii, T. Nakashima, N. Shibata, M. Ando, H. Takeyama, Raman Microspectroscopy Imaging Analysis of Extracellular Vesicles Biogenesis by Filamentous Fungus *Penicillium chrysogenum*, *Advanced Biology*, (2022) 2101322.
- [9] F.A. Ibrahim, J.J.M. Nasr, Direct determination of ampicillin and amoxicillin residues in food samples after aqueous SDS extraction by micellar liquid chromatography with UV detection, *Analytical Methods*, 6 (2014) 1523.
- [10] Z. Huang, X.-D. Pan, B.-F. Huang, J.-J. Xu, M.-L. Wang, Y.-P. Ren, Determination of 15  $\beta$ -lactam antibiotics in pork muscle by matrix solid-phase dispersion extraction

(MSPD) and ultra-high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Food Control*, 66 (2016) 145-150.

[11] T. Kharewal, N. Verma, A. Gahlaut, V. Hooda, Biosensors for penicillin quantification: a comprehensive review, *Biotechnology Letters*, 42 (2020) 1829-1846.

[12] H. Wang, L. Wang, Y. Xiu, S. Zhang, S. Wang, X. Niu, Penicillin biosensor based on rhombus-shaped porous carbon/hematoxylin/penicillinase, *J Food Sci*, 86 (2021) 3505-3516.

[13] M.-Y. Piñero, R. Bauza, L. Arce, M. Valcárcel, Determination of penicillins in milk of animal origin by capillary electrophoresis: Is sample treatment the bottleneck for routine laboratories?, *Talanta*, 119 (2014) 75-82.

[14] A.Y. Lee, N.-R. Ha, I.-P. Jung, S.-H. Kim, A.R. Kim, M.-Y. Yoon, Development of a ssDNA aptamer for detection of residual benzylpenicillin, *Analytical Biochemistry*, 531 (2017) 1-7.

[15] L.M. Gonçalves, W.F.A. Callera, M.D.P.T. Sotomayor, P.R. Bueno, Penicillinase-based amperometric biosensor for penicillin G, *Electrochemistry Communications*, 38 (2014) 131-133.

[16] Y. Hiratsuka, N. Funaya, H. Matsunaga, J. Haginaka, Preparation of magnetic molecularly imprinted polymers for bisphenol A and its analogues and their application to the assay of bisphenol A in river water, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 75 (2013) 180-185.

[17] W. Du, Q. Fu, G. Zhao, P. Huang, Y. Jiao, H. Wu, Z. Luo, C. Chang, Dummy-template molecularly imprinted solid phase extraction for selective analysis of ractopamine in pork, *Food Chemistry*, 139 (2013) 24-30.

[18] J. Moon, G. Kim, S. Park, J. Lim, C. Mo, Comparison of Whole-Cell SELEX Methods for the Identification of *Staphylococcus Aureus*-Specific DNA Aptamers, *Sensors*, 15 (2015) 8884-8897.

[19] Y. Lei, W. Chen, A. Mulchandani, Microbial biosensors, *Anal Chim Acta*, 568 (2006) 200-210.

[20] M.R. Baezzat, Z. Pourghobadi, R. Pourghobadi, Nanomolar determination of Penicillin G potassium (PGK) salt using a Carbon Paste Electrode modified with TiO<sub>2</sub>

nano particles /Ionic Liquids in real samples, *Materials Chemistry and Physics*, 270 (2021) 124641.

[21] R. Welden, M. Jablonski, C. Wege, M. Keusgen, P.H. Wagner, T. Wagner, M.J. Schöning, Light-Addressable Actuator-Sensor Platform for Monitoring and Manipulation of pH Gradients in Microfluidics: A Case Study with the Enzyme Penicillinase, *Biosensors*, 11 (2021) 171.

[22] D.A. Oliveira, D. Molinnus, S. Beging, J.R. Siqueira, M.J. Schöning, Biosensor Based on Self-Assembled Films of Graphene Oxide and Polyaniline Using a Field-Effect Device Platform, *physica status solidi (a)*, 218 (2021) 2000747.

[23] L. Wang, Y. Xiu, B. Han, L. Liu, X. Niu, H. Wang, Magnetic mesoporous carbon material based electrochemical sensor for rapid detection of penicillin sodium in milk, *J Food Sci*, 85 (2020) 2435-2442.

[24] Y. Zhang, An Electrochemical Benzylpenicillin Biosensor Based on  $\beta$ -Lactamase and Fullerene Supported by A Bilayer Lipid Membrane, *International Journal of Electrochemical Science*, (2020) 12007-12014.

[25] L. Wang, L. Zhang, Y. Wang, Y. Ou, X. Wang, Y. Pan, Y. Wang, L. Huang, G. Cheng, S. Xie, D. Chen, Y. Tao, Construction of an Electrochemical Receptor Sensor Based on Graphene/Thionine for the Sensitive Determination of  $\beta$ -Lactam Antibiotics Content in Milk, *International Journal of Molecular Sciences*, 21 (2020) 3306.

[26] Y. Xiu, R. Luo, B. Han, L. Liu, H. Wang, Construction of Co@C Hybrid Nanostructure: Electrochemical Biosensor for Detection of Penicillin Sodium in Milk, *Food Analytical Methods*, 13 (2020) 617-628.

[27] R. Jalili, A. Khataee, M.-R. Rashidi, A. Razmjou, Detection of penicillin G residues in milk based on dual-emission carbon dots and molecularly imprinted polymers, *Food chemistry*, 314 (2020) 126172.

[28] A. Sternesjo, C. Mellgren, L. Bjorck, Determination of Sulfamethazine Residues in Milk by a Surface Plasmon Resonance-Based Biosensor Assay, *Analytical Biochemistry*, 226 (1995) 175-181.

[29] G. Wang, S. Li, G. An, X. Wang, Y. Zhao, W. Zhang, H. Chen, Highly sensitive D-shaped photonic crystal fiber biological sensors based on surface plasmon resonance, *Optical and Quantum Electronics*, 48 (2016).

- [30] Y. Saylan, F. Yılmaz, A. Derazshamshir, E. Yılmaz, A. Denizli, Synthesis of hydrophobic nanoparticles for real-time lysozyme detection using surface plasmon resonance sensor, *Journal of Molecular Recognition*, 30 (2017) e2631.
- [31] F. Fathi, M.-R. Rashidi, Y. Omid, Ultra-sensitive detection by metal nanoparticles-mediated enhanced SPR biosensors, *Talanta*, 192 (2019) 118-127.
- [32] S. Rebe Raz, M.G.E.G. Bremer, W. Haasnoot, W. Norde, Label-Free and Multiplex Detection of Antibiotic Residues in Milk Using Imaging Surface Plasmon Resonance-Based Immunosensor, *Analytical Chemistry*, 81 (2009) 7743-7749.
- [33] F. Fernández, F. Sánchez-Baeza, M.P. Marco, Nanogold probe enhanced Surface Plasmon Resonance immunosensor for improved detection of antibiotic residues, *Biosensors and Bioelectronics*, 34 (2012) 151-158.
- [34] G. Cacciatore, M. Petz, S. Rachid, R. Hakenbeck, A.A. Bergwerff, Development of an optical biosensor assay for detection of  $\beta$ -lactam antibiotics in milk using the penicillin-binding protein 2x\*, *Anal Chim Acta*, 520 (2004) 105-115.
- [35] J. Ashley, X. Feng, Y. Sun, A multifunctional molecularly imprinted polymer-based biosensor for direct detection of doxycycline in food samples, *Talanta*, 182 (2018) 49-54.
- [36] K. Zhang, H. Li, W. Wang, J. Cao, N. Gan, H. Han, Application of Multiplexed Aptasensors in Food Contaminants Detection, *ACS Sensors*, 5 (2020) 3721-3738.
- [37] O. Çakır, M. Bakhshpour, I. Göktürk, F. Yılmaz, Z. Baysal, Sensitive and selective detection of amitrole based on molecularly imprinted nanosensor, *Journal of Molecular Recognition*, (2021).
- [38] B. Pérez-López, A. Merkoçi, Nanomaterials based biosensors for food analysis applications, *Trends in Food Science & Technology*, 22 (2011) 625-639.
- [39] Z. Altintas, Surface plasmon resonance based sensor for the detection of glycopeptide antibiotics in milk using rationally designed nanoMIPs, *Scientific Reports*, 8 (2018).
- [40] M. Majdinasab, R.K. Mishra, X. Tang, J.L. Marty, Detection of antibiotics in food: New achievements in the development of biosensors, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 127 (2020) 115883.

- [41] Z. Li, L. Wang, Y. Li, Y. Feng, W. Feng, Carbon-based functional nanomaterials: Preparation, properties and applications, *Composites Science and Technology*, 179 (2019) 10-40.
- [42] D.R. Roach, D.M. Donovan, Antimicrobial bacteriophage-derived proteins and therapeutic applications, *Bacteriophage*, 5 (2015) e1062590.
- [43] J. Parascandola, the enchanted rings - the untold story of penicillin - sheehan,jc, *Isis*, 74 (1983) 280-281.
- [44] J.P. Swann, Miracle cure - the story of penicillin and the golden-age of antibiotics - wainwright,M, *British Journal for the History of Science*, 25 (1992) 376-377.
- [45] H. Harris, Howard Florey and the development of penicillin, *Notes and Records of the Royal Society of London*, 53 (1999) 243-252.
- [46] R.I. Aminov, R.I. Mackie, Evolution and ecology of antibiotic resistance genes, *FEMS Microbiology Letters*, 271 (2007) 147-161.
- [47] J.M. Munita, C.A. Arias, Mechanisms of Antibiotic Resistance, *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*2016, pp. 481-511.
- [48] J.M. Boyce, Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* as a Cause of Health Care--Associated Infection, *Clinical Infectious Diseases*, 46 (2008) 795-798.
- [49] A.R. Alaboudi, Chapter 5 - Chemical residues: potential food safety hazards in the Middle East, in: I.N. Savvaiddis, T.M. Osaili (Eds.) *Food Safety in the Middle East*, Academic Press2022, pp. 143-186.
- [50] H. Vickers, International antibiotic resistance crisis, *BMJ*, 342 (2011) d3207.
- [51] K. Kivirand, M. Kagan, T. Rincken, Biosensors for the detection of antibiotic residues in milk, *InTech*2015.
- [52] Anonim, Residues veterinary medicinal products, [https://ec.europa.eu/food/safety/chemical-safety/residues-veterinary-medicinal-products\\_en](https://ec.europa.eu/food/safety/chemical-safety/residues-veterinary-medicinal-products_en) (Erişim Tarihi:02.11.2021)
- [53] K. Pauter, M. Szultka-Młyńska, B. Buszewski, Determination and Identification of Antibiotic Drugs and Bacterial Strains in Biological Samples, *Molecules*, 25 (2020) 2556.

- [54] A.Y. El-Moghazy, C. Zhao, G. Istamboulie, N. Amaly, Y. Si, T. Noguier, G. Sun, Ultrasensitive label-free electrochemical immunosensor based on PVA-co-PE nanofibrous membrane for the detection of chloramphenicol residues in milk, *Biosensors and Bioelectronics*, 117 (2018) 838-844.
- [55] A.G. Ayankojo, J. Reut, V. Ciocan, A. Öpik, V. Syritski, Molecularly imprinted polymer-based sensor for electrochemical detection of erythromycin, *Talanta*, 209 (2020) 120502.
- [56] P. Gai, C. Gu, T. Hou, F. Li, Ultrasensitive Self-Powered Aptasensor Based on Enzyme Biofuel Cell and DNA Bioconjugate: A Facile and Powerful Tool for Antibiotic Residue Detection, *Analytical Chemistry*, 89 (2017) 2163-2169.
- [57] A. Poghosian, M. Jablonski, C. Koch, T.S. Bronder, D. Rolka, C. Wege, M.J. Schöning, Field-effect biosensor using virus particles as scaffolds for enzyme immobilization, *Biosensors and Bioelectronics*, 110 (2018) 168-174.
- [58] F. Zhang, H. Yao, Y. Zhao, X. Li, G. Zhang, Y. Yang, Mixed matrix membranes incorporated with Ln-MOF for selective and sensitive detection of nitrofurantoin antibiotics based on inner filter effect, *Talanta*, 174 (2017) 660-666.
- [59] N. Zhou, Y. Ma, B. Hu, L. He, S. Wang, Z. Zhang, S. Lu, Construction of Ce-MOF@COF hybrid nanostructure: Label-free aptasensor for the ultrasensitive detection of oxytetracycline residues in aqueous solution environments, *Biosensors and Bioelectronics*, 127 (2019) 92-100.
- [60] Q.-Q. Zhu, Q.-S. Zhou, H.-W. Zhang, W.-W. Zhang, D.-Q. Lu, M.-T. Guo, Y. Yuan, F. Sun, H. He, Design and Construction of a Metal–Organic Framework as an Efficient Luminescent Sensor for Detecting Antibiotics, *Inorganic Chemistry*, 59 (2020) 1323-1331.
- [61] A.P.F. Turner, Biosensors: sense and sensibility, *Chemical Society Reviews*, 42 (2013) 3184.
- [62] C.I.L. Justino, A.C. Freitas, R. Pereira, A.C. Duarte, T.A.P. Rocha Santos, Recent developments in recognition elements for chemical sensors and biosensors, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 68 (2015) 2-17.



- [63] B. Kim, D. Lim, H.J. Jin, H.Y. Lee, S. Namgung, Y. Ko, S.B. Park, S. Hong, Family-selective detection of antibiotics using antibody-functionalized carbon nanotube sensors, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 166 (2012) 193-199.
- [64] M. Moumita, K. Shankar, P. Abhiman, B. Shamasundar, Development of a sandwich vertical flow immunogold assay for rapid detection of oxytetracycline residue in fish tissues, *Food chemistry*, 270 (2019) 585-592.
- [65] E. Valera, A. Muriano, I. Pividori, F. Sánchez-Baeza, M.-P. Marco, Development of a Coulombimetric immunosensor based on specific antibodies labeled with CdS nanoparticles for sulfonamide antibiotic residues analysis and its application to honey samples, *Biosensors and Bioelectronics*, 43 (2013) 211-217.
- [66] S. Li, Y. Zhang, W. Wen, W. Sheng, J. Wang, S. Wang, J. Wang, A high-sensitivity thermal analysis immunochromatographic sensor based on au nanoparticle-enhanced two-dimensional black phosphorus photothermal-sensing materials, *Biosensors and Bioelectronics*, 133 (2019) 223-229.
- [67] M. Hu, X. Hu, Y. Zhang, M. Teng, R. Deng, G. Xing, J. Tao, G. Xu, J. Chen, Y. Zhang, Label-free electrochemical immunosensor based on AuNPs/Zn/Ni-ZIF-8-800@graphene composites for sensitive detection of monensin in milk, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 288 (2019) 571-578.
- [68] B. Du, F. Wen, X. Guo, N. Zheng, Y. Zhang, S. Li, S. Zhao, H. Liu, L. Meng, Q. Xu, Evaluation of an ELISA-based visualization microarray chip technique for the detection of veterinary antibiotics in milk, *Food Control*, 106 (2019) 106713.
- [69] X. Li, X. Wu, J. Wang, Q. Hua, J. Wu, X. Shen, Y. Sun, H. Lei, Three lateral flow immunochromatographic assays based on different nanoparticle probes for on-site detection of tylosin and tilmicosin in milk and pork, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 301 (2019) 127059.
- [70] C. Li, Y. Zhang, S.A. Eremin, O. Yakup, G. Yao, X. Zhang, Detection of kanamycin and gentamicin residues in animal-derived food using IgY antibody based ic-ELISA and FPIA, *Food chemistry*, 227 (2017) 48-54.
- [71] M. Blind, M. Blank, Aptamer selection technology and recent advances, *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 4 (2015) e223.

- [72] R. Yazdian-Robati, P. Bayat, F. Oroojalian, M. Zargari, M. Ramezani, S.M. Taghdisi, K. Abnous, Therapeutic applications of AS1411 aptamer, an update review, *International journal of biological macromolecules*, 155 (2020) 1420-1431.
- [73] M. Mahdiannasser, Z. Karami, An innovative paradigm of methods in microRNAs detection: highlighting DNAzymes, the illuminators, *Biosensors and Bioelectronics*, 107 (2018) 123-144.
- [74] X. Cui, R. Li, X. Liu, J. Wang, X. Leng, X. Song, Q. Pei, Y. Wang, S. Liu, J. Huang, Low-background and visual detection of antibiotic based on target-activated colorimetric split peroxidase DNAzyme coupled with dual nicking enzyme signal amplification, *Anal Chim Acta*, 997 (2018) 1-8.
- [75] S. Piletsky, F. Canfarotta, A. Poma, A.M. Bossi, S. Piletsky, Molecularly imprinted polymers for cell recognition, *Trends in biotechnology*, 38 (2020) 368-387.
- [76] Y. Alhamoud, D. Yang, S.S.F. Kenston, G. Liu, L. Liu, H. Zhou, F. Ahmed, J. Zhao, Advances in biosensors for the detection of ochratoxin A: Bio-receptors, nanomaterials, and their applications, *Biosensors and Bioelectronics*, 141 (2019) 111418.
- [77] T. Jing, Y. Wang, Q. Dai, H. Xia, J. Niu, Q. Hao, S. Mei, Y. Zhou, Preparation of mixed-templates molecularly imprinted polymers and investigation of the recognition ability for tetracycline antibiotics, *Biosensors and Bioelectronics*, 25 (2010) 2218-2224.
- [78] C. Situ, M.H. Mooney, C.T. Elliott, J. Buijs, Advances in surface plasmon resonance biosensor technology towards high-throughput, food-safety analysis, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29 (2010) 1305-1315.
- [79] S. Chand, B. Gupta, Surface plasmon resonance based fiber-optic sensor for the detection of pesticide, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 123 (2007) 661-666.
- [80] L. Chen, X. Wang, W. Lu, X. Wu, J. Li, Molecular imprinting: perspectives and applications, *Chemical Society Reviews*, 45 (2016) 2137-2211.
- [81] Y. Saylan, F. Yilmaz, E. Özgür, A. Derazshamshir, H. Yavuz, A. Denizli, Molecular Imprinting of Macromolecules for Sensor Applications, *Sensors*, 17 (2017) 898.
- [82] J. Liu, K. Yang, Q. Deng, Q. Li, L. Zhang, Z. Liang, Y. Zhang, Preparation of a new type of affinity materials combining metal coordination with molecular imprinting, *Chemical Communications*, 47 (2011) 3969-3971.

- [83] G. Wulff, Molecular imprinting in cross-linked materials with the aid of molecular templates—a way towards artificial antibodies, *Angewandte Chemie International Edition in English*, 34 (1995) 1812-1832.
- [84] E. Yilmaz, K. Haupt, K. Mosbach, The use of immobilized templates—A new approach in molecular imprinting, *Angewandte Chemie International Edition*, 39 (2000) 2115-2118.
- [85] B. Liedberg, C. Nylander, I. Lundström, Biosensing with surface plasmon resonance — how it all started, *Biosensors and Bioelectronics*, 10 (1995) i-ix.
- [86] J. Homola, M. Piliarik, *Surface Plasmon Resonance (SPR) Sensors*, Springer Berlin Heidelberg 2006, pp. 45-67.
- [87] H. Kawazumi, K.V. Gobi, K. Ogino, H. Maeda, N. Miura, Compact surface plasmon resonance (SPR) immunosensor using multichannel for simultaneous detection of small molecule compounds, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 108 (2005) 791-796.
- [88] B. Špačková, P. Wrobel, M. Bocková, J. Homola, Optical biosensors based on plasmonic nanostructures: a review, *Proceedings of the IEEE*, 104 (2016) 2380-2408.
- [89] F.E.S. Oztuna, S.B. Barim, S.E. Bozbag, H. Yu, M. Aindow, U. Unal, C. Erkey, Graphene aerogel supported Pt electrocatalysts for oxygen reduction reaction by supercritical deposition, *Electrochimica Acta*, 250 (2017) 174-184.
- [90] B.C. Brodie, XIII. On the atomic weight of graphite, *Philosophical transactions of the Royal Society of London*, (1859) 249-259.
- [91] Y. Saylan, F. Yilmaz, E. Özgür, A. Derazshamshir, H. Yavuz, A. Denizli, Molecular Imprinting of Macromolecules for Sensor Applications, *Sensors*, 17 (2017) 898.
- [92] WHO, Technical Report Series No. 430. 1969
- [93] A. Ramirez, R. Gutierrez, G. Diaz, C. Gonzalez, N. Perez, S. Vega, M. Noa, High-performance thin-layer chromatography–bioautography for multiple antibiotic residues in cow’s milk, *Journal of Chromatography B*, 784 (2003) 315-322.
- [94] S. Kröger, S. Piletsky, A.P. Turner, Biosensors for marine pollution research, monitoring and control, *Marine pollution bulletin*, 45 (2002) 24-34.
- [95] J. Homola, Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species, *Chemical reviews*, 108 (2008) 462-493.

- [96] V. Safran, I. Göktürk, A. Derazshamshir, F. Yılmaz, N. Sağlam, A. Denizli, Rapid sensing of Cu<sup>2+</sup> in water and biological samples by sensitive molecularly imprinted based plasmonic biosensor, *Microchemical Journal*, 148 (2019) 141-150.
- [97] Y. Saylan, S. Akgönüllü, D. Çimen, A. Derazshamshir, N. Bereli, F. Yılmaz, A. Denizli, Development of surface plasmon resonance sensors based on molecularly imprinted nanofilms for sensitive and selective detection of pesticides, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 241 (2017) 446-454.
- [98] A. Pennacchio, A. Varriale, A. Scala, V.M. Marzullo, M. Staiano, S. D'Auria, A novel fluorescence polarization assay for determination of penicillin G in milk, *Food Chemistry*, 190 (2016) 381-385.
- [99] X. Xie, A.A. Suleiman, G.G. Guilbault, A fluorescence-based fiber optic biosensor for the flow-injection analysis of penicillin, *Biotechnology and bioengineering*, 39 (1992) 1147-1150.
- [100] D. Kwon, H. Yoo, H. Lee, S. Jeon, Colorimetric detection of penicillin G in milk using antibody-functionalized dendritic platinum nanoparticles, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 255 (2018) 552-556.
- [101] C. Wang, F. Xiao, Q. Chen, S. Wang, J. Zhou, Z. Wu, A two-dimensional photonic crystal hydrogel biosensor for colorimetric detection of penicillin G and penicillinase inhibitors, *Analyst*, 146 (2021) 502-508.
- [102] M. Aghamirzaei, M.S. Khiabani, H. Hamishehkar, R.R. Mokarram, M. Amjadi, Plasmonic Sensor for Detection of  $\beta$ -Lactam Antibiotics based on the Conjugated Antibody with Gold Nanoparticles, *J Appl Spectrosc*, 88 (2021) 233-241.
- [103] E. Benito-Peña, M.C. Moreno-Bondi, G. Orellana, Á. Maquieira, A. Van Amerongen, Development of a Novel and Automated Fluorescent Immunoassay for the Analysis of  $\beta$ -Lactam Antibiotics, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (2005) 6635-6642.
- [104] Z. Jiang, Y. Li, A. Liang, A. Qin, A sensitive and selective immuno-nanogold resonance-scattering spectral method for the determination of trace penicillin G, *Luminescence*, 23 (2008) 157-162.

[105] V. Safran, I. Göktürk, M. Bakhshpour, F. Yılmaz, A. Denizli, Development of Molecularly Imprinted Polymer-Based Optical Sensor for the Sensitive Penicillin G Detection in Milk, *ChemistrySelect*, 6 (2021) 11865-11875.

[106] M. Bakhshpour, I. Göktürk, N. Bereli, F. Yılmaz, A. Denizli, Selective Detection of Penicillin G Antibiotic in Milk by Molecularly Imprinted Polymer-Based Plasmonic SPR Sensor, *Biomimetics*, 6 (2021) 72.

[107] M. David, M. Florescu, C. Bala, Biosensors for antioxidants detection: Trends and perspectives, *Biosensors*, 10 (2020) 112.