

**PREDNİSOLON TAYİNİ İÇİN YÜZEY TANIMA BÖLGELERİNE
SAHİP MOLEKÜLER BASKILANMIŞ SENSÖRLERİN
GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT OF MOLECULARLY IMPRINTED SENSORS
WITH SURFACE RECOGNATION SITES FOR DETECTION
OF PREDNISOLONE**

ESMA SARI ÜZEK

Prof. Dr. Handan YAVUZ ALAGÖZ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim- Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Kimya Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

DOKTORA TEZİ

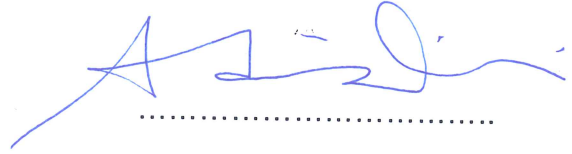
Olarak hazırlanmıştır.

2017

ESMA SARI ÜZEK'in hazırladığı "Prednisolon Tayini İçin Yüzey Tanıma Bölgelerine Sahip Moleküler Baskılanmış Sensörlerin Geliştirilmesi" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından KİMYA ANABİLİM DALI'nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

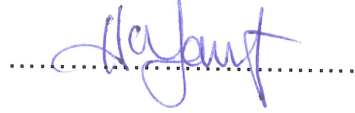
Prof. Dr. Adil DENİZLİ

Başkan



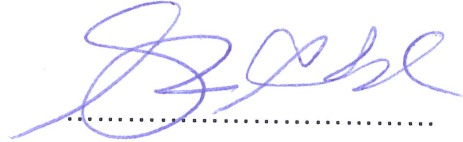
Prof. Dr. Handan YAVUZ ALAGÖZ

Üye (Danışman)



Prof. Dr. Sinan Akgöl

Üye



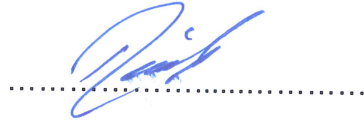
Yrd. Doç. Dr. Fatma Yılmaz

Üye



Doç. Dr. Nilay Bereli

Üye



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

Prof. Dr. Salih Bülent ALTEN

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Canım Ailem ve Sevgili Eşim'e...

ETİK

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

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

12/01/2017

Esmâ Sari Üzek

ÖZET

PREDNİSOLON TAYİNİ İÇİN YÜZEY TANIMA BÖLGELERİNE SAHİP MOLEKÜLER BASKILANMIŞ SENSÖRLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Esmâ Sari Üzek

Doktora, Kimya Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Handan Yavuz Alagöz

Aralık 2016, 129 sayfa

Bu tez çalışması kapsamında Prednisolon (PRD) tayinine yönelik yüzey tanıma bölgelerine sahip moleküler baskılanmış optik sensörler hazırlanmıştır. Çalışma kapsamında kalıp molekül olan prednisolon miktarı değiştirilerek iki fazlı mini-emülsiyon polimerizasyonu ile nanopartiküller hazırlanmış ve yüzey plasmon rezonans sensörün altın çip yüzeyine farklı tekniklerle tutturulmuştur. Hazırlanmış olan üç farklı baskılanmış partikül (PIN1, PIN2 ve PIN3) ve bir tane baskılanmamış partikül (NIN) ilk olarak boyut analiziyle (Zeta-sizer ve STEM) ve yapısal olarak (FTIR ve elementel analiz) karakterize edilmiştir. Çip yüzeyi modifiye edildikten sonra nanosensörler elipsometre ve temas açısı ölçümleri vasıtasıyla karakterize edilmiştir. Kinetik analizler pH 6.6 ve 7.4'de dört sensör içinde gerçekleştirilmiş ve verilere Langmuir, Freundlich, Scatchard ve Langmuir-Freundlich izoterm modelleri uygulanmıştır. Kinetik analizler sonucunda pH 6.6'da PIN1, PIN2, PIN3 ve NIN kodlu sensörler için elde edilen tayin limiti sırasıyla 5.1 ppb, 5.5 ppb, 6.9 ppb ve 7.4 ppb iken tayin alt sınırı 16.9 ppb, 18.2 ppb, 23.1 ppb ve 24.2 ppb olarak belirlenmiştir. pH 7.4 belirlenen tayin limiti ise aynı sıralamayla 10.7 ppb, 8.9 ppb, 13.7 ppb ve 12.1 ppb olarak hesaplanırken tayin alt

sınırları sırasıyla 35.5 ppb, 29.7 ppb, 45.5 ppb ve 40.2 ppb olarak hesaplanmıştır. Yarışmalı kinetik analizler 17- α -etinil estradiol (EEST) ve estradiol (EST) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. pH 6.6'da baskılanmış PIN1, PIN2 ve PIN3 kodlu sensörler baskılanmamış NIN kodlu sensöre göre PRD'yi EEST'den sırasıyla 1.195; 6.500 ve 1.699 kat daha seçici tanırken bu değerler EST için 1.676; 7.857 ve 2.037 kat olarak belirlenmiştir. pH 7.4'de ise bağıl seçicilik katsayıları EEST ve EST için sırasıyla 3.009; 10.556; 2.679 ve 2.758; 14.778; 4.500 kat olarak hesaplanmıştır. Tekrar kullanılabilirlik çalışmaları en iyi sonuçların elde edildiği sensöre uygulanmış ve % 92.8 geri kazanım elde edilmiştir. Doğal örnek olarak vücut sıvılarıyla (idrar ve plazma) çalışılmıştır. Sistemin validasyon çalışmaları yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile standart yönteme uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan SPR sensörünün HPLC sonuçlarıyla iyi bir uyum içinde olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Prednisolon, yüzey plazmon rezonans, nanosensör, validasyon, vücut sıvıları (plazma ve idrar)

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF MOLECULARLY IMPRINTED SENSORS WITH SURFACE RECOGNITION SITES FOR DETECTION OF PREDNISOLONE

Esmâ Sari Üzek

Doctor of Philosophy, Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Handan Yavuz Alagöz

December 2016, 129 pages

In this thesis, molecularly imprinted optical sensors with surface recognition regions for prednisolone (PRD) determination have been prepared. Within the scope of this study, nanoparticles were prepared by two-phase mini-emulsion polymerization by changing amount of PRD, which is a template molecule, and the particles were attached to the gold chip surface of the surface plasmon resonance sensor with different techniques. Three differentially imprinted particles (PIN1, PIN2, and PIN3) and one non-imprinted particle (NIN) were first characterized by dimensional analysis (Zeta-sizer and STEM) and then structurally (FTIR and elemental analysis). After the chip surface has been modified with particles, the nanosensors were characterized by means of ellipsometer and contact angle measurements. Kinetic analyzes were performed for four sensors at pH 6.6 and 7.4 and Langmuir, Freundlich, Scatchard and Langmuir-Freundlich isotherm models were applied to the data. As a result of the kinetic analyzes, the limit of detection for the PIN1, PIN2, PIN3 and NIN sensors at pH 6.6 were 5.1 ppb, 5.5 ppb, 6.9 ppb and 7.4 ppb, respectively, while the limit of quantifications were determined as 16.9 ppb, 18.2 ppb, 23.1 ppb and 24.2 ppb, respectively. The limit of detection at pH 7.4 was

calculated as 10.7 ppb, 8.9 ppb, 13.7 ppb and 12.1 ppb in the same order, and the limit of quantification were calculated as 35.5 ppb, 29.7 ppb, 45.5 ppb and 40.2 ppb, respectively. Competition kinetic assays were performed by using 17- α -ethynyl estradiol (EEST) and estradiol (EST). Imprinted sensors labeled with PIN1, PIN2 and PIN3 codes were selected 1.195; 6.500 and 1.699 times more sensitive to the PRD than EEST when it is compared with non-imprinted NIN-encoded sensor, respectively, and these values were determined as 1.676; 7.857 and 2.037 times for EST at pH 6.6. At pH 7.4, the relative selectivity coefficients were calculated as 3.009; 10.556; 2.679 and 2.758; 14.778; 4.500 times for EEST and EST, respectively. The reusability studies have been applied to the sensor with the best results and 92.8 % recovery is achieved. The method was successfully applied to monitor PRD levels in body fluids (urine and plasma) as a natural sample. Validation studies of the system were performed according to the standard procedure by high performance liquid chromatography (HPLC). Proposed SPR sensor method was in good agreement with those obtained by HPLC method.

Key Words: Prednisolone, surface plasmon resonance, nanosensor, validation, body fluids (plasma and urine)

TEŞEKKÜRLER

Her ne kadar ilk sayfalarda yer alsada benim teşekkür sayfam teze son katılan sayfayı aslında. Nerden başlasam bilemediğim için sona kalmış bu sayfada unuttuklarım olduysa canı gönülden özür dilerim.

Beni doktora programına kabul ederek bu sürece başlamama vesile olan Sayın hocam Prof. Dr. Adil Denizli'ye deneyimlememe fırsat sunduğu her şey için çok teşekkür ederim.

Tez danışmanım olan Değerli hocam Prof. Dr. Handan Yavuz Alagöz'e anlayışı, güveni, önyargısız yaklaşımı ve güler yüzüyle bu süreci daha az stresle atlattırma yardımcı olduğu için çok teşekkür ederim.

Tezimin deneysel çalışmalarını yürütebilmem için bana laboratuvarını açan, beni kendi öğrencilerinden ayırt etmeyen, hem deneysel olarak hem de teorik olarak bana büyük yardımı dokunan iyi ki tanıdım dediğim Sayın hocam Doç. Dr. Memed Duman'a teşekkürü borç bilirim.

Ayrıca destek ve ilgilerinden dolayı Doç. Dr. Nilay Bereli'ye, Doç. Dr. Fatma Yılmaz'a, Fatma Kartal'a, Tahsin Çağlayan'a, Meltem Okan'a, Gülgün Aylaz'a, Sevgi Aslıyüce'ye, Mehmet Emin Çorman'a, Canan Armutcu'ya, Kemal Çetin'e, Gülsu Şener'e ve diğer BIOREG grubu üyelerine teşekkür ederim.

Deneyletimde yardımcı olan ve verilerimi tartışma fırsatı bulduğum başta Uğur Üzek olmak üzere mensubu bulunduğum tüm Üzek ailesi üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Tüm yaşamım boyunca hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan, maddi ve manevi desteklerini her an arkamda hissettiğim aileme sonsuz minnet ve şükranlarımı sunarım. Her fırtınada arkamda koca bir çınar gibi duran hayata şanslı başlama sebeplerim annem, babam iyi ki varsınız ve Allah sizi hayatımdan hiç eksik etmesin. Şiirde de söylendiği gibi bir kardeşi olmalı insanın sizler gibi; Mevlüt, Mehmet siz benim bu hayattaki en değerli varlıklarınımsınız.

Sadece tezimde değil yaşamımın her safhasında yanımda olan özverili huzurum. Hayatta verdiğim en doğru kararım iyi ki varsın, yanımda olup yüzümü güldürerek bana her daim baharı yaşatan eşim Recep Üzek'e sonsuz teşekkür ediyorum.

Esmâ Sari Üzek

Ocak, 2017

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ETİK	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜRLER	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Temelleri	4
2.2 Moleküler Baskılamanın Temel Unsurları	6
2.2.1 Kalıp (Hedef) molekül	6
2.2.2 Fonksiyonel monomerler	7
2.2.3 Çapraz bağlayıcı monomerler	10
2.2.4 Gözenek oluşturuucu çözgenler (Porojenler)	12
2.2.5 Başlatıcılar.....	13
2.3 MIP'lerin hazırlama yöntemleri	13
2.3.1 Polimerik Nanopartiküllerin Hazırlanması	14
2.3.1.1 Var olan Polimerlerin Dispersiyonu	15
2.3.1.1.1 Çözücünün Buharlaştırılması	16
2.3.1.1.2 Tuzla Çöktürme	17
2.3.1.1.3 Nanoçöktürme	17
2.3.1.1.4 Diyaliz.....	18
2.3.1.1.5 Süperkritik Akışkan Teknolojisi	18
2.3.1.2 Monomerlerin Polimerizasyonu	19
2.3.1.2.1 Emülsiyon Polimerizasyonu.....	19
2.3.1.2.2 Mini-emülsiyon Polimerizasyonu	21
2.3.1.2.3 Mikro-emülsiyon Polimerizasyonu	22

2.4 Moleküler Baskılama Teknolojisi	23
2.4.1 Yeni nesil baskılama teknolojileri.....	23
2.4.1.1 Yüzey baskılama teknolojisi	23
2.4.1.2 Nanobaskılama teknolojisi.....	24
2.4.1.3 Kontrollü/yaşayan radikalik polimerizasyon teknolojisi	25
2.4.1.4 Oyuk (hollow) gözenekli polimer sentez teknolojisi	26
2.4.1.5 Click kimyası (huisgen tepkimesi) siklokatılma tepkimesi.....	26
2.4.1.6 Mikroakışkan sentez teknolojisi	27
2.4.1.7 Katı faz sentez teknolojisi	27
2.4.2 Moleküler baskılama teknolojisindeki özel baskılama stratejileri	28
2.4.2.1 Çok kalıp moleküllü baskılama stratejisi	28
2.4.2.2 Çok fonksiyonel monomerli baskılama stratejileri	28
2.4.2.3 Taklit kalıp molekül ile baskılama stratejisi	29
2.4.2.4 Segment (Katman) baskılama stratejisi	29
2.4.2.5 Kompozit baskılama malzeme stratejisi.....	29
2.4.3 Uyarın duyarlı moleküler baskılama teknolojisi stratejileri	30
2.4.3.2 Sıcaklık duyarlı moleküler baskılama teknolojisi.....	30
2.4.3.3 Işık duyarlı moleküler baskılama teknolojisi.....	31
2.4.3.4 pH duyarlı moleküler baskılama teknolojisi.....	31
2.4.3.5 İkili/çoklu uyarın duyarlı moleküler baskılama teknolojisi.....	31
2.5 Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Kullanım Alanları	32
2.6 Yüzey Plazmon Rezonans	34
2.6.1 Yüzey Plazmon Rezonans Genel Prensibi	36
2.7 Prednisolon	40
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	43
3.1 Malzemeler.....	43
3.1.2 Kullanılan Kimyasallar	43
3.1.3 Kullanılan laboratuvar ekipmanları	43
3.2 Yöntem	44
3.2.1 Nanopartiküllerin Hazırlanması	44
3.2.2 Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	45

3.2.2.1 Boyut Analizi.....	45
3.2.2.2 Taramalı-Geçirgenlik Elektron Mikroskobu (STEM) Analizi	46
3.2.2.3 Zayıflatılmış Toplam Yansıma - Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR-ATR) Analizi	46
3.2.2.4 Elementel Analizi	47
3.2.3 Nanopartiküllerin Yüzey Plazmon Rezonans Sensör Yüzeyine Tutturulması ...	47
3.2.4 Yüzey Plazmon Rezonans Sensörün Karakterizasyonu	48
3.2.4.1 Elipsometre Analizi	48
3.2.4.2 Temas Açısı Analizi	48
3.2.5 Yüzey Plazmon Rezonans Sistemi ile Kinetik Analizler.....	48
3.2.6 Yüzey Plazmon Rezonans Sisteminin Seçiciliğinin Belirlenmesi.....	49
3.2.7 Yüzey Plazmon Rezonans Sisteminin Tekrar Kullanılabilirliğinin Belirlenmesi .	49
3.2.8 Yüzey Plazmon Rezonans Sisteminin Doğal Kaynaklarla Kinetik Analizi	49
3.2.9 Yüzey Plazmon Rezonans Sisteminin Validasyonu	50
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	51
4.1. Baskılanmış ve Baskılanmamış Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	51
4.1.1. Boyut Analizi.....	51
4.1.2. Taramalı-Geçirgenlik Elektron Mikroskobu (STEM) ve Geçirgenlik Elektron Mikroskobu (TEM) Analizi	53
4.1.2. Zayıflatılmış Toplam Yansıma - Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR-ATR) Analizi	56
4.1.2. Elementel Analizi	59
4.2. Baskılanmış ve Baskılanmamış Nanosensörlerin Karakterizasyonu	59
4.2.1. Elipsometre Analizi	59
4.1.2. Temas Açısı Analizi	61
4.3. Yüzey Plazmon Rezonans Sensörlerin Kinetik Analizleri	63
4.3.1. Denge Analizleri	66
4.3.2. Bağlanma Kinetik Analizleri	67
4.3.3. İzoterm Modelleri	74
4.4. SPR Nanosensörün Yarışmalı Kinetik Veri Analizleri ve Baskılama Seçiciliğinin Belirlenmesi.....	86

4.5. SPR Nanosensörün Tekrar Kullanabilirliğinin Belirlenmesi	91
4.6. Doğal Kaynak ile Kinetik Veri Analizleri	92
4.7. Yüzey Plazmon Rezonans Sisteminin Validasyonu	97
5. YORUM.....	104
KAYNAKLAR	106
ÖZGEÇMİŞ	129

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Moleküler baskılamada kullanılan tipik fonksiyonel monomerler	8
Çizelge 2.1. Moleküler baskılamada kullanılan tipik fonksiyonel monomerler	9
Çizelge 2.2. Moleküler baskılamada yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcı monomerler	11
Çizelge 2.3. Yığın yapısındaki ve nano yapıdaki MIP'lerin özelliklerinin karşılaştırılması	24
Çizelge 3.1. Mini-emülsiyon polimerizasyonunda kullanılan organik fazlar	44
Çizelge 4.1. PIN1, PIN2, PIN3 ve NIN nanopartiküllerinin elemental analiz sonuçları	59
Çizelge 4.2. pH 6.6'da nanosensörlerin Denge analiz ve Bağlanma kinetik analiz sonuçları.....	72
Çizelge 4.3. pH 7.4'de nanosensörlerin Denge analiz ve Bağlanma kinetik analizleri sonuçları.....	73
Çizelge 4.4. Sıkça kullanılan izoterm modelleri	77
Çizelge 4.5. pH 6.6'da elde edilen verilere uygulanan Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich izotermi analizleri	84
Çizelge 4.6. pH 7.4'de elde edilen verilere uygulanan Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich izotermi analizleri	85
Çizelge 4.7. pH 6.6'da EEST ve EST için hesaplanan seçicilik katsayıları	87
Çizelge 4.8. pH 6.6'da EEST ve EST için hesaplanan bağıl baskılama katsayıları ...	87
Çizelge 4.9. pH 7.4'de EEST ve EST için hesaplanan seçicilik katsayıları.....	89
Çizelge 4.10. pH 7.4'de EEST ve EST için hesaplanan bağıl baskılama katsayıları .	89
Çizelge 4.11. Literatürde PRD tayinine yönelik kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması	96
Çizelge 4.12. Yapay plazma ve yapay idrar örneklerinin HPLC ve SPR analizleri .	102

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Moleküler baskılamanın şematik gösterimi	3
Şekil 2.2. Moleküler baskılamada kullanılan beş temel yöntem	6
Şekil 2.3. Dimerize olabilen ve olamayan fonksiyonel monomerle hazırlanmış olan baskılanmış (a ve b) ve baskılanmamış (c ve d) polimerlerin şematik olarak karşılaştırılması.	10
Şekil 2.4. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanması için kullanılan bazı tekniklerin şematik gösterimi	15
Şekil 2.5. Farklı formlardaki moleküler baskılanmış bazı nanoyapıların sentez yöntemlerinin şematik gösterimi	25
Şekil 2.6. Ön hazırlık tekniklerinde, kromatografide ve sensör çalışmalarında MIP'lerin kullanımının yapısal diyagramı	33
Şekil 2.7. SPR biyosensörün analiz prensibi	34
Şekil 2.8. SPR biyosensör tasarımı: (A) Kretschmann konfigürasyonu; (B) Yansıyan ışığın spektrumu; (C) SPR sensör yüzeyine bağlanma; (D) Moleküler etkileşimlerin neden olduğu kırılma indisindeki değişiklik.....	37
Şekil 2.9. Prednisolonun enzimatik parçalanması	41
Şekil 4.1. Nanopartiküllerin zeta boyut analizleri; PIN1(A), PIN2(B), PIN3(C) ve NIN(D).	51
Şekil 4.2. PIN1 (A), PIN2 (B), PIN3 (C) ve NIN (D) nanopartiküllerinin STEM görüntüleri.	54
Şekil 4.3. PIN1 (A), PIN2 (B), PIN3 (C) ve NIN (D) nanopartiküllerinin TEM görüntüleri.	56
Şekil 4.4. PIN1 (A), PIN2 (B), PIN3 (C) ve NIN (D) nanopartiküllerinin FTIR-ATR spektrumları.....	58
Şekil 4.5. PIN1 (A), PIN2 (B), PIN3 (C) ve NIN (D) nanopartiküllerinin elipsometri sonuçları.....	60
Şekil 4.6. PIN1 (A), PIN2 (B), PIN3 (C), NIN (D) ve UN (E) nanosensör çiplerinin temas açısı ölçümleri.	62

Şekil 4.7. Prednisolon tayini için hazırlanmış nanopartiküllerin 10 mM pH 6.6 fosfat tamponu varlığında zamana karşı ΔR sensogramları ve derişim- ΔR ilişkisi.	64
Şekil 4.8. Prednisolon baskılanmış ve baskılanmamış nanopartiküllerin 10 mM pH 7.4 fosfat tamponu varlığında zamana karşı ΔR sensogramları ve derişim- ΔR ilişkisi. ...	65
Şekil 4.9. pH 6.6'da gerçekleştirilen denge analizleri (Scathard Analizi) : PIN1 (A), PIN2 (B), PIN3 (C) ve NIN (D).....	68
Şekil 4.10. pH 7.4'de gerçekleştirilen denge analizleri (Scathard Analizi) : PIN1 (A), PIN2 (B), PIN3 (C) ve NIN (D).....	69
Şekil 4.11. pH 6.6'da gerçekleştirilen bağlanma kinetik analizleri: PIN1 (A), PIN2 (B), PIN3 (C) ve NIN (D).	70
Şekil 4.12. pH 7.4'de gerçekleştirilen bağlanma kinetik analizleri: PIN1 (A), PIN2 (B), PIN3 (C) ve NIN (D).	71
Şekil 4.13. Freundlich izoterm modelinin pH 6.6'da gerçekleştirilen analiz verilerine uygulanmasıyla elde edilen grafikler: PIN1 (A), PIN2 (B), PIN3 (C) ve NIN (D).	78
Şekil 4.14. Freundlich izoterm modelinin pH 7.4'de gerçekleştirilen analiz verilerine uygulanmasıyla elde edilen grafikler: PIN1 (A), PIN2 (B), PIN3 (C) ve NIN (D).	79
Şekil 4.15. Langmuir izoterm modelinin pH 6.6'da gerçekleştirilen analiz verilerine uygulanmasıyla elde edilen grafikler: PIN1 (A), PIN2 (B), PIN3 (C) ve NIN (D).	80
Şekil 4.16. Langmuir izoterm modelinin pH 7.4'de gerçekleştirilen analiz verilerine uygulanmasıyla elde edilen grafikler: PIN1 (A), PIN2 (B), PIN3 (C) ve NIN (D).	81
Şekil 4.17. Langmuir-Freundlich izoterm modelinin pH 6.6'da gerçekleştirilen analiz verilerine uygulanmasıyla elde edilen grafikler: PIN1 (A), PIN2 (B), PIN3 (C) ve NIN (D).	82
Şekil 4.18. Langmuir-Freundlich izoterm modelinin pH 7.4'de gerçekleştirilen analiz verilerine uygulanmasıyla elde edilen grafikler: PIN1 (A), PIN2 (B), PIN3 (C) ve NIN (D).	83
Şekil 4.19. EEST, EST ve PRD'nin kimyasal yapılarının karşılaştırılması	86
Şekil 4.20. Baskılanmış ve baskılanmamış nanosensörlerin 10 mM pH 6.6 fosfat tamponu varlığında EEST, EST ve PRD'ye karşı yarışmalı kinetik veri sensogramları.	88

Şekil 4.21. PIN1, PIN2, PIN3 ve NIN nanosensörlerinin 10 mM pH 7.4 PB'de seçicilik sensogramları.....	90
Şekil 4.23. PIN2 ve NIN nanosensörlerinin farklı derişimlerde PRD içeren (10, 20 ve 50 ppb) yapay plazma çözeltilerinin sensogramları.....	93
Şekil 4.24. Baskılanmış (PIN2) (A) ve baskılanmamış (NIN) (B) optik sensörün idrar örneğinde PRD tayin yanıtı.....	95
Şekil 4.25. HPLC Analizi: (A) 2.0 ppm-100 ppm PRD içeren örneklerin; (B) 10 ppb, 20 ppb ve 50 ppb PRD içeren yapay idrar örneklerinin; (C) 10 ppb, 20 ppb ve 50 ppb PRD içeren yapay plazma örneklerinin kromatogramları.....	98
Şekil 4.26. Yapay idrar ve yapay plazma örneklerinin HPLC kromatogramları (A-B) ve sensogramları (C-D).....	100

SİMGELER VE KISALTMALAR

17- α -etinil estradiol	EEST
1-Vinilimidazol	VIM
Altın nanopartiküller	Au NPs
Amonyum persülfat	APS
Atom transfer radikalik polimerizasyon	ATRP
Azobisisobutironitril	AIBN
Dimetil formamid	DMF
Dinamik ışık saçılması	DLS
Dünya doping ajansı	WADA
Estradiol	EST
Etilen glikol dimetakrilat	EDMA
Gümüş nanopartiküller	Ag NPs
İyon baskılanmış polimer	IIP
Katı faz ekstrasyonu	SPE
Kontrollü/yaşayan radikalik polimerizasyon	LCRP
Kuantum noktalar	QDs
Metakrilik asit	MAA
Mikro toplam analiz sistemi	μ TAS
Moleküler baskılama teknolojisi	MIT
Moleküler baskılanmış polimer	MIP
Oda sıcaklığı iyonik sıvılar	RTIL
Poli(vinil alkol)	PVA
Polimer temelli nanopartikül	PNP
Potasyum persülfat	KPS
Prednisolon	PRD
Prednisolon baskılanmamış nanopartikül	NIN
Prednisolon baskılanmış nanopartikül	PIN
Rezonans birimi	RU
Serbest radikalik polimerizasyon	FRP

Sodyum dodesil sülfat	SDS
Süperkritik çözeltilerin çözücü içerisinde hızlı genişmesi	RESOLV
Süperkritik çözeltilerin hızlı genişmesi	RESS
Taramalı-geçirimli elektron mikroskobu	STEM
Tayin alt sınırı	LOQ
Tayin limiti	LOD
Tersinir katılma-ayrışma zincir transfer	RAFT
Toplam iç yansıma	TIR
Uyaran duyarlı moleküler baskılanmış polimer	SP-MIP
Yayılan yüzey plazmonu	PSP
Yüksek performanslı sıvı kromatografisi kütle spektroskopisi	HPLC-MS
Yüksek performanslı sıvı kromatografisi	HPLC
Yüzey geliştirilmiş raman spektroskopisi	SERS
Yüzey plazmon rezonans	SPR
Zayıflatılmış toplam yansıma	ATR
Zayıflatılmış toplam yansıma - fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi	FTIR-ATR

1. GİRİŞ

Moleküler baskılama belirli bir hedef molekül için sentetik polimerlerle yapay reseptörlerin oluşturulması işlemidir. Bu hedef molekül çapraz bağlayıcı monomerlerin ve fonksiyonel monomerlerin polimerizasyonu işlemi öncesinde kalıp görevi görür. Sonuç olarak moleküler hafızaya sahip baskılanmış polimerler elde edilir ve bu polimerler hedef molekülün seçici olarak bağlanmasına olanak tanır. Moleküler baskılanmış bu polimerler seçici moleküler tanıma özellikleri sayesinde biyolojik antibadilerin en önemli özelliğini taklit ederler. Bu nedenle; bağışıklık testleri, afinite ayırma, biyosensörler ve yönlendirilmiş sentez/kataliz gibi seçici bağlanma olaylarının önemli rol oynadığı uygulamalarda kullanılabilirler. 1970'li yıllardan beri moleküler baskılama tekniği hem yeni nesil malzemelerin geliştirilmesi açısından hem de uygulama alanlarında oldukça çok çalışılmıştır ve hala geliştirilmeye devam etmektedir.

Yüzey plazmon rezonansı (SPR); çok az miktardaki analitin, sensor yüzeyinde meydana getirdiği dielektrik değişikliklere bağlı olarak saptanması için iletken arayüzün kullanıldığı optik bir olgudur. Moleküler baskılanmış polimer temelli SPR sensörler ilk defa teofilin, kafein ve ksantin tayini için kullanılmıştır. Son çalışmaların ışığında bu tip sensörler; tek bir analitin tayini için kullanılabilecek küçük ve taşınabilir cihazlar olması nedeniyle büyük ilgi görmüştür. Genel itibariyle altın ya da gümüş nanopartiküller gibi asal metaller ile kaplı ince filimlerin optik dielektrik sabitini ölçen SPR spektroskopisi sensör yüzeyindeki birkaç yüz nanometre içinde meydana gelen refraktif indeks değişikliklerine son derece duyarlıdır. Moleküler baskılanmış polimer temelli SPR sensörler proteinlerin, çevresel kirleticilerin, ilaçların ve gıdaların izlenmesinde sıkça kullanılmaktadır. Ayrıca SPR'nin elektrokimya yada altın çip üzerindeki polimer filmin aşındırılması için yüzey başlatıcılı ATRP ile kombinasyonu güçlü analitik bir tekniktir.

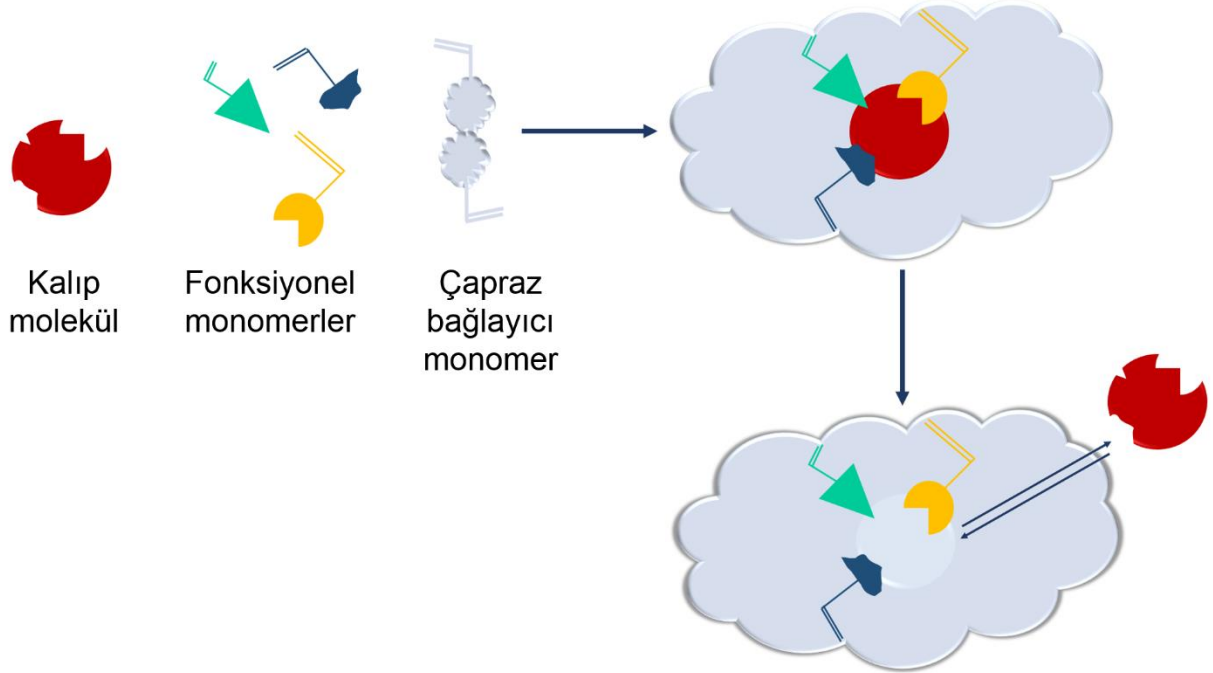
Prednisolon kortizol yapısına benzer bir glukokortikosteroiddir. İlk defa 1955 yılında kortizol'ün mikrobiyolojik oksidasyonu ile sentezlenmiştir. Prednisolon vücuda alındıktan sonra karaciğerde enzimatik parçalanmayla aktif formu olan prednisona dönüştürülür. Prednisolon hem anti-inflamatuar hemde immunosupresif aktiviteye sahip olduğundan sıkça kullanılan bir ilaçtır. Ancak sporcular tarafından yasadışı olarak prednisolon kullanımı Dünya Anti-Doping Ajansı (WADA) tarafından izlenmektedir.

Prednisolon gibi kortikosteroidlerin maksimum kalıntı limitleri komisyon yönetmeliği ile 30 ppb olarak belirlenmiştir. Bu, bir numunede, glukokortikosteroidler 30 ng/mL'den daha yüksek bir derişimde tespit edilirse, yasadışı olarak kullanıldığı anlamına gelmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında prednisolon tayinine yönelik baskılanmış nanopartikül temelli SPR nanosensörler geliştirilmiştir. PRD'nin hızlı, seçici, ucuz ve yerinde tayini doping testleri için oldukça önemlidir. Bu nedenle bu tez çalışmasında PRD'yi spesifik olarak tanıyacak moleküler baskılama teknolojisine başvurulmuştur. Diğer spesifik tanıma ajanlarının (antibadi-antijen gibi) aksine moleküler baskılanmış polimerler oldukça ucuzdur ve raf ömürleri oldukça uzundur. Bu nedenle bu tez çalışmasında moleküler baskılanmış nanopartiküller kullanılmıştır. Farklı oranlarda hazırlanan baskılanmış ve baskılanmamış partiküllerin karakterizasyon işlemleri de partiküllerin yapısal ve morfolojik özelliklerinin belirlenmesi için gerçekleştirilmiştir. Bu baskılanmış nanopartiküller yüzey plazmon rezonans sistemiyle kombine edilerek daha düşük tayin limitlerine inilmiştir. Bağlanma kinetik analizlerine ve denge izoterm modellerine tez çalışması kapsamında yer verilmiştir. Ayrıca sistemin ticari olarak üretimi söz konusu olduğunda sürekliliğinin bir ölçüsü olarak sistemin tekrar kullanılabilirliği test edilmiştir. Sistemin seçiciliği yapısal olarak benzer yarışmacı moleküller vasıtasıyla test edilmiştir. Son olarak hazırlanmış olan nanosensörün validasyon işlemi için standart yüksek performanslı sıvı kromatografisi tekniğine başvurulmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

Moleküler baskılama; kalıp molekül için sentetik polimer içerisinde ligand seçici tanıma bölgelerinin oluşturulmasıdır. Atom, iyon, molekül, kompleks veya moleküler yönelim, iyonik etkileşim ya da makromoleküler yönelimler kalıp olarak kullanılabilir. Polimerizasyon ya da polikondensasyon yöntemiyle yığın fazda kovalent yönelimler esnasında tanıma bölgelerinin oluşturulmasını kolaylaştırmak için kullanılan kalıp moleküllerin bir kısmının veya tamamının polimerizasyon sonrasında ayrılması ve yeni kalıp moleküller için boş tanıma bölgeleri oluşturulmaları gerekmektedir [1-3]. 1930'larda Polyakov silika matrisleri kullanarak başlattığı çalışmasından bu yana moleküler baskılanmış polimerlerin (MIP) sürekli olarak tasarımı, hazırlanması, karakterizasyonu ve uygulanması moleküler baskılama teknolojisinin (MIT'nin) aşamalı olarak gelişmesine ve son yıllarda bilim dünyasında geniş bir ilgi oluşturmaya olanak sağlamıştır [4, 5]. Güncel yöntemlerdeki hızlı gelişimi yansıtan makaleler, derlemeler monografılar moleküler baskılama konusunda hızlı bir artış göstermiştir [6-16].



Şekil 2.1. Moleküler baskılamanın şematik gösterimi [5].

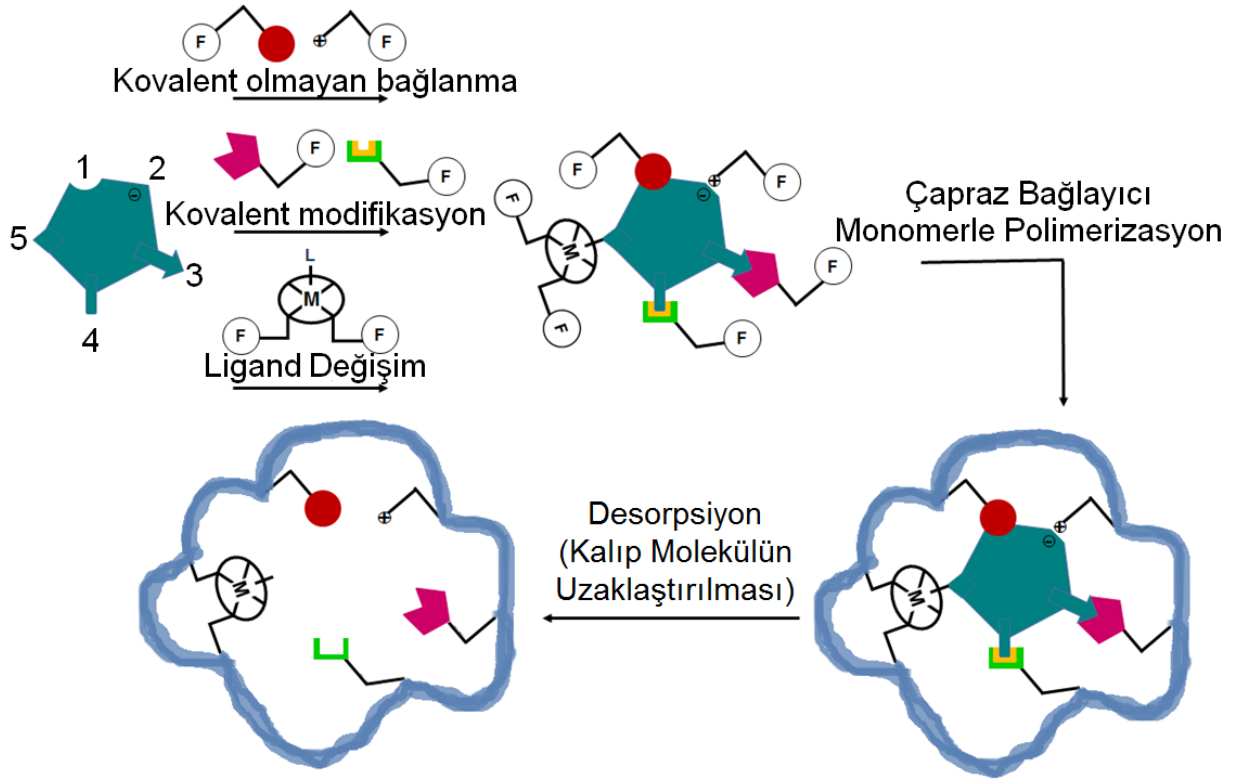
Yapının öngörülebilirliği, spesifik tanıma bölgeleri ve uygulamada evrensellik gibi üç benzersiz özelliğe sahip olan MIP'ler; fiziksel kararlılık, kolay hazırlanabilirlik, yüksek mekanik kararlılık ve düşük maliyetli bir yöntem olması nedeniyle büyük ilgi görmüş ve saflaştırma/ayırma, kemo/biyosensör, yapay antibiyotik ve ilaç salınımı / katalizi / bozunumu gibi birçok alanda ilgi çekici hale gelmiştir [10].

Moleküler baskılama tekniğine gösterilen bu muazzam ilgiye rağmen bu alandaki gelişmeler; nanomalzemelerin sentezi ve floresan problemlerin hazırlanması gibi ilgili diğer teknolojilerin kullanıldığı çalışmalarla karşılaştırıldığında geride kalmıştır. Bunun bir nedeni moleküler baskılamada kullanılan fonksiyonel monomerlerin MIP'lerin seçiciliğini ve daha yaygın kullanımını sınırlandırmasıdır. Diğer bir olasılık ise MIP'lerin hazırlanması için kullanılan moleküler baskılama teknolojilerinin (MIT'lerinin) çeşitli alanlarda uygulanmalarını engelleyecek şekilde bir derece ihmal edilmiş olmasıdır. Multidisipliner bir teknoloji olan MIT'ler; polimer teknolojisi, nanoteknoloji, analitik kimya, çevre bilimi, biyoteknoloji ve benzeri alanlardaki gelişmelerle eş zamanlı olarak hızla geliştirilmelidir. İlgili teknolojiler ve stratejiler ile entegrasyonu moleküler baskılama teknolojisinde önemli ve hızlı gelişmelere olanak sağlayacaktır [5]. Bir dizi mükemmel derleme moleküler baskılama ile ilgili ayrıntılı hesaplamalara yer vermiştir ancak bunların çoğu MIT'leri yerine MIP'lerin temel yönlerini ve karakteristik uygulama alanlarını incelemiştir [17-29]. Literatürde MIP'lerin hazırlanması ile ilgili yeni tekniklere yer veren sadece birkaç derleme mevcuttur [10]. Çok yönlü MIP'lerin hazırlanarak kullanımını arttırmak için MIT'lerinin sürekli gelişimi bir ön koşuldur. Çeşitli akıllı MIT'lerindeki son gelişmelerle, örnek önhazırlığı/kromatografik ayırma ve kimyasal/biyolojik sensörler gibi belirli uygulama alanlarında kullanılabilecek yeni polimer malzemelerin geliştirildiği bildirilmiştir [5].

2.1 Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Temelleri

Moleküler baskılama yöntemi kalıp molekül etrafında çapraz bağlayıcı ve fonksiyonel monomerin polimerizasyonunu içermektedir [30]. İlk olarak, seçilmiş olan kalıp molekül ile tamamlayıcı bir monomer arasında kalıp-monomer kompleksi oluşturulur [2]. Daha sonra çapraz bağlayıcı ile oluşturulmuş olan bu kompleks etrafında polimerizasyon tepkimesini başlatılır. Belirtilmesi gereken en önemli ayrıntı ise kalıp molekül uzaklaştırıldıktan sonra polimer üç boyutlu ağ yapısına sahip geometrik olarak uyumlu

ve fonksiyonel grupların kalıp molekülle uygun bir pozisyonda yönlendiği gözenekleri içeren baskılama bölgeleri içermektedir [5]. Genellikle, MIP'lerin oluşturulması için iki temel yöntem önerilmektedir. Bunlar fonksiyonel monomer ile kalıp molekül arasındaki etkileşimin kovalent ya da kovalent olmayan (non-kovalent) etkileşim olması esasına dayanır. Kovalent baskılama, sitokiyometrik olarak fonksiyonel monomer kalıntılarının sadece baskılanmış kaviteleer içerisine yönelmesini sağlar. Tipik bir yöntem olan kovalent baskılamada genellikle boranat ester, ketaller, asetaller ve Schiff bazlarını içeren ve kolayca tersine çevrilebilir kondensasyon tepkimeleri kullanır [31-33]. Bununla birlikte, kovalent baskılama tersinir kondensasyon tepkimelerinin sınırlı olmasından dolayı daha az esnek bir yöntem olarak kabul edilir. Dahası kuvvetli kovalent etkileşimler; kalıp molekülün yavaş bağlanması ve ayrılması ile sonuçlanacağı için termodinamik dengeye ulaşılması oldukça zordur [3]. Kovalent olmayan baskılamada iyonik etkileşimler, hidrojen bağları, van der Waals kuvvetleri ve π - π etkileşimlerinden yararlanılmaktadır. Literatürde en sık rastlanan ise genellikle metakrilik asit (MAA) gruplarıyla polar olmayan çözücülerin primer aminleri arasında meydana gelen baskın hidrojen bağlarıdır [12]. Son yıllarda kovalent olmayan baskılama; uygulama basitliği ve kalıp molekülün hızlı bağlanmasına ve ayrılmasına olanak sağlaması gibi avantajları nedeniyle genel sentez stratejisi olarak oldukça popüler hale gelmiştir. Ancak kovalent olmayan baskılama kompleks ortamındaki etkileşimlerde meydana gelen en ufak bir parametreye (örneğin ortamda suyun varlığına) bile çok duyarlı olduğundan oluşturulan kompleksler çok sağlam değildir [2]. Hem kovalent baskılamanın sağlamlığından hem de kovalent olmayan baskılamanın hızlı termodinamik denge özelliğinden yararlanmak için bu iki yöntem birleştirilerek yarı-kovalent baskılama adında yeni bir yöntem oluşturulmuştur. Bu yöntemde kalıp molekülün bağlanması kovalent olarak sağlanırken uzaklaşması kovalent olmayan etkileşimlere dayanmaktadır [10].



Şekil 2.2. Moleküler baskılamada kullanılan beş temel yöntem: (1) kovalent olmayan baskılama, (2) elektrostatik/iyonik baskılama, (3) kovalent baskılama, (4) yarı kovalent baskılama ve (5) metal merkezli koordinasyon temelli baskılama [2].

2.2 Moleküler Baskılamanın Temel Unsurları

Tipik bir MIP sentez protokolü; kalıp molekül, fonksiyonel monomer, çapraz bağlayıcı, polimerizasyon başlatıcısı ve çözücü (gözenek oluşturucu çözen) içermektedir. Polimerizasyon tepkimesi; monomer, çapraz bağlayıcı, başlatıcı ve çözücü miktarı ve tipi, polimerizasyon sıcaklığı ve süresi gibi pek çok faktör etkilenmektedir. Bu nedenle üstün özellikli bir MIP hazırlayabilmek için tüm bu parametrelerin etkileri göz önünde bulundurulmalıdır. Özellikle moleküler baskılamanın üç elementi olarak bilinen kalıp molekül, fonksiyonel monomer ve çapraz bağlayıcılar özellikle araştırılmalıdır [5].

2.2.1 Kalıp (Hedef) molekül

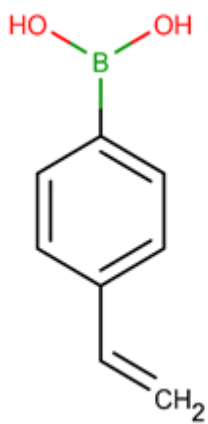
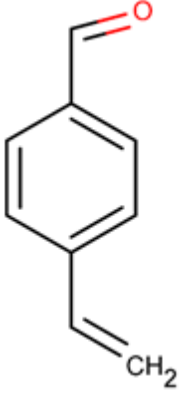
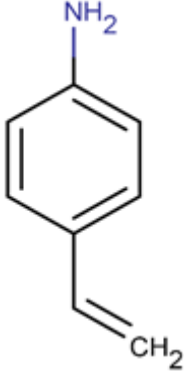
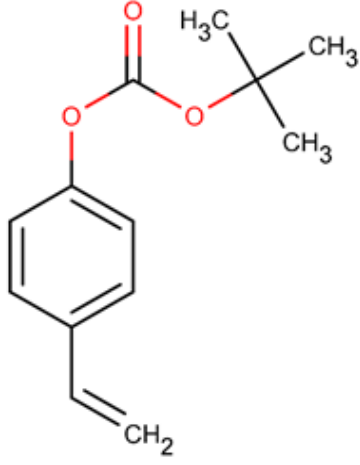
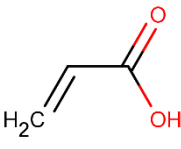
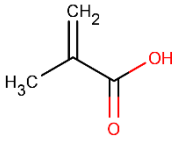
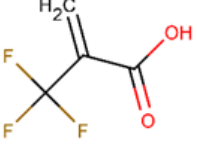
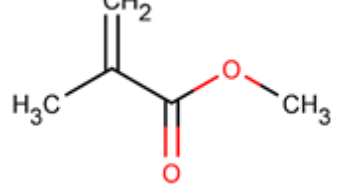
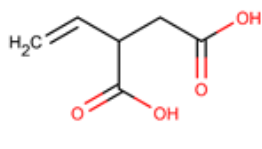
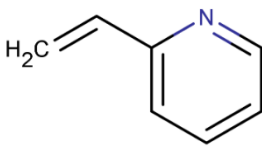
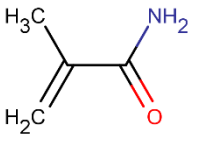
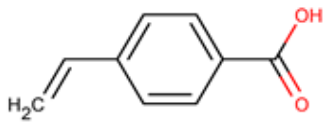
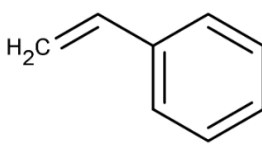
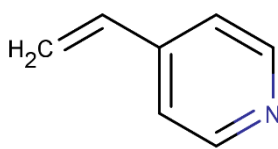
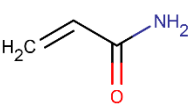
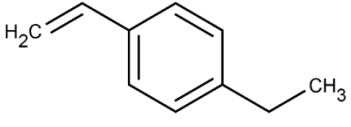
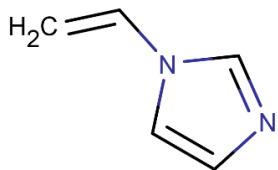
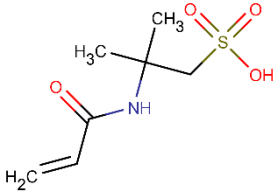
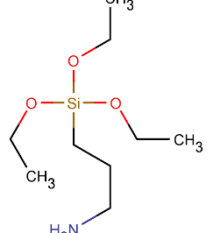
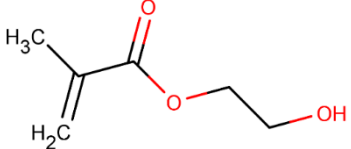
Moleküler baskılamanın nihai amacı gerçek uygulamalarda biyolojik reseptörlere alternatif olarak kullanılabilen nitelikte özgün ve yüksek afiniteli MIP'lerin oluşturulmasıdır. Genel itibarıyla kalıp molekülde bulunması gereken üç temel gereksinim mevcuttur. Bunlar; polimerizasyona engel oluşturmayacak fonksiyonel

gruplar içermelidir, polimerizasyon esnasında mükemmel bir kimyasal kararlılık sergilemelidir, fonksiyonel monomer ile kompleks oluşturabilecek fonksiyonel gruplar içermelidir [10]. Şimdiye kadar MIP'ler, çok sayıda küçük organik molekülün başarılı bir şekilde tanınması ve tespiti için kullanılmıştır. Ayrıca pek çok iyon baskılanmış polimer (IIP) hazırlanmış ve metal iyonlarının ayrılması ve zenginleştirilmesi için kullanılmıştır. Ancak metal iyonları tek başına baskılama kalıbı olarak kullanıldığında; metal iyonlarının aynı yüke, benzer iyonik yarıçapa ve benzer özelliklere sahip olmalarından ötürü hazırlanan polimerlerin seçiciliği oldukça düşüktür [34]. Şimdilerde metal iyonu ve ligand komplekslerinin baskılamada kalıp molekül olarak kullanıldığı yöntemler iyon baskılama için başarılı bir şekilde uygulanmaktadır. Metal iyon-ligand kompleksi fonksiyonel monomer ile basit bir şekilde ön polimerizasyon kompleksini oluşturabilir ve polimerizasyon tepkimesinden sonra metal iyonu elüsyonla uzaklaştırılır. Böylece spesifik tanıma bölgeleri oluşturularak metal iyonları için yüksek adsorpsiyon kapasiteli ve seçici destek malzemeleri elde edilir [35]. Bunlara ek olarak proteinler, virüsler ve hücreler gibi büyük yapıları türlerde baskılanmada kullanılarak MIP'ler oluşturulmuştur. Ancak proteinlerin ve diğer biyomakromoleküllerin baskılanması durumunda hala bir takım sorunlar mevcuttur [36-40].

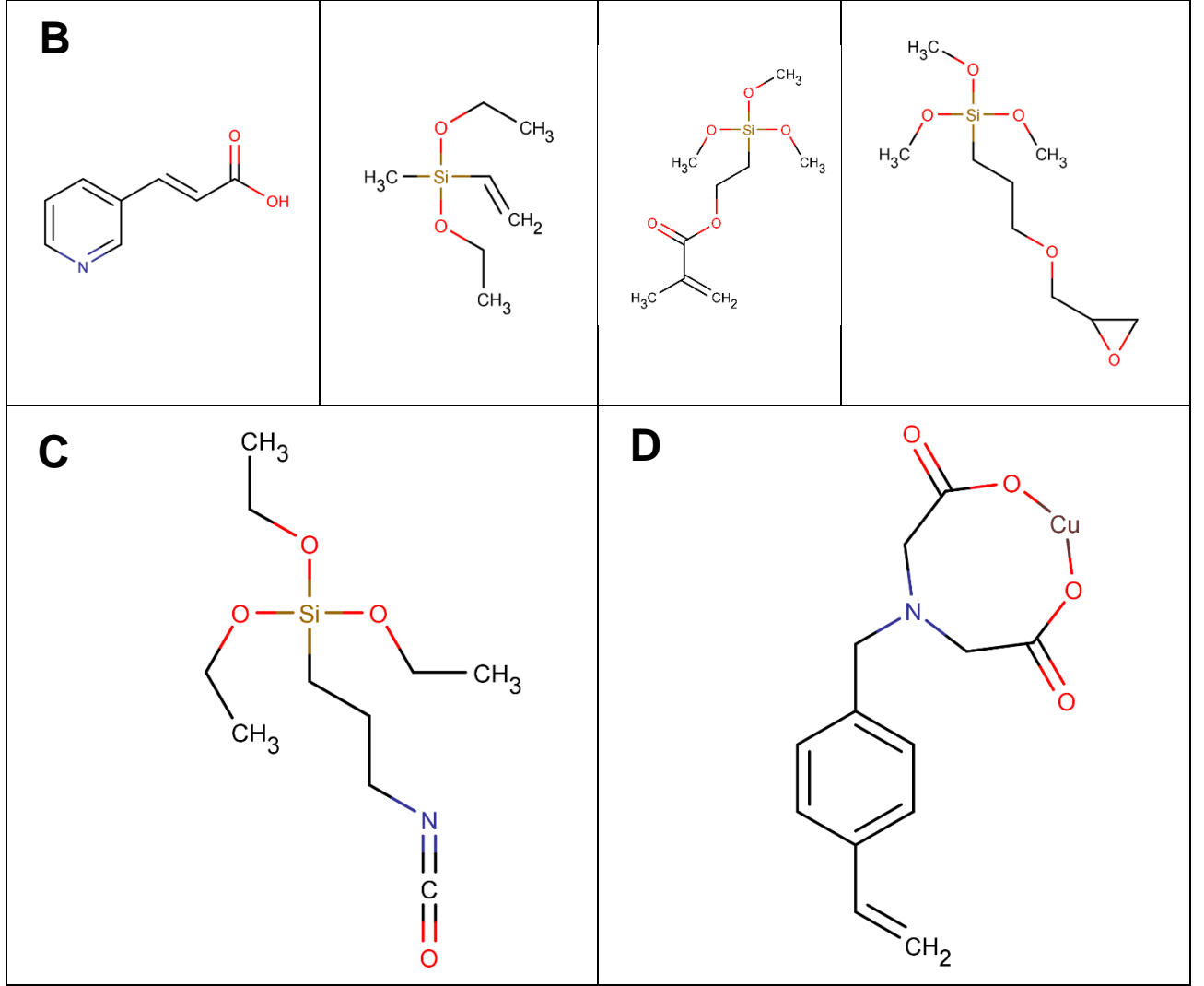
2.2.2 Fonksiyonel monomerler

MIP'lerde fonksiyonel monomerin rolü sahip olduğu fonksiyonel gruplar sayesinde kalıp molekül ile ön polimerizasyon kompleksi oluşturmaktır. Bu nedenle polimerizasyon öncesinde kalıp molekül ile güçlü etkileşim sağlayabilecek ve spesifik donör-reseptör yada antibadi-antijen kompleksi oluşturabilecek uygun bir fonksiyonel monomer seçilmesi oldukça önemlidir. Aşağıda bazı tipik fonksiyonel monomerler gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Moleküler baskılamada kullanılan tipik fonksiyonel monomerler: (A) Kovalent baskılama, (B) Kovalent olmayan baskılama, (C) Yarı-kovalent baskılama, (D) Ligand Değişim temelli baskılama [5].

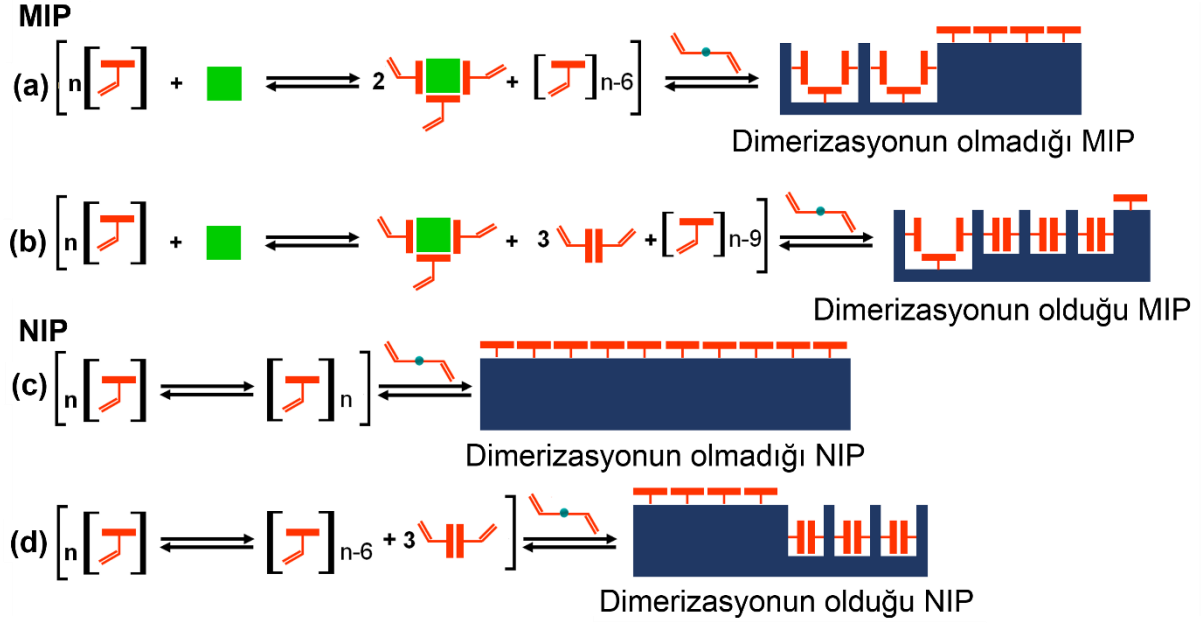
<p>A</p> 			
<p>B</p> 			
			
			
			

Çizelge 2.1. Moleküler baskılamada kullanılan tipik fonksiyonel monomerler: (A) Kovalent baskılama, (B) Kovalent olmayan baskılama, (C) Yarı-kovalent baskılama, (D) Ligand Değişim temelli baskılama (Devamı) [5].



Bunlar arasında metakrilik asit (MAA), hidrojen bağının alıcısı ve vericisi karakterine sahip olmasından dolayı evrensel fonksiyonel monomer olarak tercih edilmektedir. Ayrıca MAA monomerinin dimerizasyonunun (Şekil 2.3) baskılama etkisini azda olsa arttırdığı ve moleküler baskılama için çok yönlü bir monomer olduğu literatürde belirtilen diğer avantajlarındandır. Ayrıca, MAA'ın yüksek molar fraksiyonları kullanılarak büyük gözenek boyutlu polimerik malzemeler elde edilebileceği ve böylece polimerlerin bağlama kapasitesi daha da arttırılabildiği gösterilmiştir [5, 41, 42]. Bilindiği üzere moleküler baskılamada kullanılabilecek fonksiyonel monomerler; MIP'lerin seçilme ve

ileri uygulamalarını sınırlandırdıklarından oldukça azdır. Kalıp molekül ile güçlü etkileşimler yapabilecek yeni fonksiyonel monomerlerin sentezlenmesi bir gerekliliktir. Genel itibariyle, fonksiyonel monomerler iki tür birimin birleştirilmesiyle oluşturulmuştur. Bunlardan biri tanıma birimi diğeri ise polimerin yapısına katılacak olan birimdir [43-51].



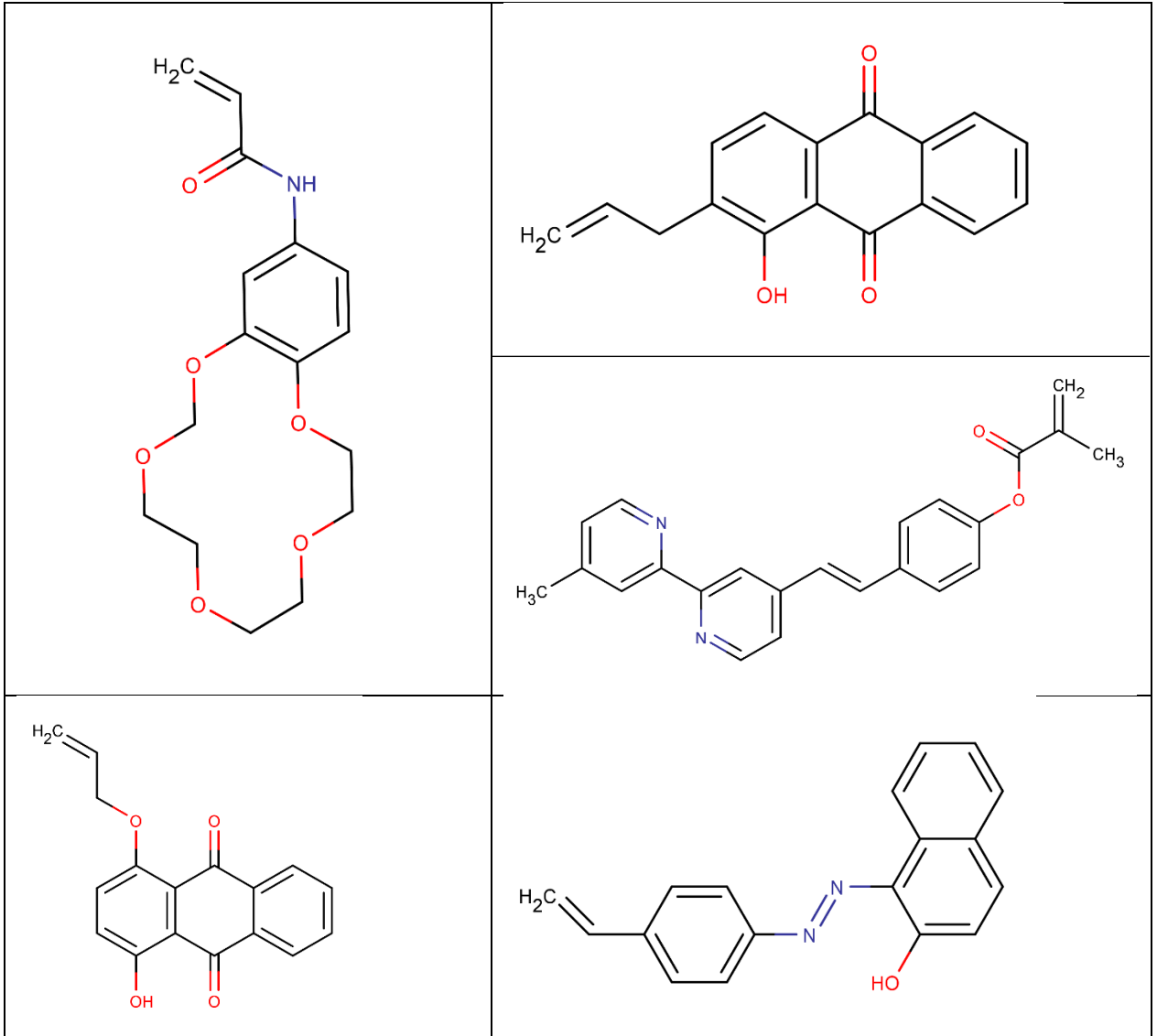
Şekil 2.3. Dimerize olabilen ve olamayan fonksiyonel monomerle hazırlanmış olan baskılanmış (a ve b) ve baskılanmamış (c ve d) polimerlerin şematik olarak karşılaştırılması [41].

2.2.3 Çapraz bağlayıcı monomerler

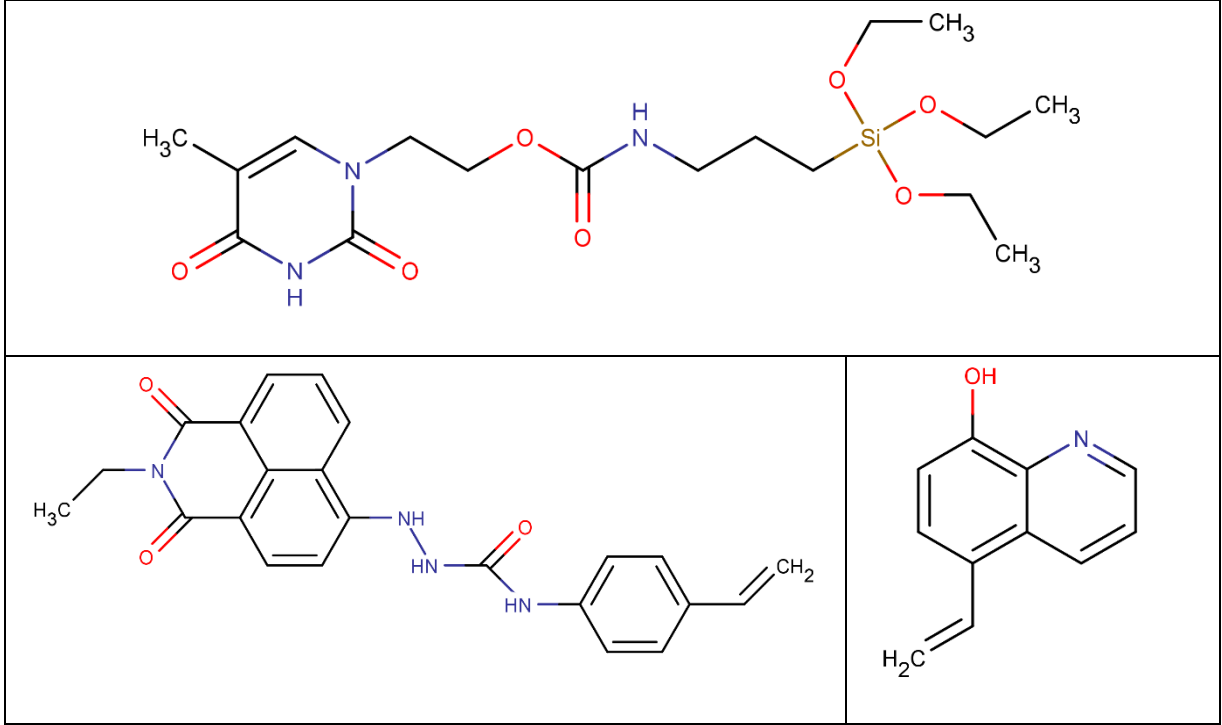
Polimerizasyon sırasında çapraz bağlayıcı monomerler; fonksiyonel monomerin kalıp molekül etrafında sabitlenmesini ve böylece kalıp molekül uzaklaştırıldıktan sonra bile yüksek oranda çapraz bağ içeren katı bir polimer oluşturulmasını sağlar. Çapraz bağlayıcı monomerin türü ve miktarı MIP'lerin bağlama kapasitesini ve seçiciliğini etkilemektedir [30]. Genellikle çok düşük miktarlarda çapraz bağlayıcı monomer kullanılması mekanik olarak kararsız yapıların oluşmasına neden olurken çok yüksek miktarlarda çapraz bağlayıcı monomer kullanılması birim MIP kütlesi başına düşen tanıma bölgelerinin sayısını azaltacaktır. Şimdiye kadar, serbest radikal polimerizasyonunda ve sol-jel işlemlerinde yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcılar Çizelge 2.2'de gösterilmektedir. Ancak mevcut çapraz bağlayıcıların az olmasından ve

moleküler yapılarının bazı katı gereksinimleri olmasından dolayı uygulamalar sınırlıdır. Güçlü difüzyon kontrolüne sahip MIP'lerin sentezlenmesi için yeni çarpaz bağlayıcı monomerlerin geliştirilmesi gereklidir [5, 52, 53].

Çizelge 2.2. Moleküler baskılamada yaygın olarak kullanılan çarpaz bağlayıcı monomerler [5].



Çizelge 2.2. Moleküler baskılamada yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcı monomerler (Devamı) [5].



2.2.4 Gözenek oluşturuçu çözüenler (Porojenler)

Porojenler (porojenik çözücüler) genel olarak polimerizasyon işleminde çözücü ortamı ve gözenek oluşturuçu ajanlar olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle porojenlerde polimerizasyonda önemli bir rol oynamaktadırlar. 2-metoksietanol, metanol, tetrahidrofuran, asetonitril, dikloroetan, kloroform, N,N-dimetilformamid ve toluen; MIP'lerin sentezinde genel olarak kullanılan çözücüler arasındadır [54]. Özellikle kovalent olmayan etkileşimin temel alındığı sistemlerde porojenin polaritesi; kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki etkileşimi ve dolayısıyla MIP'lerin adsorpsiyon özelliklerini doğrudan etkiler. Kovalent olmayan baskılamada polimerin adsorpsiyon kapasitesi ve morfolojik özellikleri kullanılan çözücünün tipine bağlı olduğundan iyi bir baskılama etkisi elde etmek için genellikle toluen, asetonitril ya da kloroform gibi polar olmayan ya da az polar organik çözücüler kullanılmaktadır.

Moleküler baskılama için çözücü ve monomerlerin seçiminde ve MIP'nin seçiciliğinin belirlenmesinde teorik formüllerin kullanımı oldukça önemlidir [55]. Son zamanlarda kendine has özellikleri olan oda sıcaklığı iyonik sıvılarına (RTIL) literatürde yeni bir çözücü sınıfı olarak yer verilmiştir. RTIL'lerin ihmal edilebilir düzeyde buhar basıncına sahip olması MIP kavitelerinin büzülme sorununun çözülmesine yardımcı olur ve polimerizasyon sırasında kalıp molekül gibi gözenekte oluşturabilirler. Ayrıca RTIL'ler trans-akonitik baskılanmış organik polimerlerin sentezini hızlandırabilir, seçiciliğini ve adsorpsiyon kapasitesini de arttırabilir [56, 57].

2.2.5 Başlatıcılar

Bilindiği üzere MIP'lerin büyük bir kısmı serbest radikalik polimerizasyon (FRP), fotopolimerizasyon ve elektropolimerizasyon ile hazırlanmaktadır. Geniş bir aralıkta fonksiyonel gruplar ve kalıp yapıları için kullanılacak olan FRP termal olarak ya da fotokimyasal olarak başlatılabilir. Başlatıcı olarak peroksi ve azo yapıları sıkça kullanılmaktadır [30]. Azobisisobutyronitril (AIBN) düşük ayrışma sıcaklıklarında (50 – 70 °C) kullanılan en uygun başlatıcıdır. Polimerizasyon tepkimesinin sağlıklı bir şekilde gerçekleşmesi için, polimer zincirinin proliferasyonundan (büyümesinden) hemen önce çözeltideki çözülmüş oksijenin uzaklaştırılması oldukça önemlidir. Çözeltideki çözülmüş oksijen, nitrojen ya da argon gibi inert bir gazın çözeltiden geçirilmesi yolu ile de uzaklaştırılabilir [5].

2.3 MIP'lerin hazırlama yöntemleri

İstenilen özelliklerde MIP'lerin elde edilebilmesi için uygun hazırlama yönteminin seçilmesi oldukça önemlidir. Genel olarak MIP hazırlama mekanizması serbest radikalik polimerizasyonu ve sol-jel yöntemini içermektedir. Yığın polimerizasyonunda serbest radikalik polimerizasyon en yaygın olarak kullanılan yöntemdir. Bu yöntemde elde edilen polimerlerin boyutunu küçültmek için mekanik parçalama ve eleme yöntemleri kullanılmaktadır ancak yinede MIP'lerin bağlama kapasitesi teorik değerlere göre daha düşüktür. Ayrıca bu yöntemde yüksek miktarda kalıp molekülün kullanılması gerekmektedir. Yığın polimerizasyonunun bu problemlerini giderebilmek için daha gelişmiş ve karmaşık polimerizasyon yöntemleri geliştirilmiş ve partikül, membran, monolit ve tek tabakalı moleküler baskılama gibi pek çok farklı formda MIP elde edilmiştir. Partiküllerin hazırlanması için süspansiyon polimerizasyonu, emülsiyon

polimerizasyonu, çekirdek polimerizasyonu ve çöktürme polimerizasyonu gibi pek çok dikkat çekici polimerizasyon yöntemi kullanılmıştır [5].

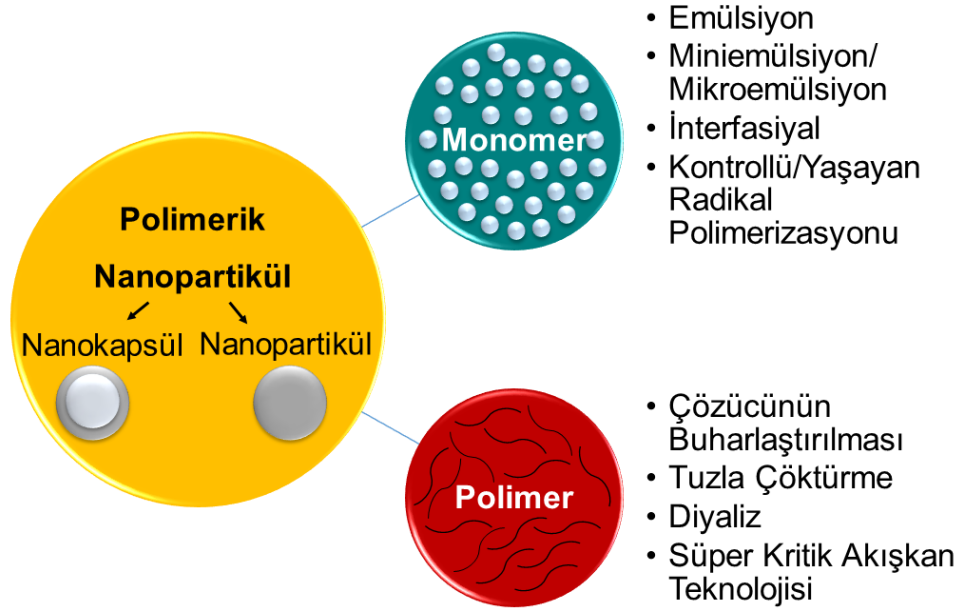
2.3.1 Polimerik Nanopartiküllerin Hazırlanması

Elektronikten fotonığe, iletken malzemelerden sensörlere, tıptan biyokimyaya, kirlilik kontrolünden çevre teknolojilerine ve benzeri daha pek çok alanda polimer temelli nanopartiküllerin (PNP) kullanımı önemli bir rol oynamaktadır [58-65]. Son yıllarda nanopartiküllerin; gerek geniş bir yelpazede uygulama alanına sahip olması gerekse pazar ihtiyaçlarını karşılaması gibi benzersiz özellikleri kullanımlarını yaygınlaştırmıştır [66]. PNP'lerin özelliklerinin, uygulama alanına göre optimize edilmesi gerekmektedir. PNP'lerin hazırlanma şekli ilgili özelliklerin kazandırılması için bir ön koşuldur. Bu nedenle, özel bir uygulamada kullanılmak üzere arzu edilen özelliklere sahip PNP'lerin elde edilmesi için farklı hazırlama tekniklerine başvurulması son derece avantajlıdır [67-76].

Nanopartiküller genel itibariyle boyutları 10 ila 1000 nm arasında değişen ve kolloidal dağılım sergileyen katı parçacıklar olarak tanımlanmaktadır [77, 78]. Polimerik nanopartikül terimi, özellikle nanokürelerin ve nanokapsüllerin ifade edilmesi için kullanılan ve herhangi bir nanoparçacık yapısını belirten kolektif bir terimdir. Genel itibariyle küre şeklinde olan nanoküreler parçacık matrisleridir yani tüm kütleyi oluşturan partiküller katıdır ve moleküller kürenin yüzeyine adsorbe edilebilir ya da partikülün içinde kapsüllendirilebilir [79]. Nanokapsüller ise saklama haznesi görevi gören veziküler sistemlerdir. Nanokapsül yapısında ilgili molekül sıvı bir çekirdekten (yağ ya da su) ve onu çevreleyen katı bir malzeme olan kabuktan oluşan bir kavite içerisine hapsedilir [80].

Polimerik nanopartiküller geleneksel olarak iki temel yöntemle hazırlanabilirler. Bunlardan biri önceden oluşturulmuş polimerin dispersiyonu, diğeri ise monomerleri kullanarak klasik polimerizasyon ya da çoklu tepkime teknikleri ile doğrudan polimerlerin oluşturulmasıdır [81]. Çözücünün buharlaştırılması, tuzla çöktürme, diyaliz, süperkritik çözeltinin hızlı genişmesi ve süperkritik çözeltinin sıvı çözücü içerisinde hızlı genişmesini içeren süperkritik akışkan teknolojisi gibi yöntemlerle polimerik nanopartiküller var olan polimerin dispersiyonu ile elde edilebilir. Öte yandan, polimerik

nanopartiküller monomerlerin; mikroemülsiyon, miniemülsiyon, sürfaktansız (yüzey aktif maddelerin kullanılmadığı) emülsiyon ve interfasiyal (arayüz) polimerizasyonu gibi farklı tekniklerle polimerleştirilmesi ile doğrudan da sentezlenebilir [66]. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanma yöntemi seçilirken uygulama alanı, arzu edilen boyut dağılımı ve polimerik sistemin tipi gibi faktörler baz alınır. Örneğin, biyomedikal ya da çevresel alanlarda uygulanmak üzere geliştirilmiş bir polimer sisteminin katkı maddelerinden ve yüzey aktif maddeler ya da organik çözücüler içeren reaktantlardan tamamen arındırılmış olmalıdır. Böyle bir durumda, polimerik nanopartiküllerin hazırlanması aşamasında organik çözücülerin ve yüzey aktif maddelerin kullanılmadığı süperkritik çözeltilerin hızlı genişmesi (RESS) ya da süperkritik çözeltilerin çözücü içerisinde hızlı genişmesi (RESOLV) teknikleri tercih edilebilir. Bu faktörler polimerik nanopartiküllerin hazırlanması aşamasında seçilecek yöntemin belirlenmesinde dikkat edilmesi gereken pek çok öğeden sadece bir kaçıdır [66].



Şekil 2.4. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanması için kullanılan bazı tekniklerin şematik gösterimi [66].

2.3.1.1 Var olan Polimerlerin Dispersiyonu

Var olan polimerlerin dispersiyonu ile polimerik nanopartiküllerin elde edilmesi için başarılı bir şekilde uygulanmış birkaç yöntem mevcuttur [66].

2.3.1.1.1 Çözücünün Buharlaştırılması

Var olan polimerlerden polimerik nanopartiküllerin hazırlanması için tercih edilen ilk yöntem çözücünün buharlaştırılmasıdır [82]. Bu yaklaşım ilk olarak polimer kimyacıları tarafından önerilmiştir ancak ilaçların üretiminden kullanılan biyobozunur polimerlerin hazırlanması aşamasında farmasötik teknolojilerinden yararlanılarak teknik geliştirilmiştir [83]. Bu yöntemde diklorometan ve kloroform gibi organik çözücülerin kullanımı oldukça yaygındır ancak son yıllarda bu çözücüler yerinin daha düşük bir toksikolojik yapıya sahip olan etil asetata bırakılmaktadır. Emülsiyon, sürekli sistemde polimerin dağıtıldığı çözeltilerin buharlaştırılmasıyla nanopartikül süspansiyonuna dönüştürülür [75, 84]. Çözücünün buharlaştırılması; polimerik nanopartiküllerin var olan polimerlerin dispersiyonu ile hazırlanması durumunda literatürde en çok tercih edilen yöntemdir. Geleneksel teknikte emülsiyonun oluşturulması için iki temel strateji kullanılmaktadır. Bunlar yağ damlacıklarının suyun içinde bulunduğu (y/s) tekli emüsyonlar ve içinde su barındıran yağ damlacıklarının suyun içinde bulunduğu ((s/y)/s) çoklu emüsyonlardır. Bu teknikler düşük basınç altında ya da oda sıcaklığında sürekli manyetik olarak karıştırılarak çözücü buharlaştırıldıktan sonra yüksek hızda homojenizasyonla veya ultrasonikasyonla gerçekleştirilmektedir. Daha sonra katılaştırılmış olan nanopartiküller ultrasantrifüj ile toplanır ve yüzey aktif maddelerin ve katkı maddelerinin uzaklaştırılması için distile suyla yıkanarak liyofilize edilerek saklanır. Genel olarak polimer organik bir çözücü içerisinde çözülerek yağ fazı oluşturulurken su fazında stabilizatörler bulunmaktadır [66]. Literatürde hem tek fazlı hem de çift fazlı emülsiyon tekniğinin kullanıldığı durumlarda deneysel parametrelerin partikül boyutuna olan etkisi incelenmiştir [85]. Elde edilen sonuçlardan yola çıkılarak polivinil alkol (PVA) (stabilizatör) derişiminin arttırılması durumunda nanopartiküllerin boyutlarının küçüldüğü gözlenirken homojenizasyon hızı, buharlaştırma oranı ya da dondurarak kurutma gibi işlemlerin boyutu anlamlı derecede etkilemediği belirtilmiştir [85]. Diğer bir çalışmada ise yüzey aktif maddenin derişiminin arttırılması (Sodyum dodesil sülfat (SDS), % 3 (m/v) ya da daha yüksek) emülsifikasyon basamağını iyileştirmekte ve böylece partikül boyutunun ve polidispersite katsayısının küçülmesine olanak sağlamıştır [86]. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanması esnasında çözücünün buharlaştırması tekniği basit bir yöntem olmasına rağmen zaman alıcıdır ve

buharlaşma sırasında oluşan nanodamlacıkların kaynaşması partikül boyutunu ve yapısını etkileyebilir [66].

2.3.1.1.2 Tuzla öktürme

Çözeltinin buharlaştırılması tekniğinde kullanılan organik çözücülerin hem fizyolojik hem de çevresel zararlarından dolayı emülsiyon basamağı tuzla çöktürme yöntemini içerecek şekilde değiştirilmiş ve böylece yüzey aktif maddelerin ve klorlu çözücülerin kullanımına duyulan ihtiyaç ortadan kaldırılmıştır. Çözücünün buharlaştırılması yönteminde aseton gibi suyla karışabilen polimer çözücüsüyle sulu fazdaki emülgatör polimer çözeltisi kullanılarak oluşturulan emülsiyon, tuzla çöktürme metodunda yüksek derişimlerde tuzun ya da sukrozun sulu faz içerisinde çözülerek güçlü tuzla çöktürme etkisi oluşturmasıyla sağlanır [87, 88]. Magnezyum klorür, kalsiyum klorür ve magnezyum asetat bu teknikte sıkça tercih edilen elektrolitlerdir [89-95].

2.3.1.1.3 Nanoöktürme

Polimerik nanopartiküllerin hazırlanması için geliştirilen diğer bir yöntemse çözücü yer değişimi olarak da adlandırılan nanoöktürmedir [96]. Yöntem, lipofilik çözeltideki, suyla karışabilen, yarı polar bir çözücünün yerdeğişimi sonucu polimerin arayüzeyde çöktürülmesi esasına dayanır. Çözeltinin özücü olmayan bir faz içinde hızlı bir şekilde difüzlenmesiyle iki faz arasındaki arayüz gerilimi azalırken yüzey alanı artar ve bu sayede küçük damlacıklar şeklinde organik çözücüler oluşur [96, 97]. Nanoöktürme sistemi üç temel bileşene sahiptir. Bunlar; polimer (sentetik, yarı sentetik ya da doğal), polimer çözücüsü ve polimerin çözünmediği bir özücü. Su ile karışabilen ve kolay bir şekilde buharlaştırılabilen etanol, aseton, hekzan, metilen klorür ya da dioksan gibi organik çözücüler polimer çözücüsü olarak sečililmektedir. Bu özelliklere uygun olması nedeniyle aseton bu yöntemde en çok tercih edilen organik çözücüdür [96, 98, 99]. Bazen, aseton ve az miktarda su ya da aseton ve etanol/metanol gibi ikili çözücü karışımı da kullanılabilir [100-103]. Diđer yandan, bir çözücü olmayan maddeden yada çözücü olmayan bir karışımdan oluşan çözücü olmayan faz bir tane yada daha fazla doğal yolla elde edilmiş yada sentetik yüzey aktif madde içerir. Teorik olarak bu yöntemde kullanılabilir çok fazla polimer bulunmasına rağmen uygulamada araştırmacılar sadece bir kaçıını kullanmayı uygun görmüşlerdir. Nanoöktürme yöntemi, nanokürelerin ve nanokapsüllerin hazırlanmasında tercih edilen basit, hızlı ve

tekrar edilebilir bir yöntemdir. Her ne kadar düşük konsantrasyonlarda yüzey aktif madde kullanımı önerilse de organik fazdaki polimer konsantrasyonun da düşük olması yöntemin dezavantajıdır [104].

2.3.1.1.4 Diyaliz

Küçük ve boyut dağılımı dar bir skalda polimerik nanopartiküllerin elde edilmesi için önerilen basit ve etkili bir diğer yöntem ise diyalizdir. Organik bir çözücüde çözülmüş olan polimer belli bir molekül ağırlığında hazırlanmış olan diyaliz tüplerine yerleştirilir ve çözücü olmayan ancak çözücü ile karışabilen bir maddeye karşı miselleri oluşturmak için diyaliz edilir. Membranların içindeki çözücünün değişmesi, çözünürlüğün azalması nedeniyle polimerin kademeli agregasyonunu ve homojen nanopartikül süspansiyonunun oluşmasını sağlar. Polimerik nanopartiküllerin diyaliz yöntemi ile hazırlanmasının mekanizması henüz tam olarak anlaşılammıştır ancak mekanizmanın nanoçöktürme yöntemine benzediği düşünülmektedir. Diyaliz esnasında farklı parametreler değiştirilerek pek çok polimerik ve kopolimerik nanopartikül elde edilmiştir [96, 105-107].

2.3.1.1.5 Süperkritik Akışkan Teknolojisi

Diğer yöntemlerde görüldüğü üzere organik çözücüler ve yüzey aktif maddeler gibi doğaya zararlı kimyasallar kullanımı araştırmacıları çevre dostu yöntemler aramaya sevk etmiştir. Bu bağlamda süperkritik akışkanların yüksek saflıkta ve organik çözücüler olmadan polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanımı yeni bir seçenek olarak öne sürülmüştür [108, 109]. Süperkritik akışkan ve yoğun gaz teknolojileri partiküllerin hazırlanmasında geleneksel yöntemlerin dezavantajlarını bertaraf edecek ilginç ve etkili bir yöntem önermektedir. Literatürdeki çalışmalarda süperkritik akışkanlar ve yoğun gaz teknolojisi kullanılarak genel itibariyle farmasötik partiküllerin hazırlanması, formülasyonu ve kontrolü hedeflenmiştir.

Süper akritik akışkanlar kullanılarak nanopartiküllerin elde edilmesinde iki temel prensip geliştirilmiştir:

1. Süperkritik çözeltilerin hızlı genişmesi (RESS)
2. Süperkritik çözeltilerin çözücü içerisinde hızlı genişmesi (RESOLV) [110-114]

RESS yönteminde, kapiler bir ağızlıktan veya delikten geçirilerek çözeltinin hızlı bir şekilde genişletilmesinden sonra katı süperkritik akışkan içinde çözülerek çözeltiler meydana getirilir. Genleşme sırasında basıncın hızla düşürülmesi ile sağlanan yüksek derecedeki süper satürasyon homojen çekirdek oluşumu ile sonuçlanır ve böylece iyi dağılımlı partiküller oluşur. RESS için gerçekleştirilen farklı mekanistik çalışma sonuçları bu yöntem ile hem mikro hem de nano skalada partiküllerin elde edilebileceğini göstermiştir. Her ne kadar organik çözücülerin kullanılmadığı çevre dostu bir teknik olsa da bu yöntemle elde edilen ürünlerin nano yapılardan çok mikro yapılarda olması sistemin dezavantajıdır [115, 116]. Bu dezavantajı ortadan kaldırmak için süperkritik çözeltilerin çözücü içerisinde hızlı genişmesi (RESOLV) yöntemi önerilmiştir. Basit fakat etkili bir modifikasyonla RESS'de hava ortamında gerçekleştirilen süperkritik çözeltinin genişmesi basamağı bu yöntemde bir çözücü içerisinde yer almaktadır. Çözücü çekirdek büyümesini bastırır ve böylece nano boyutlu partiküller elde edilir. Bu yöntemlerde kullanılabilecek karbon monoksit, n-pentan, su, amonyak gibi pek çok süperkritik akışkan mevcuttur ancak bu yöntemlerin aktif olarak kullanılmasının önündeki en büyük engel elde edilen nanopartiküllerin çözünürlüğünün çok düşük olması hatta bazılarının hiç çözünür olmamasıdır [117, 118].

2.3.1.2 Monomerlerin Polimerizasyonu

Var olan polimerlerin dispersiyonu ile polimerik nanopartiküllerin eldesi kısmında hiçbir polimerizasyon basamağı bulunmamaktadır. Özel bir uygulama için arzu edilen özelliklere sahip polimerik nanopartiküllerin elde edilebilmesi için ise monomerlerin polimerizasyonu işlemine başvurulur. Polimerik nanopartiküllerin monomerlerin polimerizasyonu ile elde edilmesi için genel itibariyle üç temel tekniğe başvurulur. Bunlar mini emülsiyon, mikro emülsiyon ve emülsiyon polimerizasyonudur. Polimerik nanopartiküllerin polimerizasyon ile hazırlanmasında başvuru diğer bir yöntem ise interfasiyal (arayüz) polimerizasyonu ve kontrollü/yaşayan radikalik polimerizasyon gibi hetero polimerizasyon çeşitleridir [66].

2.3.1.2.1 Emülsiyon Polimerizasyonu

Özel uygulama için kullanılacak pek çok polimerik nanopartikülün hazırlanmasında emülsiyon polimerizasyonu yöntemi tercih edilmektedir. Polimerizasyon ortamında su kullanımı hem çevre dostu bir uygulamadır hem de polimerizasyon boyunca mükemmel

bir ısı dağılımı sağlar. Yüzey aktif maddelerin kullanımına göre geleneksel ve sürfaktansız (yüzey aktif madde kullanımı olmayan) emülsiyon polimerizasyonu olarak sınıflandırılır [119, 120].

Geleneksel emülsiyon polimerizasyonu, emülsiyon polimerizasyonu ile elde edilen polimerik nanopartiküllerin büyük bir çoğunluğunu oluşturmaktadır. Geleneksel polimerizasyonda suya ek olarak suda çözünürlüğü az olan bir monomer, suda çözünebilen bir başlatıcı ve yüzey aktif madde bulunmaktadır. Polimerizasyon sonunda genellikle $\sim 10^2$ nm boyutunda pek çok polimer zinciri içeren polimerik nanopartiküller elde edilmektedir. Stabilizasyon için kullanılan koloidal stabilizatörler elektrostatik ya da sterik (elektrosterik) olabilir. Sabit fazda çözünmüş olan bir monomerin, iyon halindeki ya da serbest radikal formdaki bir başlatıcı ile çarpışmasıyla polimerizasyon başlar. Diğer bir yöntem ise monomerin, γ -radyasyon, ultraviyole ya da kuvvetli görünür ışık gibi yüksek enerjili radyasyonla radikalik başlatıcı olarak kullanılmasıdır [121]. Katı partiküllerin faz ayırımı ve oluşumu, polimerizasyon tepkimesinin bitiminden önce ve sonra gerçekleşebilir. Geleneksel emülsiyon polimerizasyon sistemleri farklı miktarlarda yüzey aktif maddeler içermektedir ancak nihai ürün elde edildikten sonra bu maddelerin uzaklaştırılması gerekmektedir ve bu oldukça zordur. Yüzey aktif maddelerin uzaklaştırılması üretim maliyetini arttıran zaman alıcı bir basamaktır. Dahası artan çevre duyarlılığı ve enerji kaygısı bu basamaktan dolayı yöntemin etkinliğinin azalmasına neden olmuştur. Alternatif olarak ise emülsiyon polimerizasyonu herhangi bir emülgatör kullanılmadan gerçekleştirilmiş ve literatürde yüzey aktif maddesiz, emülgatörsüz ya da deterjansız emülsiyon polimerizasyonu olarak adlandırılmıştır [122-126]. Bu teknikte, polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında stabilize edici yüzey aktif maddelerin kullanımına başvurulmadığından dolayı basit ve çevre dostu bir işlem olarak ilgi odağı haline gelmiştir. Emülgatörsüz polimerizasyonda; ultra saf su, suda çözünebilen bir başlatıcı (KPS: potasyum persülfat gibi) ve genellikle vinil ya da akril yapılarının tercih edildiği bir monomeri içeren üç temel bileşen mevcuttur [127, 128]. Bu tarz polimerizasyon sistemlerinde polimerik nanopartiküllerin stabilizasyonu iyonlaşabilen başlatıcılar ya da iyonik ko-monomerlerle sağlanır. Emülgatörsüz emülsiyon polimerizasyonda çekirdeklenme (nükleasyon) ve partikül büyümesi için misel benzeri çekirdeklenme

yada homojen çekirdeklenme gibi birkaç farklı mekanizma önerilmiştir. Misel benzeri çekirdeklenme ile homojen çekirdeklenme arasındaki temel fark monomerin suda çözünebilirliğidir. Homojen çekirdeklenme emülgatörsüz emülsiyon polimerizasyonunda önemli rol oynamaktadır. Emülgatörsüz polimerizasyonun pek çok avantajı mevcuttur ancak eş boyutlu partiküllerin elde edilememesi ve partikül boyutunun yeterince kontrol edilememesi gibi problemler bu polimerizasyon çeşidinin geleneksel yöntemler kadar çok kullanılmasını engellemektedir [129, 130].

2.3.1.2.2 Mini-emülsiyon Polimerizasyonu

Geniş bir yelpazede kullanışlı polimerlerin sentezi için mini emülsiyon polimerizasyonu ile yapılan çalışmalar son yıllarda oldukça artmıştır. Tipik bir mini emülsiyon polimerizasyon sistemi su, monomer karışımı, yardımcı stabilizatör, yüzey aktif madde ve başlatıcıdan oluşmaktadır. Emülsiyon polimerizasyonu ile mini emülsiyon polimerizasyonu arasındaki temel fark güçlü bir parçalama mukavemetine sahip cihazların (ultrason gibi) kullanımı ve yardımcı stabilizatör olarak düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin tercih edilmesidir. Mini emülsiyon sistemlerinde; kararlı bir hale ulaşmak ve sıfırdan daha büyük bir ara yüzey gerilimi oluşturarak kritik stabilizasyonu sağlamak için yüksek parçalama mukavemetine sahip cihazlar kullanılmaktadır. Çok amaçlı bir polimerik nanopartikülün geliştirilmesi aşamasında pek çok farklı stabilizatör ve başlatıcı farklı kombinasyonlarla kullanılır. Polimerik nanopartiküllerin oluşmu ve doğası bu kombinasyonlardan büyük ölçüde etkilenir [131-135]. Her ne kadar mini-emülsiyon polimerizasyonunda çok az miktarda yüzey aktif madde kullanılsa da polimer lateksi içerisinde kalan yüzey aktif maddeler polimerik nanopartiküllerin özelliklerini değiştirebilir. Bu problemi ortadan kaldırmak için stirenin polimerizasyonu için mini emülsiyon polimerizasyonunda için SMA ve DMA gibi oldukça hidrofobik stabilizatörler kullanılmıştır. Bu yaklaşımın en önemli özelliği, SMA ve DMA'nın polimerizasyon esnasında emülsiyon polimerinin içine kimyasal olarak katılmasını sağlayarak miniemülsiyonların hazırlanmasında yardımcı bir yüzey aktif madde gibi davranmalarıdır. Böylece lateks ürünlerdeki istenmeyen uçucu organik bileşenler en aza indirilmiştir [136]. Manyetik bir çekirdek, manyetit ya da biyobozunur polimerik bir kabuk içeren çekirdek-kabuk yapısındaki polimerik nanopartiküllerde mini-emülsiyon yöntemiyle başarılı bir şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan partiküllerin morfolojik

karakterizasyonlarının yanı sıra kaplama etkinliğide yüzey analizi çalışmaları kapsamında gerçekleştirilen elektroforez ve temas açısı ölçümleri ile gösterilmiştir. Karma parçacıkların hareketliliği, pH ve saf polimere benzer şekilde aracı maddenin iyonik gücü ile değiştirilebilir. Kompozit partiküllerin hareketliliği ortamın pH ve iyonik gücüne bağlı olarak kuramsal polimerininkine benzer bir şekilde değişmiştir. Bu nedenle magnetitlerin elektriksel yüzey özellikleri polimer kaplanmasından sonra neredeyse tamamen maskelenmiştir [137]. Polisitiren/tek duvar karbon nanotüp kompozit malzemesi SDS ve 1-pentanolün sırasıyla yüzey aktif madde ve yardımcı yüzey aktif madde olarak kullanıldığı ortamda mini emülsiyon polimerizasyonu ile hazırlanmıştır [138].

2.3.1.2.3 Mikro-emülsiyon Polimerizasyonu

Mikro-emülsiyon polimerizasyonu nano boyutlu polimerlerin elde edilmesi için tercih edilen yeni ve etkili bir yöntem olarak dikkate çekmiştir. Her ne kadar emülsiyon ve mikro-emülsiyon polimerizasyonu her iki yöntemde de yüksek molar kütleli polimerik kolloidalların oluşturulması açısından benzerlik gösterebilir kinetik olarak karşılaştırıldıklarında tamamen farklıdırlar. Emülsiyon polimerizasyonunda üç tepkime hız aralığı sergilenirken mikro-emülsiyon polimerizasyonunda bu iki tepkime hız aralığı olarak tespit edilmiştir. Ayrıca mikro emülsiyon polimerizasyonda hem partikül boyutu hemde her bir partiküldeki ortalama zincir sayısı oldukça azdır [139]. Mikro emülsiyon polimerizasyonunda suda çözünebilen bir başlatıcı, misel içeren termodinamik olarak kararlı mikro-emülsiyonun sulu fazına eklenir. Polimerizasyon bu termodinamik olarak kararlı basmaktan başlar, kendiliğinden oluşan bir aşamada devam eder ve yağ/su arayüzündeki ara-yüz gerilimini sıfıra yakın bir değer indirecek kadar yüksek miktarda yüzey aktif madde sistemi ile sonlanır. Ayrıca, partiküller yüksek miktarda yüzey aktif madde kullanımı nedeniyle tamamen yüzey aktif madde ile kaplanmıştır. Başlangıçta; başlatıcı tüm mikro-damlacıklarda eş zamanlı olarak ulaşamadığından polimer zincirleri sadece bazı damlacıklarda oluşur. Daha sonra zincirlerin ozmotik ve elastik etkisi kararlılığı düşük mikro-emülsiyonların kararlılığını tamamen bozar. Ayrıca bu etki ikincil çekirdeklenmelerin, boş misellerin oluşumunun ve partikül boyutunun artmasına neden olur [140-142].

2.4 Moleküler Baskılama Teknolojisi

Daha önceden bahsettiğimiz geleneksel hazırlama ve baskılama yöntemleri sürekli olarak kullanılmış ve MIP sentezi ve performansı geliştirilmiştir ancak sonuçta elde edilen MIP'ler hala kalıp molekül sızıntısı, düşük bağlama kapasitesi, düzensiz malzeme şekli, sulu ortamın uygun olmaması gibi pek çok probleme sahip olması uygulama alanlarını oldukça sınırlandırır. Bu problemlerin giderilmesi için çeşitli yeni moleküler baskılama teknoloji ve stratejileri gelişmiş hazırlama teknikleri ile birleştirilerek kullanılmış ve böylece geniş uygulama alanına sahip yeni ve üstün özellikli MIP'ler hazırlanmıştır. Yeni moleküler baskılama teknolojiler üç ana basamak altına toplanmaktadır. Bunlar; yeni nesil teknolojiler (yüzey baskılama teknolojisi, nanobaskılama teknolojisi gibi), özel baskılama stratejileri (çok kalıp moleküllü baskılama, çok fonksiyonel monomerle baskılama, taklit moleküller baskılama ve segment (katman) moleküler baskılama stratejisi gibi) ve uyarıya duyarlı baskılama teknolojileridir (manyetik / sıcaklık duyarlı teknolojiler, ikili / çoklu uyarıya duyarlı teknolojiler gibi) [5].

2.4.1 Yeni nesil baskılama teknolojileri

Moleküler baskılamanın gelişmesiyle beraber; yüzey baskılama, nanobaskılama, yaşayan/kontrollü radikalik polimerizasyon, gözenekli polimer sentezi, click kimyası (huisgen tepkimesi) siklokatılma tepkimesi, mikroakışkan sentez ve katı-faz sentezi gibi çeşitli yeni teknolojiler ortaya çıkmıştır. Moleküler baskılama stratejileriyle bu yeni nesil teknolojilerin birleştirilmesi farklı uygulama alanları için yeni olanaklar sağlayacaktır [5].

2.4.1.1 Yüzey baskılama teknolojisi

Mosbach daha etkili tanıma sitelerine sahip baskılanmış malzelerin oluşturulması için kalıp molekülü yüzeye tutturarak ilk defa yüzey baskılama teknolojisini bildirmiştir. Böylece kalıp molekül baskılanmış malzemeden tamamen uzaklaştırılabildiği için özellikle boyutlarının büyüklüğünden dolayı geleneksel yöntemlerle hazırlanmış MIP'lerin baskılama bölgelerine bağlanması ve ayrılması oldukça zor olan protein, hücre ve virus gibi makromoleküllerin hedef molekülün kavitelere daha iyi ulaşımı sağlanır [39, 143-147].

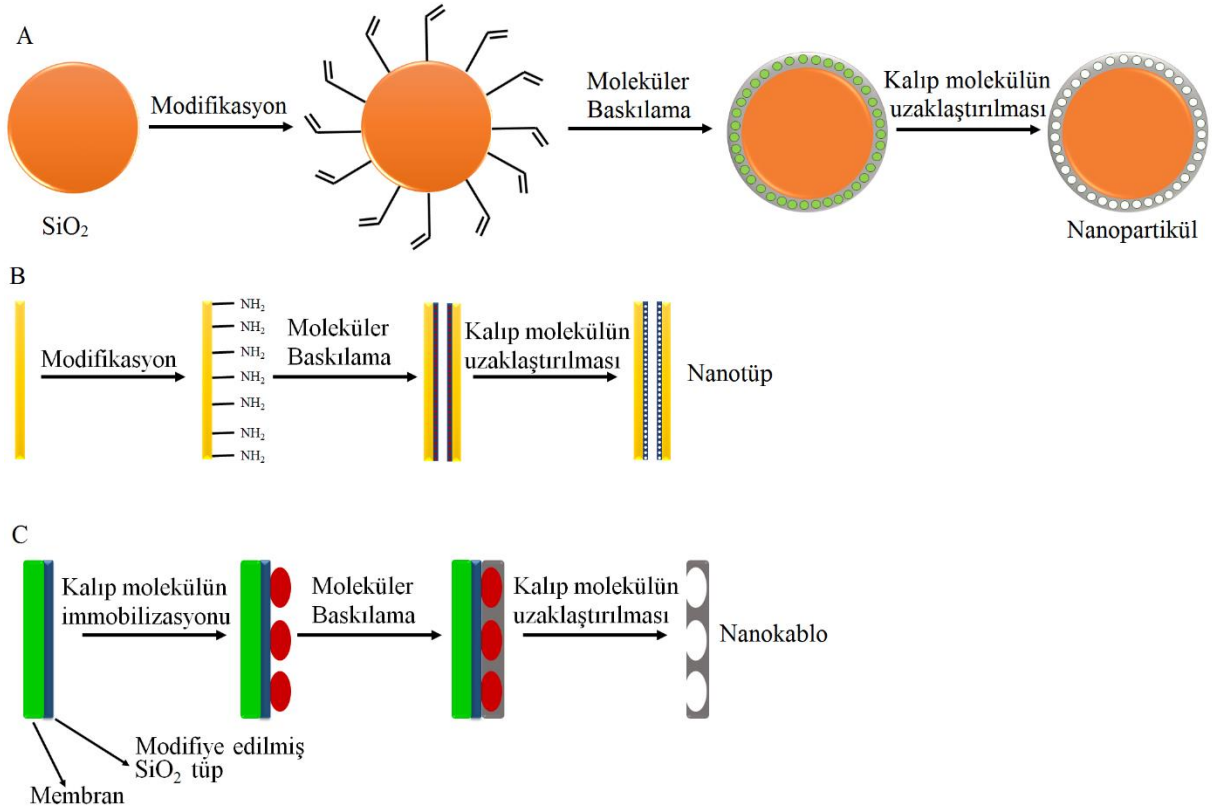
2.4.1.2 Nanobaskılama teknolojisi

Son yıllarda nanoteknolojiler ile moleküler baskılamada meydana gelen gelişmeler araştırmacılarda büyük bir araştırma merakı uyandırmıştır. Nanomalzeme yapısındaki MIP'lerin (N-MIP) yığın yapısındaki MIP'ler ile karşılaştırıldığında sahip olduğu gelişmiş karakteristik özellikleri bu merakın temelini oluşturmuştur (Çizelge 2.3) [5, 148].

Çizelge 2.3. Yığın yapısındaki ve nano yapıdaki MIP'lerin özelliklerinin karşılaştırılması

Yığın yapısındaki moleküler baskılanmış polimerler	Nanomalzeme yapısındaki moleküler baskılanmış polimerler
Yüzey alanı / hacim oranı düşüktür bu nedenler elüsyon zor gerçekleşir.	Yüksek yüzey alanı / hacim oranına ve polimerin ağırlık birimi başına daha büyük bir toplam aktif yüzey alanı sahiptir
Bağlanma bölgeleri afinite bakımından çeşitlilik gösterir ve spesifik olmayan bölgeler mevcuttur.	Tüm bağlanma bölgeleri benzer afiniteye sahiptir ve yüksek miktarda spesifik bağlama bölgesi içerir.
Malzemenin çözünürlüğü düşüktür, işlenmesi zordur, yığın şeklindedir, iki seri arasında değişiklikler mevcuttur.	Çözünürlüğü yüksek olduğundan çözültideki dağılımı iyidir ve hazırlanması daha kontrollü gerçekleşir.
Sert matrislerinden dolayı boş kavitelere ulaşım daha zordur.	Baskılanmış kavitelere kalıp molekülün ulaşımı daha kolaydır bu da bağlanma kinetiğini geliştirir ve kalıp molekülün uzaklaştırılmasını kolaylaştırır.
Kalıp molekül sızıntısı ile karşılaşılma ihtimali yüksektir ve in-vivo uygulamalarda kullanımı kısıtlıdır.	Az miktarda kalıp molekül kolaylıkla uzaklaştırılabilir ve biyolojik aktivite özellikleri in-vivo uygulamalarda kullanımını destekler.

Şekil 2.5'de de gösterildiği gibi nanomalzeme yapısında moleküler baskılanmış polimerler nanopartikül (A), nanotüpler(B) ve nanokablolar (C) gibi pek çok farklı formda hazırlanabilir [149, 150].



Şekil 2.5. Farklı formlardaki moleküler baskılanmış bazı nanoyapıların sentez yöntemlerinin şematik gösterimi [5].

Nanoteknolojinin moleküler baskılama teknolojisi ile birleştirilmesi, küçük moleküllerden protein ve makromoleküller gibi büyük moleküllere kadar geniş bir yelpazede analitin hassas ve seçici bir şekilde belirlenmesine olanak sağlamıştır. Baskılanmış nanoyapıların sahip olduğu geniş yüzey alanı ilgili analit için daha fazla bağlama bölgesi sunmakta ve böylece MIP malzemelerin uygulamalarda kullanımını arttırmaktadır [151-153]

2.4.1.3 Kontrollü/yaşayan radikalik polimerizasyon teknolojisi

Geleneksel radikalik polimerizasyon ile düzenli MIP'lerin hazırlanması, zincir büyümesi oranı kontrol edilemediğinden maalesef kolay değildir. Elde edilen polimerler, zincir transferini ve terminasyonunu içeren yan tepkimeler nedeniyle genellikle geniş bir boyut dağılımına sahiptir [154]. Bu problemin çözülmesi için kontrollü/yaşayan radikalik polimerizasyon (LCRP) tekniğine başvurulmuştur. Bu yöntemde polimer zincirinin büyümesi önemsiz derecede zincir terminasyonu ile termodinamik olarak kontrol

edilebilir ve böylece homojen ve dar bir polimer ağı dağılına sahip yapılar elde edilebilir. LCRP teknikleri içerisinde atom transfer radikalik polimerizasyon (ATRP) ve tersinir katılma-ayırışma zincir transfer polimerizasyonu (RAFT) en çok kullanılanlardır [155]. Geçiş metallerinin halojen atom transfer reaktifi olarak kullanıldığı ATRP yöntemiyle aktif radikaller ve faaliyet göstermeyen türler (alkil halojenürler) arasındaki dinamik denge hızlı bir şekilde kontrol edilebilir [156-158]. Ancak bu yöntemin, MIP filimlerin hazırlanması için kullanılamaması ve çok az monomer ile uygulatabiliyor olması gibi bazı dezavantajları vardır [159]. İlk defa Moad ve arkadaşları tarafından önerilen RAFT tekniği ise geleneksel serbest radikal polimerizasyon sistemine uygun bir zincir transfer ajanının (RAFT ajanı olarak da bilinen tiyokarboniltiyolo bileşikler) eklenmesiyle gerçekleşen basit bir yöntemdir. ATRP ile karşılaştırıldığında RAFT yönteminde kullanılacak monomer sayısı (neredeyse serbest radikalik polimerizasyona uygun tüm monomerler) oldukça fazladır. Dahası RAFT ajanları; çöktürme, emülsiyon ve süspansiyon gibi serbest radikalik polimerizasyonun tüm yöntemlerinde kullanılabilir [154, 160-162].

2.4.1.4 Oyuk (hollow) gözenekli polimer sentez teknolojisi

Fonksiyonlandırılmış oyuk gözenekli polimerlerin kullanımı kontrollü ilaç salınımı ve kirliliklerin uzaklaştırılması alanlarında büyük popülerlik kazanmıştır. Gözenekli polimerlerin kullanımının temel avantajı kontrol edilebilir gözenek yapısı sayesinde ilgili analitin kütle transferini arttırabilmesidir. Oyuk polimer mikrokürelerinin oluşturulması için kendinden yönelim, kalıp teknikleri, süspansiyon polimerizasyonu ve emülsiyon polimerizasyonu tekniği kullanılabilir. Oyuk gözenekli polimerlerin moleküler baskılama teknolojisiyle birleştirilerek kullanımı ilgili kalıp molekülünü yüksek bağlama kapasitesi ile bağlanmasını ve hızlı kinetik dengeyi sağlar [163-166].

2.4.1.5 Click kimyası (huisgen tepkimesi) siklokatılma tepkimesi

İlk defa 2001'de Sharpless ve arkadaşları tarafından kullanılan ılımlı tepkime sıcaklıklarında bile oldukça etkili bu teknik pek çok fonksiyonel monomerin ve çözücünün kullanımına olanak sağlayan kullanışlı ve gelecek vaat eden bir yöntemdir [167, 168]. Click kimyası içerisinde ilaç keşfinden malzeme bilimine kadar neredeyse kimyanın bütün alanlarında uygulanan bakır katalizli azid-alkin siklokatılma tepkimesi en çok tercih edilen yöntemdir [169]. Click kimyası ile polimer sentezi sırasında farklı

fonksiyonel zincirler kullanılarak elde edilen malzemeler kolayca modifiye edilir ve etkili biyokonjugasyonlar oluşturulabilir [170].

2.4.1.6 Mikroakışkan sentez teknolojisi

1990'da minyatür analiz sistemleri yada çip üzerinde laboratuvar olarak da adlandırılan mikro toplam analiz sistemi (μ TAS) çalışmalarının başlamasıyla mikro kanallarda sıvı akışı işlemi bilim ve teknoloji alanında büyük rağbet görmüş ve ilaç salınımından biyolojik analizlere / nanopartikül sentezine kadar pek çok çalışmada kullanılmıştır. Hem organik hem de inorganik malzemelerin sentezi için kullanılabilen mikroakışkan çipleriyle dar bir boyut dağılımı aralığına sahip etkinliği ve hassasiyeti yüksek nanopartikül sentezi de gerçekleştirilebilir [171-173]. Mikroakışkan sistemlerinin basitlik, tekrar üretilebilme, küçük miktarda örnek hacmiyle çalışmasından dolayı düşük maliyetli olması gibi önemli avantajları vardır. Bu avantajları sayesinde nanopartiküllerin hızlı ve optimize bir şekilde sentezlenmesi için mikroakışkan sistemler ideal bir platform oluşturmaktadır [174, 175]. Son zamanlarda mikroakışkan cihazlar polimerizasyon tepkimeleri için de kullanılmaktadır. Bu sistemler sayesinde son derece kontrollü boyut ve şekle sahip tek boyut dağılımlı moleküler baskılanmış polimerler hazırlanabilir [176].

2.4.1.7 Katı faz sentez teknolojisi

Bilindiği üzere MIP'lerin hazırlanması için kullanılan geleneksel yöntemler yoğun iş gücü gerektiren ve tek seferlik gruplar halinde sentezlenen işlemleri içerir ve bu nedenle endüstride kullanımı uygun değildir. Piletsky ve arkadaşları ilk kez katı faz sentez yöntemiyle MIP nanopartiküllerin sentezini bildirmiştir [177]. Geleneksel moleküler baskılamada kullanılan çözünebilir kalıp molekül katı faz sentez yönteminde katı bir destek malzemesinin kullanıldığı yüzeye immobilize edilerek kullanılır. Bu katı destek malzemesi içerisinde monomer/başlatıcı karışımı bulunan bir reaktöre yerleştirilir ve MIP nanopartiküller bu katı destek üzerinde sentezlenir. Bu yöntem sayesinde tüm bağlama bölgeleri aynı yönelime sahip olur ve partikül yüzeyinde bulunur. Bu özellikler partikülün bağlama bölgelerinin homojenitesini ve ulaşılabilirliğini artırır [178]. Dahası sentez ve afinite ile saflaştırma aşamaları bilgisayar kontrollü bir cihazla gerçekleştirilebileceğinden MIP'lerin endüstriyel kullanımına olanak sağlar [177].

2.4.2 Moleküler baskılama teknolojisindeki özel baskılama stratejileri

Moleküler baskılama teknolojilerinin geliştirilmesi aşamasında yeni nesil teknolojilerin yanı sıra çok kalıp molekül baskılama, çok fonksiyonel monomerle baskılama, taklit moleküller baskılama ve segment (katman) moleküler baskılama stratejisi gibi bazı özel baskılama stratejilerine de yer verilmiştir [5].

2.4.2.1 Çok kalıp molekül baskılama stratejisi

Genel itibarıyla moleküler baskılanmış polimerler hazırlanırken yalnızca bir tane molekül ya da iyon tercih edilir. Ancak tek bir molekülün kalıp molekül olarak kullanılması MIP'lerin tanıma amaçlı kullanımını kısıtladığı gibi tek seferde birden çok hedef molekülün uzaklaştırılmasını da imkânsız kılar [179]. Ancak farklı birkaç hedef molekülün kalıp olarak kullanıldığı çok kalıp molekül baskılama ile tek polimer içerisinde farklı tiplerde tanıma bölgeleri oluşturularak farklı türlerde moleküllerin uzaklaştırılması, ayrılması, tahlili, dedeksiyonu ve eş zamanlı analizi gerçekleştirilerek MIP'lerin kullanım alanı geniş ölçüde artırılabilir [180]. Tek durgun fazdaki birden çok bileşiğin eş zamanlı uzaklaştırılması örneğin farmasötik formülasyonlar analizinde kullanılabilir. Çoklu kalıp molekül kullanılarak hazırlanmış bir MIP bir dedektör ile birleştirilerek birden çok biyolojik veya çevresel sistemlerdeki olası kirleticilerin tespiti gerçekleştirilebilir. Ayrıca çok kalıp molekül MIP'ler ile çoklu hedef molekül tanınmasının ve uzaklaştırılmasının gerçekleştirilebilmesi MIT'lerindeki sürdürülebilir gelişme için oldukça önemlidir [180].

2.4.2.2 Çok fonksiyonel monomerli baskılama stratejileri

Son yıllarda kovalent olmayan baskılama yaklaşımı sıkça kullanılmaktadır ve bilindiği üzere kovalent olmayan baskılamada fonksiyonel monomer ile kalıp molekül arasındaki etkileşim artırılarak baskılama verimi artırılmaktadır. Bu nedenle kalıp molekül ile farklı bölgelerden etkileşebilecek iki veya daha fazla fonksiyonel monomerin kullanılması hem önemli hem de gereklidir [181]. Ayrıca iki veya daha fazla fonksiyonel monomerin kullanılması çeşitli analitlerin özellikle de makromoleküllerin kullanıldığı durumlarda seçiciliğin artırılmasına olanak sağlayacaktır. Ancak yöntem kolay değildir ve fonksiyonel monomerlerin seçilmesi esnasında cevaplanması gereken bazı sorular mevcuttur. Bu sorular: ticari olarak mevcut fonksiyonel monomerler nasıl seçilmeli ve uygun kombinasyon nasıl hazırlanmalıdır, yeni bir fonksiyonel sentezlenmesi

durumunda dikkat edilmesi gereken hususlar nelerdir ve ideal bir MIP'nin hazırlanması için fonksiyonel monomerlerin sinerjik etkileri nasıl etkili bir şekilde kullanılmalıdır şeklindedir [182-185].

2.4.2.3 Taklit kalıp molekül ile baskılama stratejisi

İlk çalışmalarda MIP'ler katı faz ekstraksiyon sistemlerinde başarılı bir şekilde kullanılmıştır ancak zamanla iz miktarda kalıp molekül sızıntısı yöntemin kesinliği ve doğruluğu konusunda şüphe uyandırmıştır [186]. Bu kalıp molekül sızıntısı riskini gidermek için ilk olarak 1997'de Andersson ve arkadaşları gerçek hedef molekülüne yerine yakın bir yapısal analogu kalıp molekül olarak kullanmıştır [187]. Daha sonra 2000 yılında Takeuchi ve arkadaşları taklit kalıp molekül kullanımını önermiş ve 2005 yılında Hosoya ve arkadaşları bu yöntemin kullanımını açıklamışlardır [188, 189]. Son zamanlarda kalıp molekül yerine yapısal bir analogunun kullanıldığı taklit kalıp molekül ile baskılama stratejisi sıkça uygulanmaktadır. Bu yöntemin sıkça tercih edilmesinin iki temel nedeni vardır bunlardan biri orijinal kalıp molekülün pahalı ya da tehlikeli olması durumu iken diğeri ise orijinal kalıp molekülün kolayca bozuluyor olması veya MIP için uygun olmayacak şekilde çözünürlüğünün çok düşük olması durumudur [190, 191].

2.4.2.4 Segment (Katman) baskılama stratejisi

Fragment baskılama olarak da adlandırılan segment (katman) baskılama kalıp molekülünün sadece bir kısmının MIP'lerin hazırlanması aşamasında yalancı-kalıp olarak kullanılması esasına dayanır. Elde edilen polimerler benzer seçicilikte tanıma bölgelerine sahiptir. Segment baskılama yüksek toksik etkiye sahip moleküllerin, pahalı bileşiklerin ve baskılamanın zor olduğu biyolojik makromoleküllerin baskılanmasına olanak sağladığından moleküler baskılamanın kullanım alanlarını geniş ölçüde arttırmaktadır. Dahası segment baskılama stratejisi ile kalıp molekül sızıntısının da önüne geçilebilir [192-194].

2.4.2.5 Kompozit baskılama malzeme stratejisi

Moleküler baskılamada çeşitli fonksiyonel malzemelerin kullanımı oldukça önemli bir sorun ve gelecek vaat eden bir fırsattır. Böylece elde edilen kompozit baskılanmış malzeme hem fonksiyonel malzemenin hem de MIP'nin avantajlarına sahip olur. Hâlihazırda SiO₂, polistiren (PS), titanyum dioksit (TiO₂), kitosan and Fe₃O₄ gibi nanomalzemeler çekirdek-kabuk yapısında MIP'lerin yüzey baskılama ile hazırlanması

aşamasında çekirdek olarak sıkça kullanılmaktadır. Altın nanopartiküller (Au NPs), gümüş nanopartiküller (Ag NPs), grafen ve kuantum noktalar (QDs) gibi nanopartiküllerin MIP matriksine dahil edilmesiyle elde edilen nanokompozit hem nanopartiküllerin spesifik fizikokimyasal özelliklerine hem de elektronik ve optik özelliklere sahip MIP'lerin tanıma seçiciliğine sahip olacak ve böylece saha uygulamalarında avantaj sağlayacaktır [195-199].

2.4.3 Uyarı duyarlı moleküler baskılama teknolojisi stratejileri

Doğal reseptörlerin karakterlerini taklit edebilecek akıllı malzemelerin hazırlanabilmesi için uyarı duyarlı moleküler baskılama teknolojisi kullanılarak uyarı duyarlı MIP'ler (SP-MIP) hazırlanmıştır. Uyarı duyarlı MIP'ler; manyetik duyarlı, sıcaklık duyarlı, pH duyarlı, ışık duyarlı ve ikili/çoklu uyarı duyarlı MIP'ler olarak sınıflandırılmaktadır. Bu beş ana sınıf dışında tuz iyonlarına karşı duyarlı yada biyomoleküllere duyarlı MIP'ler de alt sınıf olarak mevcuttur. Elde edilen bu akıllı malzemeler saflaştırmadan kemo/biyosensörlere, ilaç salınımindan biyoteknoloji ve biyokimyada hücre enkapsülasyonuna kadar pek çok alanda kullanılmaktadır [14].

2.4.3.1 Manyetik uyarı duyarlı moleküler baskılama teknolojisi

Fe_3O_4 nanopartiküllerin gibi manyetik parçacıkların MIP'lerle birleştirilmesi sonucu elde edilen ve dışarıdan bir manyetik alan uygulandığında doğrudan bir yönelim hareketi özelliği gösteren malzemelere manyetik uyarı duyarlı MIP'ler denilmektedir. Manyetik moleküler baskılanmış kompozit kürelerin hazırlanması ilk defa 1998'de Mosbach tarafından gerçekleştirilmiştir [200]. İlgili analitler MIP'ler yardımıyla kolayca adsorbe edilir ve yüksek manyetik duyarlılıkları sayesinde santrifüje ya da filtrasyona gerek duyulmadan dışardan uygulanan bir manyetik alanla; analit ortamdan kolay, hızlı ve daha etkili bir şekilde ayrılır. Son zamanlarda manyetik uyarı duyarlı MIP'lerin özellikle örnek hazırlanması, manyetik biyoayırma, ilaç salınımı ve enzim immobilizasyonu gibi alanlarda başarılı bir şekilde kullanımı oldukça dikkat çekmektedir [201-203].

2.4.3.2 Sıcaklık duyarlı moleküler baskılama teknolojisi

Bilindiği üzere moleküler baskılama teknolojilerinde elde edilen fazla çapraz bağlı sert yapıların hedef molekül için sahip olduğu tanıma bölgeleri oldukça sınırlıdır. Ancak daha az çapraz bağa sahip olan polimer jellerin tersinir şişme ve büzülme özellikleri

vardır ve çevre sıcaklığında meydana gelen değişikliğe göre şişebilen ve büzülebilen bu yapılara sıcaklık duyarlı polimerler denmektedir. Bu polimerler ilaç salınımı doku mühendisliği ve biyokimyada hücre enkapsülasyonu için kullanılmaktadır. Bu sıcaklık duyarlı tanıma işlemi doğal sistemlerde proteinlerin tanınması için kullanılan sistemle büyük benzerlikler gösterir. Bu nedenle protein baskılanmış polimer matrislerinin hazırlanmasında sıcaklık duyarlı biyo-uyumlu jellerin potansiyel bir uygulama alanı mevcuttur [204-210].

2.4.3.3 Işık duyarlı moleküler baskılama teknolojisi

Işık uzaktan uyarım yapan temiz enerji türüdür. Işık moleküler cihazlarda ve akıllı malzemelerde sıkça kullanıldığından oldukça önemlidir [211]. Işığa duyarlı MIP'lerin oluşturulması için polimerik ağda foto-reaktif kısımlara ihtiyaç vardır [212]. Bu foto-reaktif yapılar; foto-irradasyonu foto-tepkimler yardımıyla izomerizasyon ya da dimerizasyon gibi bir kimyasal sinyale dönüştürebilirler [212]. Fotoizomerleşme genellikle hızlı, tersinir ve tekrarlanabilir bir yöntemdir. Azobenzen ya da spiropiran gibi foto-reaktif kısımlar foto-izomerleşme sürecinde kullanılır. Fotoizomerleşme işlemleri geniş bir uygulama aralığında MIP'lerin fonksiyonlaştırılması için çeşitli şekillerde kullanılmaktadır. Ancak ticari olarak ışığa duyarlı fonksiyonel monomerlerin bulunması neredeyse imkânsızdır [213].

2.4.3.4 pH duyarlı moleküler baskılama teknolojisi

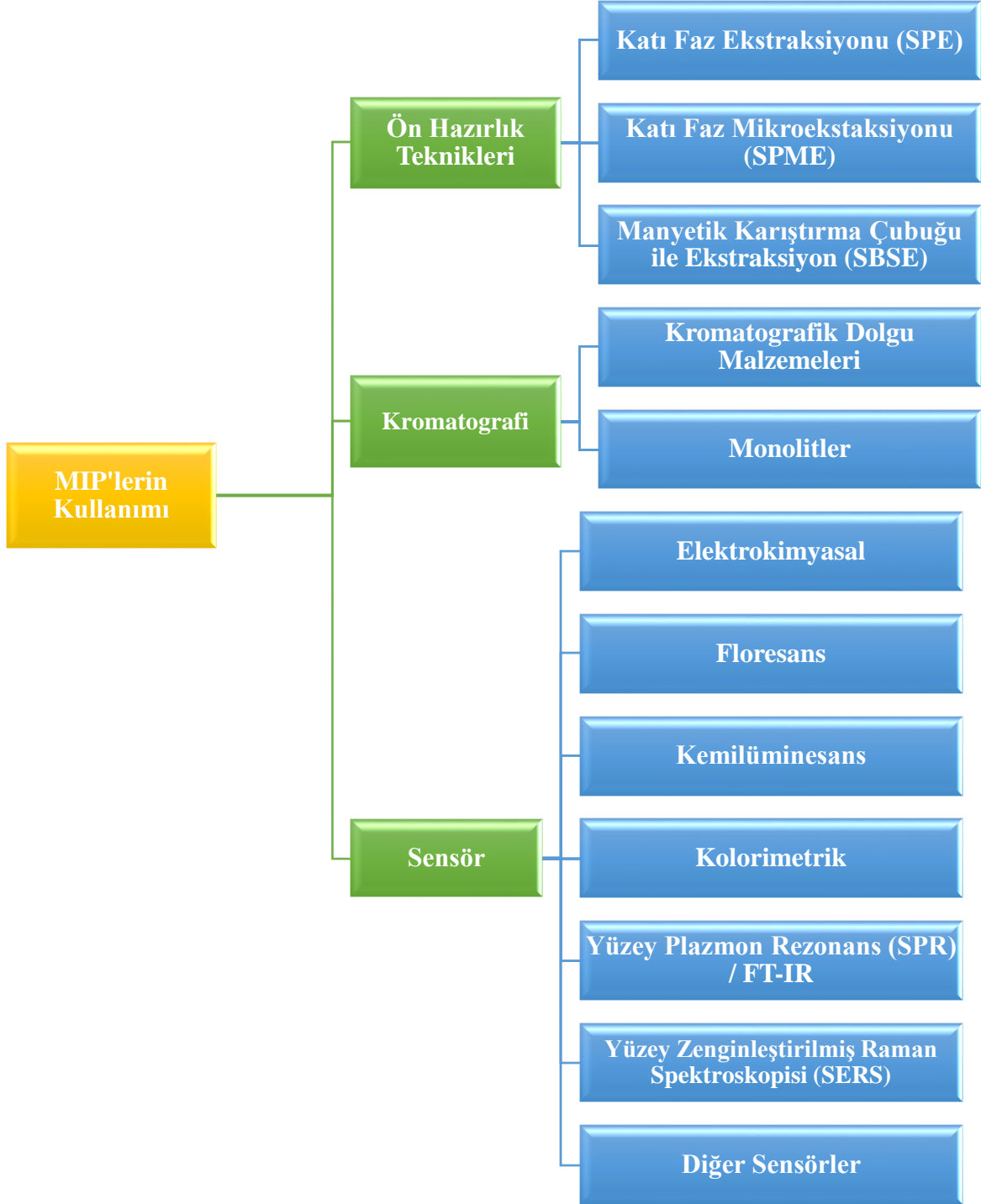
Karboksilik asit yada amino gibi bir fonksiyonel grup içeren polimerler pH değişikliklerine karşı hassastırlar ve pH duyarlı polimerler olarak adlandırılırlar. İyonlaşabilen gruplar içeren bu tip polimerik ağlar belli bir pH'da bir proton alabilir ya da verebilirler bu da polimer zincirinin hidrodinamik hacminde bir değişikliğe neden olur. Böylece polimer kompakt bir haldeyken değişen şartlarla şişmeye yada büzölmeye başlar ve hacimde faz geçişi değişikliği meydana gelir [214, 215].

2.4.3.5 İkili/çoklu uyarana duyarlı moleküler baskılama teknolojisi

Sentezlenmesi oldukça zor olmasına rağmen iki fazla daha fazla uyarana karşı duyarlı MIP'ler mevcuttur. Elde edilen bu MIP'ler özelliklerini tek açıdan değil de çok yönlü sergilediklerinden oldukça üstün özelliklere sahiptirler. İki uyarana duyarlı polimerler genellikle manyetik/sıcaklık, manyetik/ışık, sıcaklık/ışık, sıcaklık/pH ve sıcaklık/tuz iyonu gibi uyarana duyarlı yapıların birleştirilmesiyle elde edilir [216].

2.5 Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Kullanım Alanları

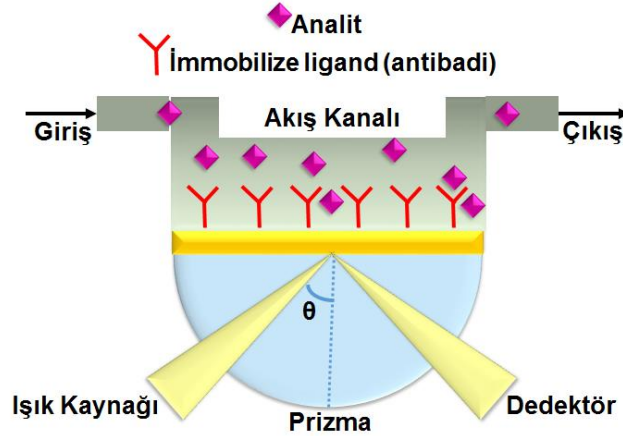
Daha önce bahsedildiği gibi moleküler baskılama teknolojisindeki çeşitli akıllı teknolojiler ve stratejiler, sürekli kullanılarak ve geleneksel polimerizasyon yöntemlerinin geliştirilmesiyle hızla ilerletilmiştir. Bu ilerleme moleküler baskılamanın hızla gelişmesine ve böylece çeşitli yeni üstün özellikli MIP'lerin hazırlanmasına olanak sağlamıştır. Sonuç olarak MIP'ler için daha heyecan verici ve evrensel uygulama alanları keşfedilmiştir. Örneğin çöktürme polimerizasyonunda yüzey baskılama teknolojisi oyuk (hollow) gözenekli polimer sentez teknolojisiyle birleştirilerek yüksek adsorpsiyon kapasiteli, etkili baskılama yapılabilen, iyi bir morfolojiye, tek boyut dağılımına ve ideal yüzey özelliklerine sahip MIP'ler hazırlanmıştır. Hazırlanan bu MIP'ler örnek hazırlamada veya kromatografide sorbent olarak ya da durgun fazda kullanım için uygundur. Kompozit baskılanmış malzemelerin sol jel yöntemiyle birleştirilmesiyle çok iyi arayüz karakterine sahip elektriksel ya da optik özellikleri olan kimyasal veya biyolojik sensör olarak kullanılabilen MIP'ler hazırlanmıştır. Bu gibi özelliklere sahip üstün özellikli MIP'ler pek çok alanda kullanılabilir (Şekil 2.6) [5].



Şekil 2.6. Ön hazırlık tekniklerinde, kromatografide ve sensör çalışmalarında MIP'lerin kullanımının yapısal diyagramı [5].

2.6 Yüzey Plazmon Rezonans

Optik biyosensörler 1980'li yılların sonlarına doğru ilk defa kullanılmaya başlanmış ve biyomedikal, farmasötik, diyagnostik endüstrisi gibi pek çok alanda yayınlanan makalelerde kullanım alanlarına o zamandan beri geniş yer verilmiştir [217]. Fluorosanssa yada absorbansa dayalı optik yöntemler çok daha önce zamanlardan beri kullanılmasına rağmen yüzey plasmon rezonans (SPR) yada Yüzey Geliştirilmiş Raman Spektroskopisi (SERS) gibi yüzey temelli yöntemler çok hızlı bir şekilde geliştirilmiş ve biyosensörlerde önemli bir rol oynamışlardır. SPR tekniği biyomoleküllerin etkileşimlerinin incelenmesinde; etiket gerektirmemesi, gerçek zamanlı ve son derece hassas olması gibi dikkate değer özellikleri sayesinde önemli bir analitik araç olarak kabul edilmektedir [218]. Herhangi bir elektromanyetik girişim olmadan geniş dinamik aralığında kullanılabilmesi ve yüksek hassasiyeti gibi mükemmel özellikleri sayesinde araştırma ve geliştirme alanlarında kullanımı yaygınlaşmıştır [219].



Şekil 2.7. SPR biyosensörün analiz prensibi [219].

Tam yansıma halinde (toplam iç yansıma, TIR) p-polarize ışık; elektriksel olarak iletken olan ve iki farklı kırılma indeksine sahip ortam (yani yüksek kırılma indeksli cam sensör yüzeyi ve düşük kırılma indeksli tampon gibi) arasında bulunan altın tabakasına çarptığında SPR olgusu meydana gelir. SPR ilk defa 1968'de; ince metalik tabakanın serbest elektronlarıyla absorbe edilen fotonların enerjilerinin, belirli bir açı ile gelen ışığın genliği azaltması şeklinde açıklanmıştır. SPR'nin biyosensör alanında tayin yöntemi olarak kullanılabilmesi ise ilk defa 1983'de dile getirilmiştir [220]. Ticari olarak

sıkça bulunan SPR cihazları, sensör yüzeyine yakın dalga boylarındaki (~ 200 - 300 nm) çeşitli kırılma indekslerinin optik metotlarla ölçülmesi esasına dayanır. Gümüş yüzeyler daha iyi bir SPR etkisi sağlamasına rağmen oldukça iyi bir inert metal film olan altın yüzey plazmon rezonans için tercih edilmektedir. Altın yüzey kendiliğinden yönelen uzun zincirli tiyol tabakası ile modifiye edilerek hidrojel (karboksillenmiş dekstranlar gibi) yüzeye tutturulabilir. Bu hidrojel, biyomoleküllerin kovalent immobilizasyonu için etkili bir substrat olmasının yanı sıra biyomoleküllerin etkileşimi için uygun bir ortam sağlar [221, 222]. SPR sensogramlarından genel itibariyle iki çeşit bilgi sağlanır. Bunlardan ilki kinetik hız sabitleri ve analit konsantrasyonu hakkında bilgi sağlayan etkileşim oranı (bağlanma ve ayrılma) ve diğeri ise nitel ya da yarı-kantitatif uygulamalar için kullanılacak afinite sabitleri verilerini veren bağlanma seviyesidir. Bununla birlikte SPR'nin biyosensör teknolojisinde doğrudan tayin amaçlı kullanımının en önemli avantajı biyomoleküler etkileşim kinetiklerinin; tepkime hızı ve denge sabitlerinden yararlanılarak belirlenebilmesidir [220, 223]. Kinetik sabitler araştırılan biyolojik sistemlerin dinamikleri hakkında önemli veriler sağlar ve böylece tedavi edici özelliğe sahip yeni moleküllerin tasarımı ve seçimi için kullanılabilir. Hiçbir etiket kullanılmadan ölçüm alınabilme avantajına sahip olan SPR biyosensörler farklı boyutlardaki (molekül ağırlığı 500 Dalton'un aşağısında kalan moleküller ve daha büyük moleküller) ve kompleks yapılarıdaki (tedavi edici özelliğe sahip proteinler, nükleotidler, virüsler ve peptidler gibi) pek çok (biyolojik) molekülün tayininde başarılı bir şekilde uygulanmıştır [224-228]. Aynı zamanda yöntem aşağıdaki veriler hakkında da kapsamlı bilgi sağlar;

- (a) İki (yada daha fazla) reaktan çiftinin bağlanma tipolojisinin tespiti
- (b) Gerçek zamanlı analizi sırasında meydana gelen etkileşim süreçleriyle ilgili afinite sabitlerinin belirlenmesi
- (c) Bağlanma ve sökülme hızlarının ölçülmesi
- (d) Birbiriyle etkileşim içerisinde olan tek bir molekülün ya da her iki molekülün derişimlerinin belirlenmesi.

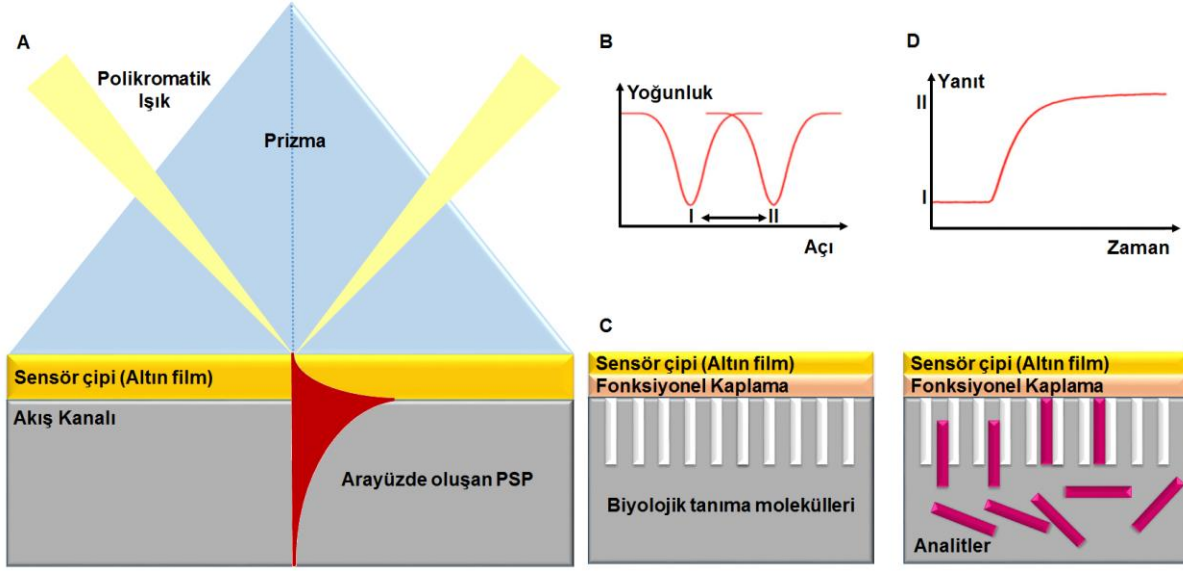
Biyomakro-moleküllerin karakterizasyonunda ya da miktarlarının belirlenmesinde kullanılan SPR biyosensör tekniğinin uygulanması için daha uygun immobilizasyon

stratejilerine ihtiyaç duyulmaktadır [229, 230]. Bu immobilizasyon stratejileri; immobilize edilmiş molekülün biyoaktif özelliklerini sergileyebilmesi için bulunduğu uygun mikroçevredeki spesifik olmayan bağlanmaları sınırlandırmalıdır. İmmobilizasyondaki sorunların bir kısmını çözmek için cam üzerindeki altın film tabakası 100-200 nm kalınlığında karboksimetile dekstran ile kaplanmıştır. Bu dekstran temelli sensör çiplerinin kapasitesi; dekstran karboksilasyon yüzdesi değiştirilerek değiştirilebilir. Önemli bir nokta ise bu dekstran tabakasının kalınlığının (100 nm) 200 nm'lik ölçüm alınamayan alan ile çok iyi bir uyum içinde olması ve böylece bu ticari olarak kullanılacak sensör çiplerinin büyük ölçekte üretimine olanak sağlamasıdır. Karboksimetilasyon prosedürü ile oluşan son derece esnek polimer tabakası spesifik olmayan adsorpsiyon sınırlandırılmasını sağlayan bir net negatif yüke oluşturur. Dahası, pratik uygulamaların çoğunda gerekli olan daha fazla analitin bağlanması için gerekli olan yoğun bir tabaka elde edilmesine olanak tanır. Proteinlerin yüzeye bağlanması için aynı prensiple farklı uzunluklarda aljinat tabakasından oluşan sensörler de geliştirilmiştir. Ayrıca spesifik olmayan adsorpsiyon sınırlamak için karboksi-fonksiyonlu polietilen glikol katmanları ile iki boyutlu sensör yüzeyleri geliştirilmiştir. Basit yağ keseciklerinin ya da daha önce yerleştirilmiş proteinlerin tayini için lipozomların kolayca tutulmasını sağlayacak lipofilik ankrajların bulunduğu ya da direk hidrofobik yüzeye tutunabilecek farklı sensörler mevcuttur [222, 231, 232]. Ayrıca moleküler baskılanmış polimer temelli SPR sensörler proteinlerin, çevresel kirleticilerin, ilaçların ve gıdaların izlenmesinde sıkça kullanılmaktadır [233-243].

2.6.1 Yüzey Plazmon Rezonans Genel Prensibi

Gelen ışığın bir fotonu bir metal yüzeye (genellikle bir altın yüzey) çarptığında yüzey plazmon rezonans oluşur. Belli bir açıda gelen ışık enerjisinin bir kısmı yüzeydeki uyarım nedeniyle hareket eden metal tabakasının elektronları ile kaplanır. Bu metal yüzeye paralel olarak yayılan bu elektron hareketi plazmon olarak adlandırılır. Bu plazmon salınımı; metal yüzey ile örnek çözelti arasındaki sınırdaki 300 nm civarında bir elektrik alanı oluşturur. Ticari olarak bulunan SPR biyosensörler yapılandırılırken, Kretschmann konfigürasyonundaki güçlü bir yansıtıcı özelliği olan cam prizma kullanılarak belli bir açıyla gelen ışığın toplam yansıması azaltılır (Şekil 2.8). Sabit bir dalga boyu (ışık kaynağından gelen) ve yüzeydeki ince metal tabakası varlığında

rezonansın gerçekleştiği SPR açısı metal yüzeyi yakınındaki malzemenin kırılma indeksine bağlıdır. Sonuç olarak tayin ortamında ufak bir değişiklik (biyomoleküllerin immobilizasyonundan kaynaklanan değişiklikler) yansıtma indeksini değiştireceğinden plazmada bir değişiklik oluşturur. Tayin detektöre yansıyan ışıktaki değişiklik ölçülerek gerçekleştirilir. Ayrıca yüzeydeki immobilizasyon konsantrasyonu, yansıyan ışığın yoğunluğunun veya rezonans açısındaki kaymaların izlemesiyle ölçülebilir. Geleneksel bir SPR biyosensörüyle 10 pg/mL dedeksiyon limitine ulaşılabilir [244, 245].



Şekil 2.8. SPR biyosensör tasarımı: (A) Kretschmann konfigürasyonu; (B) Yansıyan ışığın spektrumu; (C) SPR sensör yüzeyine bağlanma; (D) Moleküler etkileşimlerin neden olduğu kırılma indisindeki değişiklik [246].

SPR biyosensörlerinde prob molekülleri ilk olarak sensör yüzeyine immobilize edilir. Hedef molekülün bulunduğu çözelti sensör yüzeyiyle temas edecek şekilde sistemden geçirildiğinde, birbirlerine gösterdikleri afinite nedeniyle gerçekleşecek olan hedef molekül-probe etkileşimi sayesinde SPR sensör yüzeyinin kırılma indeksinde bir artışa neden olur. SPR deneylerinde sıyaldeki değişimi ifade etmek için rezonans yada yanıt birimi (RU) kullanılmaktadır ve 1 RU birimi 10^{-4} derecelik bir kritik açı kaymasına eşdeğerdir. Deneye başlarken probe ve hedef molekül etkileşim halinde olmadığından ilk RU değeri başlangıç kritik açısına karşılık gelir. Yüzeydeki katmanların kalınlığı olan h ile değişen kırılma indeksi Δn_d aşağıdaki formülle hesaplanabilir

$$\Delta n_d = \left(\frac{dn}{dc} \right)_{vol} \Delta \Gamma / h$$

$(dn/dc)_{vol}$ kırılma indeksindeki artışı, c analitin hacim konsantrasyonunu ve $\Delta \Gamma$ yüzeye bağlanan hedef molekülün konsantrasyonunu ifade etmek için kullanılır. Kırılma indeksindeki değişiklik, gelen ışığın yayılan yüzey plazmonuyla (PSP) altın yüzeyde birleşmesiyle gerçek zamanlı olarak belirlenebilir. Sonuç olarak kalıp molekülün yüzeye bağlanma hızı (k_{on}) ve tampon ile sürekli akış durumunda yüzeyden ayrılma hızı (k_{off}) hesaplanabileceği gibi bağlanma hız sabiti (k_a) ve ayrılma hız sabiti de (k_d) SPR bağlanma kinetikleri incelenerek belirlenebilir. Sensor yüzeyine immobilize edilmiş bilinen bir proba bağlanan ilgili molekülün izlenmesi ve miktarının belirlenmesi için kırılma indeksiyle ilgili parametreler kullanılabilir. SPR deneylerinde tayin limiti (LOD); molekül ağırlığı, optik özellikler, hedef molekül-prob arasındaki bağlanma afinitesi ve prob molekülün sensör yüzeyini kaplama derecesi gibi belirli faktörlere bağlıdır [246-248].

Biyosensör uygulamalarında geleneksel SPR ölçümleri metal yüzeyindeki organik filmin kalınlığında ya da kırılma indisinde meydana gelen değişikliği izlemek için kullanılır [249]. Belirli bir dalga boyundaki p-polarize ışık demeti prizmadan geçerek belirli bir açıyla yüzeye çarptığında SPR olgusu meydana gelir. Belirli koşullarda, metal/dielektrik ara yüzeyinde foton-plazmon yüzeyi elektromanyetik dalgaları (yüzey plazmon polaritonları) oluşur. Bu dalgalar metal dielektrik ara yüzüne paralel yayılır ve ilişkili optik elektrik alanı yüzeyde 200 nm'lik tipik bir doğrusal azalma meydana getirir [250]. Bu belirlenen açıda yansıyan ışığın yoğunluğunun azalmasıyla sonuçlanır. Belirli bir açıda gelen ışığın yansıması (θ) p-polarizasyonu ile ilişkili üç kademeli Fresnel denklemi kullanılarak hesaplanır. Bu üç kademe sensör sistemindeki; cam prizma (γ), metal tabaka (μ) ve sensör tabakası olan üç ortamı (j) ifade etmektedir. Gelen ışığın yansıması (R) aşağıdaki formüle göre belirlenebilir [251]:

$$R = \left| \frac{r_{\gamma\mu} + r_{\mu\rho} e^{2ik_{\mu}d}}{1 + r_{\gamma\mu} r_{\mu\rho} e^{2ik_{\mu}d}} \right|^2 \quad (1.1)$$

$$k_j = \sqrt{\varepsilon_j \frac{\omega^2}{c^2} - k_z^2} \quad \text{ve} \quad k_z = \sqrt{\varepsilon_{\gamma}} \frac{\omega}{c} \sin \theta \quad (1.2)$$

Prizma-metal ve metal-sensör tabakası arayüzleri için yansıma genliği ise aşağıdaki denklemle belirlenmektedir:

$$r_{\gamma\mu} = \frac{k_{\gamma}\varepsilon_{\mu} - k_{\mu}\varepsilon_{\gamma}}{k_{\gamma}\varepsilon_{\mu} + k_{\mu}\varepsilon_{\gamma}} \text{ ve } r_{\mu\rho} = \frac{k_{\mu}\varepsilon_{\rho} - k_{\rho}\varepsilon_{\mu}}{k_{\mu}\varepsilon_{\rho} + k_{\rho}\varepsilon_{\mu}} \quad (2)$$

ε_j ve k_j sırasıyla dielektrik sabitini ve ilgili ortamın j (prizma, metal ya da sensör tabakası) arayüzüne dik olarak gelen dalga vektörü bileşenidir. Denklemde k_z arayüze paralel gelen dalga vektör bileşenini, ω ışığın açısal frekansını ($\omega(\lambda) = 2\pi c/\lambda$), d metalik filmin kalınlığını ve c ise ışık hızını ifade etmektedir. Yukarıda belirtilen 1.1, 1.2 ve 2 numaralı denklemlere göre, yansıma sensör tabakasının dielektrik sabitinin ($\varepsilon\rho$) bir fonksiyonu olarak değişir [251]. Dielektrik sabiti ($\varepsilon\rho$) yüzey tabakasındaki ligand derişiminin hacminin ve yansıma indeksinin karesinin bir fonksiyonudur. Geleneksel SPR biyosensörlerde geniş dağılımlı bir geliş açısı olan monokromatik ışık kullanılır ve yansıyan ışık farklı noktalarda (yansıma açısına bağlı olarak) detektöre ulaşır [252, 253]. Dedektör düşen ışık yoğunluğu konumunu sürekli olarak kaydeder ve yansıyan ışığın SPR açısını hesaplar. Bu tayin sisteminin hassasiyetini artırır. Belirli bir dalga boyunda yansıyan ışığın SPR açısında meydana gelen değişiklik (θ) yüzeydeki yansıma indeksinin değişikliğine (n), katman kalığında meydana gelen değişikliğe (d), c_1 ve c_2 sabitleriyle ilişkilidir [254-257].

$$\Delta\theta(\lambda) = c_1\Delta n + c_2\Delta d \quad (3)$$

Herhangi bir proteinin konformasyonel değişikliği yada ligandın bağlanması gibi protein kalınlığındaki herhangi bir değişiklik (Δd) ile Lorentz-Lorenz denklemi kullanılarak yansıma indeksindeki değişiklik belirlenebilir [254].

$$\Delta n = -\frac{1}{6n} (n^2 + 2)^2 \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} - \frac{n_w^2 - 1}{n_w^2 + 2} \frac{V_p}{V} \right) \frac{\Delta d}{d} \quad (4)$$

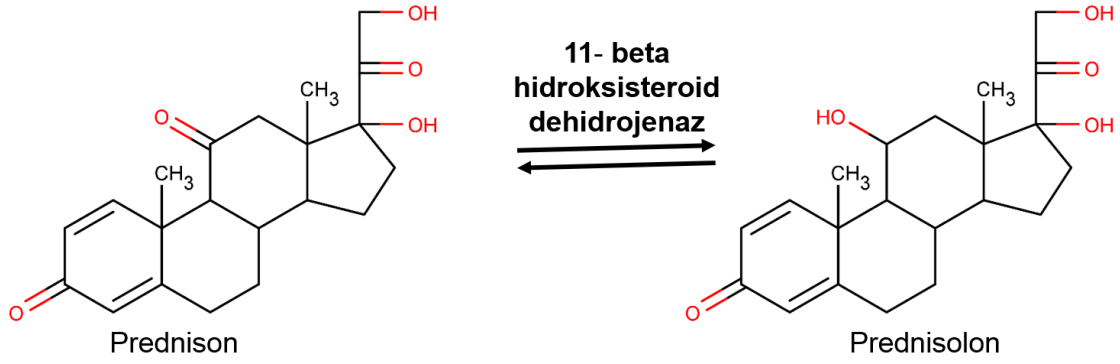
Bu denklemde n proteinin yansıma indeksini, n_w suyun yansıma indeksini, V_p proteinin hacmini ve V protein tabakasının hacmini belirtmektedir ($V = V_p + V_w$). SPR açısındaki en ufak değişiklik rezonans birimi (RU) olarak ifade edilir. 103 RU'luk bir yanıt açısındaki 0.1 derecelik bir değişikliği gösterir ve pek çok proteinin sensör tabakasına yaklaşık 1 ng/mm²'lik bağlanmasıyla bu değişikliğe meydana gelir [253]. Teorik olarak açısındaki değişiklik kompleks Fresnel denklemi kullanılarak hesaplanabilir. SPR cihazları ile

gerçek zamanlı olarak hem kalınlıktaki hem de yansıma indeksindeki değişik izlenebilir. Bu değişiklikler altın sensör tabakasında meydana gelen biyomoleküler etkileşimlerin sonucudur. Geleneksel SPR cihazlarında biyomoleküler etkileşimler ince metalik altın bir tabaka (genellikle 50 nm kalınlığında) ile kaplanmış bir cam plakadan oluşan bir sensör çipi üzerinde gerçekleşir. Altın yüzey üzerine immobilize edilerek proteinlerle çalışılabilir. Gerçek zamanlı ölçümler sırasında, tampon çözeltisinin sensör çip üzerinden akışı gerçekleşir ve böylece protein katmanında meydana gelecek desorpsiyonun önüne geçilebilir. Sonuç olarak proteinin fiziksel adsorpsiyonu için oldukça iyi bir alternatiftir. Sülfidril gruplarına sahip proteinler tiyol bağları vasıtasıyla altın çip yüzeyinde doğrudan absorblanabilir [258, 259]. Alternatif olarak altın yüzeyler karboksil grupları ihtiva eden alkan tiyolatlar ile modifiye edilerek ligandlar kovalent olarak da yüzeye bağlanabilir [260, 261]. Ancak, en klasik yaklaşım altın yüzeyine 100 nm kalınlığında karboksimetile dekstranla bir bağlanma tabakasının oluşturulmasıdır. Daha sonra ilgili ligandlar dekstran ile modifiye edilmiş çip üzerine streptavidin–biyotin köprüleri vasıtasıyla kovalent olarak bağlanabilir [262-266].

2.7 Prednisolon

Kortikosteroidler endojenik ve egzojenik olarak iki türde de mevcuttur. Kortizol gibi endojenik kortikosteroidler bağışıklık sistemi, büyüme ve stres tepkisinin oluşturulması gibi fizyolojik süreçlerde oldukça önemli bir rol oynar. Ekzojenik kortikosteroidler ise sistemik (örneğin prednisolon), inhale (örneğin siklesonid) ve topical (hidrokortizon) olmak üzere üç farklı türdedir. Bu ekzojenik kortikosteroidler anti-enflamatuvar ve bağışıklık baskılayıcı etkisinden dolayı astım, romatizmal arterit, sistemik lupus, egzema ve Crohn hastalığı gibi hastalıkların tedavisinde sıkça kullanılmaktadır [267].

İlk defa 1955’de kortizolun mikrobiyolojik oksidasyonu ile sentezlenmiş olan prednisolon glukoneogenez ve antienflamatuvar etkiye sahip bir kortikosteroiddir [268, 269]. Prednisol inaktif bir ilaç olan prednisolon’un karaciğerde enzimatik parçalanması sonucu oluşur (Şekil 2.9). Adrenokortikol aktiviteye sahip bu iki steroid kortizon ve kortizol’dan 3-4 kat daha aktiftir [270, 271].



Şekil 2.9. Prednisolonun enzimatik parçalanması [272].

Prednisolon (11b, 17a, 21-tri-hidroksi-pregna-1,4-dien-3,20- dion); astım, romatizmal arterit, ülseratif kolit ve Crohn hastalığı, çoklu sikleroz, küme baş ağrısı ve sistemik lupus eritematoz gibi geniş yelpazede oto immün ve inflamatuvar hastalıkların tedavisinde sıkça kullanılan sentetik bir adrenal kortikosteroiddir [273-278]. Gözleri etkileyen alerjik tepkilerin, kaşınma, kızarıklık ve şişmelerin azalması için de prednisolon tedavisine başvurulmaktadır [279-282]. İmmün baskılama etkisinden dolayı prednisolon organ nakli sırasında ve sonrasında organ reddi riskinin azaltılması için kullanılmaktadır. Prednisolon ayrıca kan kanserinin tedavisinde ve böbreküstü bezlerinin yeterince kortikosteroid üretmediği durumlarda hormon takviyesi olarak ta kullanılmaktadır [283-285]. Kısa süreli kullanımlarda prednisolon az ya da hafif yan etkileri olsa da genellikle tolere edilebilmektedir. Ancak uzun süre ve yüksek dozlarda kullanılması durumunda; ödem, kilo alma, yüksek kan basıncı, kas güçsüzlüğü, yüzde şişkinlik ya da kılınma, katarakt, peptik ülser, diyabetin kötüleşmesi, çocuklarda büyüme geriliği ve kasılma gibi ciddi yan etkileri bulunmaktadır [286]. Ayrıca prednisolon bir glukokortikosteroid olması nedeniyle WADA anti doping kuralları çerçevesinde sporcular tarafından kullanılması yasaklanmıştır [287, 288]. Bir numunede glukokortikosteroidler 30 ng/mL'den yüksek derişimde olması durumunda yasadışı olarak kullanıldığı varsayılmaktadır [288]. Bu nedenle, prednisolon konsantrasyonunun belirlenmesi rutin klinik ve farmatolojik analizler için olduğu kadar atletlerin doping kontrolü ve kalite kontrolü çalışmaları içinde büyük önem taşımaktadır. Prednisolonun plazmadaki yarılanma ömrü 3-4 saattir [289]. Yapısal değişikliğe uğramamış prednisolon kayda değer bir oranda idrarla atılır [290]. Prednisolon

miktarının tayini için literatürde tanımlanmış analitik yöntemler mevcuttur. Kullanılan ilacın miktarının tayini için gaz kromatografi [291], radyoimünoanaliz [292], yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) [293], spektrofotometri [294] ve çeşitli detektörler bağlanmış kapiler ayırma [295] gibi yöntemler tercih edilmiştir. Ancak plazmadaki ve idrardaki prednisolon konsantrasyonu tayini için sadece az sayıda HPLC çalışması yapılmıştır. Bu teknikler uzun tayin sürelerini ve karmaşık yöntemleri içermektedir. Bu nedenle prednisolonun tayini için kısa tayin süresi olan, basit, seçici ve ucuz tayin yöntemleri geliştirilmelidir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1 Malzemeler

3.1.2 Kullanılan Kimyasallar

Tez çalışması kapsamında kullanılan prednisolon (PRD), 1-Vinilimidazol (VIM), etilen glikol dimetakrilat (EDMA), 2-hidroksietil metakrilat (HEMA), sodyum dodesil sülfat (SDS), poli(vinil alkol) (PVA, M_n :9,000-10,000), sodyum bikarbonat, amonyum persülfat (APS), sodyum dihidrojen fosfat, sodyum hidrojen fosfat ve sodyum bisülfat Sigma Chemical Ltd. (St Louis, ABD)'den alınmıştır. Çalışmada kullanılan diğer tüm kimyasallar analitik saflıkta olup Merck, Fluka, Riedel-de Haën ve Sigma Chemical Ltd'den temin edilmiştir. Tez kapsamında kullanılan kimyasallar aksi belirtilmedikçe temin edildiği şekliyle kullanılmış ve herhangi bir ön işleme tabi tutulmamışlardır. Tüm sulu çözeltiler Barnstead D3804 NANOpure® cihazı ile saflaştırılan deiyonize su (>18.2 MW cm^{-1}) kullanılarak hazırlanmıştır. Prednisolon'un stok çözeltisi metanol (MeOH) ile hazırlanmış ve 4 °C'de alüminyum folyoya sarılı cam bir örnek kabı içerisinde muhafaza edilmiştir.

3.1.3 Kullanılan laboratuvar ekipmanları

Tez çalışması kapsamında; homojenizasyon için T10 (Ika Labortechnik, Almanya) homojenizatör, polimerlerin hazırlanması için Radleys (Carousel 6, Essex, İngiltere) polimerizasyon reaktörü santrifüj işlemleri için Beckman Coulter Allegra 64R (Beckman Coulter, Kaliforniya, ABD) kullanılmıştır. Karakterizasyon çalışmaları için Nano Zetasizer (NanoS, Malvern Instruments, Londra, İngiltere), Taramalı-Geçirimli Elektron Mikroskopu (S-TEM) FEI Tecnai F20 S/TEM (Hillsboro, OR, ABD), zayıflatılmış toplam yansıma - fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR-ATR) (Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS10, Waltham, MA, ABD), elipsometre (EP3-Nulling, Göttingen, Almanya), temas açısı ölçümleri (Kruss DSA100, Hamburg, Almanya) cihazları kullanılmıştır. Analizler için çözeltiler peristaltik pompa kullanılarak SPR-Incubation (NANODEV, Ankara, Türkiye) yüzey plazmon rezonans sistemiyle etkileştirilmiş ve SPRview yazılımı kullanılarak kinetik veriler alınmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Nanopartiküllerin Hazırlanması

Moleküler baskılanmış nanopartiküllerin hazırlanması için iki fazlı mini emülsiyon polimerizasyonu yöntemi kullanılmıştır. İki sulu faz ve bir organik fazdan oluşan prosedür kısaca şöyle özetlenebilir. Birinci sulu fazın hazırlanması için 0.935 g PVA, 144.5 mg SDS ve 117 mg NaHCO₃ sulu çözeltisi hazırlanmıştır (25 mL). İkinci sulu faz için ise 500 mg PVA ve 500 mg SDS'in 500 mL'lik sulu çözeltisi hazırlanmıştır. Organik faz için ise kullanılan fonksiyonel monomer olan VIM, çapraz bağlayıcı monomer olan EDMA, yardımcı monomer (komonomer) olan HEMA ve kalıp molekül olan PRD aşağıdaki çizelgede gösterildiği gibi üç farklı oranda hazırlanarak prednisolon baskılanmış nanopartiküller (PIN) elde edilmiştir. Ayrıca baskılanmamış nanopartiküllerin (NIN) hazırlanması için PRD kullanılmadan hazırlanan polimerizasyon prosedürü kullanılmıştır. Moleküler baskılanmış nanopartiküllerin ve baskılanmamış nanopartikülün hazırlanması için birinci fazdan her bir prosedür için 5 mL alınmış ve organik fazla karıştırılmıştır. Karışım, buz banyosunda 15 dakika homojenize edilmiştir. Süre bitiminde tepkimeler karışımı vakit kaybetmeden 100 mL ikinci fazla cam polimerizasyon reaktöründe karıştırılmıştır. Elde edilen polimerizasyon karışımı 45 °C'de 600 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. Polimerizasyon karışımının sıcaklığı 45 °C'ye ulaştığında başlatıcı olarak önce 63 mg APS daha sonra 56.5 mg NaHSO₃ eklenmiştir. Hazırlanan karışım 600 rpm'de 24 saat süre ile 40 °C'de polimerizasyona bırakılmıştır.

Çizelge 3.1. Mini-emülsiyon polimerizasyonunda kullanılan organik fazlar.

Polimer Kodu	Fonksiyonel Monomer (VIM, µL)	Komonomer (HEMA, µL)	Kalıp Molekül (PRD, mg)	Çapraz-Bağlayıcı Monomer (EDMA, mL)	PRD : VIM Mol oranı
NIN	271.7	100	0	1.05	0 : 20
PIN1	271.7	100	54.1	1.05	1 : 20
PIN2	271.7	100	108.2	1.05	2 : 20
PIN3	271.7	100	216.3	1.05	4 : 20

Polimerizasyon tamamlandıktan sonra, polimerizasyon ortamındaki mikropartiküllerin ve tepkimeye girmemiş yapıların uzaklaştırılması için çözelti 5000 rpm'de 45 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra üst çözelti 25000 rpm'de 4 °C'de 2.5 saat çöktürülmüş ve daha sonra çözelti 3 kere etanol : su (1:1) karışımı ile yıkandıktan sonra yüzey aktif madde olan SDS'in uzaklaştırılması için köpürme kalmayınca kadar deiyonize su ile yıkanmıştır. Her bir yıkama basamağından sonra partiküller 25000 rpm'de çöktürülmüş ve sıcaklığı 8 °C'de tutulan sonikatörde yıkama çözeltisi içinde dağıtılmıştır. Elde edilen nanopartiküller son olarak deiyonize suda dağıtılmış ve etrafı alüminyum folya ile sarılı cam numune kabında +4 °C'de saklanmıştır.

3.2.2 Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Elde edilen nanopartiküllerin karakterizasyonu için boyut analizi (Zeta-sizer ve STEM) ve yapısal analizi (FTIR-ATR ve Elementel analiz) gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.1 Boyut Analizi

Elde edilen nanopartiküllerin boyut analizleri ilk olarak Nano Zetasizer ile gerçekleştirilmiştir. Zeta-sizer ile partiküllerin üç özelliği belirlenebilir. Bunlar; partikül boyutu, zeta potansiyeli ve moleküler ağırlığı'dır. Partikül boyutunun ölçülmesi için zeta-sizer'da Dinamik Işık Saçılması (DLS) enstrümanından faydalanır. Bu yöntem; önceden ölçülmüş benzer özelliklerdeki partiküllerin, hızlarının çapları ile orantılı olduğu ve benzer hızda difüzenmesi esasına dayanır. Zeta-sizer boyut analizinin temelinde ilk olarak partiküllerin Brownian hareketlerinin DLS ile ölçülmesi ve daha sonra varolan teoriler yardımıyla bu harekete denk gelen partikül boyutunun belirlenmesi esas alınmıştır. Brownian hareketleri, sıvı içerisindeki bir partikülün onu çevreleyen moleküllerle çarpışması sonucu doğan rastgele hareketler olarak tanımlanır. Sıvı içerisindeki partikül rastgele hareket eder ve partikülün hızı boyutunun belirlenmesi için kullanılır. Bilindiği üzere sıvı fazda küçük partiküller büyük olanlardan daha hızlı difüzenir ya da hareket eder. Kısa bir süre aralığında örneğin hem başlangıç hem de sonuç resimleri karşılaştırıldığında ne kadar partikülün hangi hızla hareket ettiği ölçülerek boyut analizi gerçekleştirilebilir. Eğer iki resim arasındaki partikül hareketi düşük bir düzeydeyse partikül boyutu büyük, eğer hareket yüksek düzeydeyse partikül boyutu küçük olduğu düşünülebilir. Bu bilgiden yola çıkarak difüzyon hızı ile boyut arasındaki ilişki belirlenebilir. Partikül boyutu analizleri için elde edilen polimer çözeltisi

500 kat seyreltilmiş ve homojen bir karışım elde etmek için 5 dakika sonike edilmiştir. Sonikatörün sıcaklığı sürekli kontrol edilerek 25 °C'nin üstüne çıkarılmamasına dikkat edilmiştir. 25 °C'de 90°'lik ışık saçılmasıyla gerçekleştirilen ölçümlerde cihaza dispersant olan deiyonize suyun kırılma indisi değerleri ve yoğunluğu (sırasıyla, 1.33 ve 0.88 mPa.s) girilerek üç analizin ortalaması alınmıştır.

3.2.2.2 Taramalı-Geçirgenlik Elektron Mikroskobu (STEM) Analizi

STEM; alan emisyon tabancası, tek probdan oluşan bir mercek ve elektron tayin sistemi içerir. Elektron enerji kaybı spektroskopisi ve saçılmamış elektronların (lun), elastik özellikteki saçılmış elektronların (lel) ve elastik özellikte olmayan saçılmış elektronların (lin) akımları arasındaki farkı ayırmak için sisteme entegre edilmiş olan elektron spektrometrisi elektron tayin sisteminin temelini oluşturur. Oldukça küçük bir sistemden oluşan bu yapıya kolaylıkla çok yüksek vakum haznesi de dahil edilebilir. Bu sistemle 0.2-0.5 nm çaplı elektron probu oluşturulabilir. STEM cihazlarının avantajlarından biri çeşitli sinyalleri toplayarak ve analog/dijital işlemeyle farklılıkları veya oranları sergileyerek kontrastın arttırılabilmesidir. Özellikle ince tabaka üzerindeki tek bir atom, bu yöntemle parlak ya da karanlık modları kullanılarak yüksek kontrastla görüntülenebilir. Bu çalışma kapsamında STEM görüntülerinin alınması için 200 mesh'lik delikli karbon film kaplı bakır ızgaralar (gridler) kullanılmıştır. Karbon film yaklaşık 35 nm kalınlığındadır ve karbon filimler çok kırılğan olduğundan 200 mesh'den daha düşük delik boyutuna uygun değildirler. Optimun oranda seyreltilen polimer çözeltisi grid üzerine damlatılmış ve vakum ortamında kurutulmuştur. Daha sonra grid mikroskop yuvasına yerleştirilmiş ve optimun açısız büyütme ile görüntülenmiştir.

3.2.2.3 Zayıflatılmış Toplam Yansıma - Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR-ATR) Analizi

Hazırlanan nanopartiküllerin yapısal analizleri için FTIR-ATR ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Zayıflatılmış toplam yansıma (ATR) son zamanlarda en çok kullanılan FTIR örnekleme aracıdır. ATR'de kantitatif ve kalitatif analizler gerçekleştirilirken örnek hazırlanırken ön bir muameleye ihtiyaç duyulmadığından analiz büyük ölçüde hızlanır. ATR'nin en temel yararı örnek içine nüfus eden kızılötesi (IR) ışınların derinliğindedir. ATR örnekleme ile nispeten daha yüksek kırılma indisi bir kristal içine IR ışını doğrudan gönderilir. IR ışını kristal iç yüzeyinden yansır ve ATR

kristal ile yakın temas içinde numune üzerine dikey olarak uzanan genliği azalan bir dalga oluşturur. Genliği azalan dalga enerjisinin bir kısmı örnek tarafından emilir ve yansıyan radyasyon (bazıları numune tarafından absorplanır) dedektör geri gider. Polimer çözeltilisinin FTIR-ATR spektrumlarının eldesi için hücre üzerindeki kristale örnek direk damlatılıp $450-4000\text{ cm}^{-1}$ dalga boyu aralığında taranmıştır.

3.2.2.4 Elementel Analizi

Organik bir örnekteki elementel bileşenlerin karakterizasyonu için en önemli araştırmalardan biri karbon, hidrojen ve azotun elementel analizinin gerçekleştirilmesidir. Pek çok organik örnek bu üç atom dışında sadece oksijen içermektedir. Bu tez kapsamında da elde edilen partiküllerin yapılarının aydınlatılması için alüminyum örnek haznesine 10 mg kurutulmuş polimer çözeltilisi yerleştirilmiş ve aşırı oksijen varlığında yakma işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonrasında açığa çıkan karbon dioksit, su ve nitrik oksit miktarından yararlanılarak örneğin yapısal analizi gerçekleştirilmiştir.

3.2.3 Nanopartiküllerin Yüzey Plazmon Rezonans Sensör Yüzeyine Tutturulması

Tez kapsamında SPR ölçümleri altın çipler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda ilk olarak altın SPR ipleri üzerindeki organik kalıntıların temizlenmesi için asidik pirana çözeltilisi ile temizlenmiştir. Bu işlem için 8 mL $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$ (3:1, v/v) çözeltilisi hazırlanmış ve çipler 1 mL asidik pirana çözeltilisiyle 30 saniye muamele edilmiştir. Süre bitiminde etanolü takiben deiyonize su ile yıkanmıştır. Bu yıkama işlemi 8 kere tekrarlanmıştır. Altın yüzey su tutmayacak şekilde organik kalıntılardan uzaklaştırıldıktan sonra çipler vakum ortamında (200 mmHg, 40°C) 2 saat süreyle kurutulmuştur. Çiplerin yüzeyine nanopartiküllerin tutturulması için ilk olarak 37°C 'de vakum etüvünde 6 saat kurutulmuştur. Ancak işlem tamamlandıktan sonra ip yüzeyin deiyonize suyla yıkanırken partiküller yüzeyden ayrılmıştır. Bu nedenle UV ışık altında kurutulması işlemi tercih edilmiştir. Bu yöntemle yüzeye tutturulacak olan nanopartiküller 1:100 (v/v) oranında seyreltilerek yüzeydeki yığılmanın önüne geçilmiştir. Nanopartiküllerin bulunduğu çözeltiliden 10 μL ip yüzeyine damlatılmış ve UV ışık altında 20 dakika süreyle kurutulmuştur. Daha sonra ip yüzeyi iki kez etanol ile üç kez deiyonize suyla yıkanarak yüzeye tutunmayan partiküller uzaklaştırılmıştır.

Son olarak nanopartikül immobilize edilmiş çipler vakum ortamında (200 mmHg, 40°C) 3 saat süreyle kurutularak analize hazır hale getirilmiştir.

3.2.4 Yüzey Plazmon Rezonans Sensörün Karakterizasyonu

Elde edilen nanosensörün karakterizasyon işlemleri kapsamında elipsometre ölçümlerine ve temas açısı ölçümlerine yer verilmiştir.

3.2.4.1 Elipsometre Analizi

Yüzeyin dielektrik özelliklerini inceleyen optik bir yöntem olan elipsometre yansıma veya iletim polarizasyon değişikliği ölçümlerine dayanmaktadır. Işığın polarizasyonundaki değişikliğe göre elipsometre ile yüzeydeki katmanların kalınlığı hakkında bilgi verir. Bu işlem için hazırlanmış olan SPR çipi cihazın altına yerleştirilmiş ve 658 nm'de 62 °'lik bir açıyla ölçüm gerçekleştirilmiştir. Ölçümler gerçekleştirilirken altın tabakasının kalınlığı 50 nm olarak belirlenmiş ve 5 farklı alandan alınan ölçümler baz alınmıştır.

3.2.4.2 Temas Açısı Analizi

Temas açısı, θ , bir sıvı ile bir katı ıslanmasının kantitatif ölçüsüdür ve böylece yüzeyin hidrofilitesi hakkında bilgi verir. Yüzey tamamen ıslandığında temas açısı 0°'dir. Açı 0° ve 90° arasındaysa yüzey ıslanabilir özelliktedir. Ancak açı 90°'nin üzerindeyse ıslanabilme özelliğine sahip değildir. Çok yüksek hidrofobik özellikteki yüzeyler teorik limit olan 180°'ye yaklaşır ve buna lotus etkisi denir. Hazırlanmış olan nanosensörün yüzey hidrofilitesi durağan damla (sessile drop) profili uygulanarak statik temas açısı ölçüm yöntemiyle belirlenmiştir.

3.2.5 Yüzey Plazmon Rezonans Sistemi ile Kinetik Analizler

Prednisolon baskılanmış nanopartiküller SPR çip yüzeyine tutturulduktan sonra yıkanmış kurutulmuş ve SPR panelinde prizma ile akış kanalı arasına yerleştirilmiştir. Akış başlatılmadan SPRview programı açılmış ve kalibrasyon sabiti (altın SPR çipi için bu prosedürde tanımlanmış birim 310 au'dur) belirlendikten sonra analize başlanmıştır. Daha sonra 20 µL/dakika akış hızıyla önce denge tamponu sisteme uygulanmıştır. Metabolize olmamış prednisolon tayini için idrar ve kan plazması analiz edilmektedir. İdrarı pH ortalama değeri 6.6 iken metabolizmada plazmanın pH'ında 7.35 ile 7.45 (ortalama 7.4) arasında tutmaya çalışır. Bu nedenle tez çalışması kapsamında bu iki

farklı pH ile çalışılmıştır. Denge tamponu olarak prednisolonun hazırlandığı çözelti içinde prednisolon olmadan 5 dakika sisteme uygulanmıştır. Denge durumu gözlemlendiğinde farklı oranlarda prednisolon içeren çözeltiler aynı akış hızıyla sisteme tatbik edilmiştir ve 10 dakika boyunca sinyal dengesi takip edilmiştir. Süre bitimde sensör yüzeyi 1M NaCl desorpsiyon çözeltisi ile yaklaşık 8 dakika muamele edilmiştir. Daha sonra denge tamponu tekrar tatbik edilerek yüzeye bağlanmış prednisolonun tamamının uzaklaştırıldığı belirlenmiştir. Son olarak yüzeyin kuruması için SPR hücresinin üst haznesi değiştirilmiştir. Bir sonraki analizde ilk analizde kullanılan veriler temel alınmıştır. Kinetik veriler Origin programı kullanılarak grafiğe geçirilmiştir.

3.2.6 Yüzey Plazmon Rezonans Sisteminin Seçiciliğinin Belirlenmesi

Elde edilen SPR nanosensörün seçiciliğinin belirlenebilmesi için kalıp moleküle yapısal olarak benzeyen Estradiol (EST) ve 17- α Etinil Estradiol (EEST) kullanılmıştır. İlgili kimyasalların her iki tamponla da (10 mM pH 7.4 fosfat tamponu ve 10 mM pH 6.6 fosfat tamponu) 0.25 ppm'lik çözeltileri hazırlanmıştır. Prednisolon ve yarışmacı kimyasallar sisteme aynı koşullarda tatbik edilmiştir. Kinetik analizler için uygulanan koşullar baz alınmıştır. Elde edilen veriler Origin yazılımı ile analiz edilmiştir. Seçicilik katsayısının belirlenmesi için kalıp molekül olarak kullanılan Prednisolon'un % kırılmada meydana getirdiği değişiklik diğer yarışmacı ajanların meydana getirdiği değişikliğe oranlanmıştır. Baskılama seçiciliği ise MIP nanopartiküllerin seçicilik katsayıları NIP partiküllerin seçicilik katsayılarına oranlanmıştır.

3.2.7 Yüzey Plazmon Rezonans Sisteminin Tekrar Kullanılabilirliğinin Belirlenmesi

Sistemin tekrar kullanılabilirliğinin belirlenmesi için aynı derişimde (0.5 ppm) Prednisolon çalışılan akış hızında (20 μ L/dakika) sisteme beş kez gönderilmiştir. Her ölçümden sonra % kırılma indisindeki değişikliğe göre bağıl standart sapma değeri hesaplanmıştır.

3.2.8 Yüzey Plazmon Rezonans Sisteminin Doğal Kaynaklarla Kinetik Analizi

Hazırlanmış olan nanosensörün doğal kaynaklarla denenmesi için öncelikle yapay idrar örneği hazırlanmıştır. Bunun için 1 litre pH 6 fosfat tamponu hazırlanmış daha sonra sırasıyla 14 g üre, 1.7 g amonyum fosfat, 700 mg kreatinin, 700 mg glisin, 700 mg alanin, 700 mg oksalik asit, 350 mg sığır serum albümini, 350 mg glukoz ve 250 mg

sodyum klorür eklenmiştir [296]. Sensör sisteminde bu yapay idrar çözeltisi öncelikle dengeleme çözeltisi olarak kullanılmıştır. Daha sonra farklı miktarlarda prednisolon bu yapay idrar çözeltisine eklenmiş ve sisteme tatbik edilmiştir.

Diğer bir doğal kaynak olan plazmada prednisolon tayini için sensör sistemi denenmiştir. Yapay plazma örneği ticari olarak satın alınmıştır. Yapay plazma sıvısı dengeleme çözeltisi olarak sisteme gönderilmiştir. Daha sonra farklı miktarlarda prednisolon eklenmiş olan yapay plazma çözeltisinin kırılma indisini ne kadar değiştirdiğini belirlemek için sisteme tatbik edilmiştir.

3.2.9 Yüzey Plazmon Rezonans Sisteminin Validasyonu

Yüzey plazmon sisteminin validasyonu, yüksek performanslı sıvı kromatografisiyle (HPLC) British Pharmacopoeia'da belirtilen yöntem baz alınarak gerçekleştirilmiştir [297]. Bu yöntemde belirtildiği üzere çalışma kapsamında C-18 (oktadesil silika) kolonlar kullanılmıştır. Hareketli faz olarak 220 mL tetrahidrofuran deiyonize suyla 1000 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır. 4.6×25 cm'lik C-18 kolonu, 1 mL/dk akış hızında 20 dakika boyunca hareketli fazın geçirilmesiyle dengelenmiştir. Standart çözeltisinin hazırlanması için farklı miktarlarda prednisolon hareketli faz yardımıyla çözülmüş ve sisteme 20 µL enjekte edilmiştir. Analize prednisolonun pikinin çıkışının 4.5 katı kadar süre devam edilmiştir. UV dedektör kullanılan analizde ölçümler 254 nm'de kaydedilmiştir. Daha sonra prednisolon miktarı bilinen üç örnek hem kromatografik olarak hem de hazırlanmış olan nanosensör ile tayin edilerek validasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Baskılanmış ve Baskılanmamış Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

4.1.1. Boyut Analizi

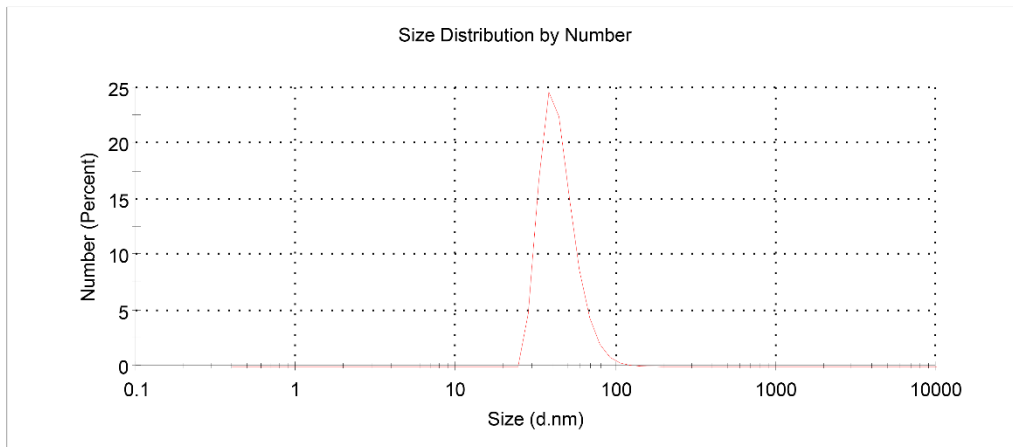
Nanopartiküllerin boyut analizleri ve boyut dağılımları zeta boyut analizörü (Malvern, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.1'de sentezlenen nanopartiküllerin zeta boyut analizleri verilmiştir. Boyut analizleri incelendiğinde partikül boyutları şekilden de görüldüğü gibi 41.6-47.6 nm aralığında boyut dağılımları (polidispersite indeksi, PDI) ise 0.190-0.234 aralığında değişmektedir. Zeta analiz sonuçları incelendiğinde PDI değerlerinin küçük olması nanopartiküllerin boyut dağılımlarının dar olduğunu yani eş boyutlu nanopartiküllerin sentezlendiğini göstermektedir. Sentezlenen PIN1, PIN2, PIN3 ve NIN kodlu nanopartiküllerin boyutları sırası ile 44.65 nm, 47.56 nm, 46.49 nm ve 41.62 nm ve PDI değerleri ise 0.234, 0.224, 0.197 ve 0.190 olarak zeta boyut analiz ölçümlerinden elde edilmiştir.

A

Results

	Size (d.n...	% Number:	St Dev (d....
Z-Average (d.nm): 78,17	Peak 1: 44,65	100,0	12,83
Pdl: 0,234	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,950	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality Good



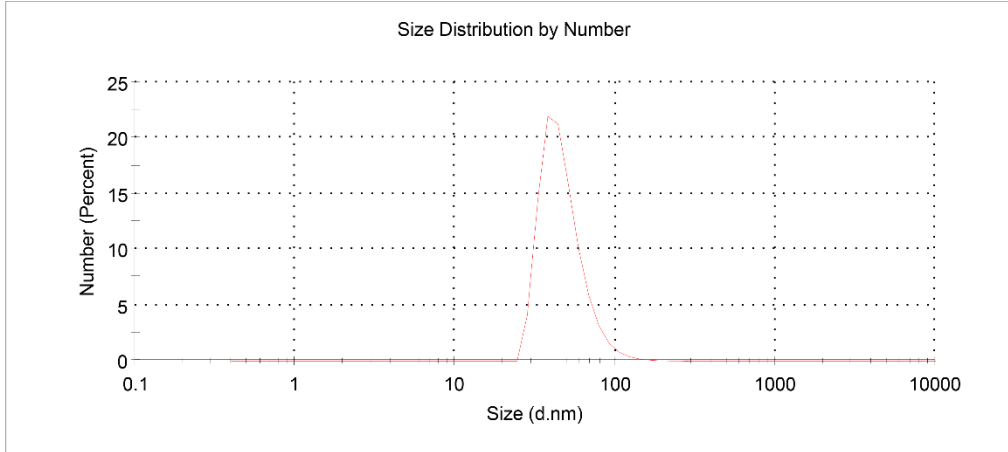
Şekil 4.1. Nanopartiküllerin zeta boyut analizleri; PIN1(A), PIN2(B), PIN3(C) ve NIN(D).

B

Results

	Size (d.n...	% Number:	St Dev (d....
Z-Average (d.nm): 105,6	Peak 1: 47,56	100,0	17,11
Pdl: 0,224	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,908	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality Good

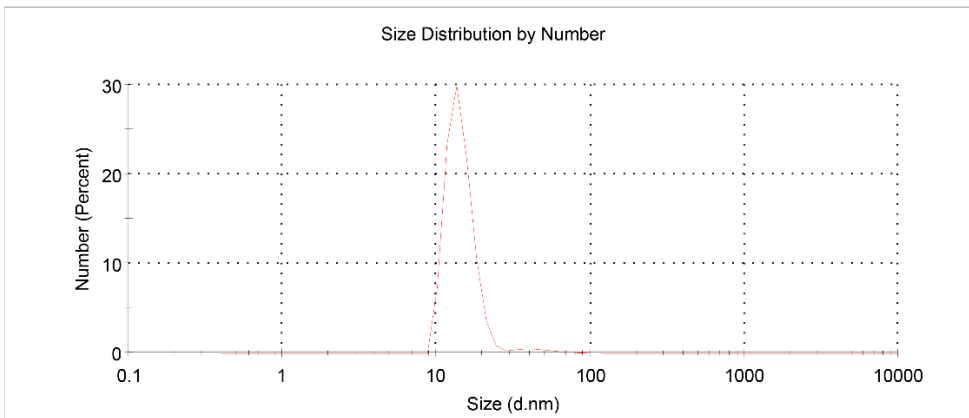


C

Results

	Size (d.n...	% Number:	St Dev (d....
Z-Average (d.nm): 104,5	Peak 1: 46,49	2,7	18,31
Pdl: 0,197	Peak 2: 14,24	97,3	2,896
Intercept: 0,917	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality Good



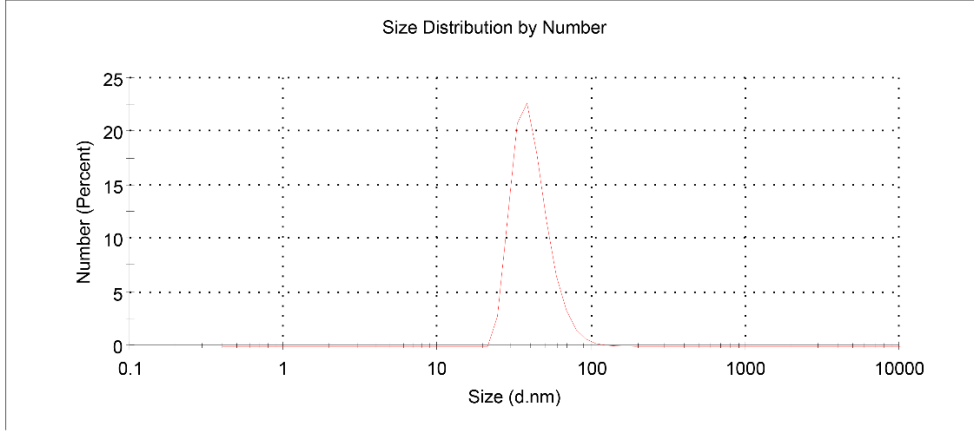
Şekil 4.1. Nanopartiküllerin zeta boyut analizleri; PIN1(A), PIN2(B), PIN3(C) ve NIN(D) (Devamı).

D

Results

	Size (d.n...	% Number:	St Dev (d...
Z-Average (d.nm): 74,58	Peak 1: 41,62	100,0	12,98
Pdl: 0,190	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,945	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality Good

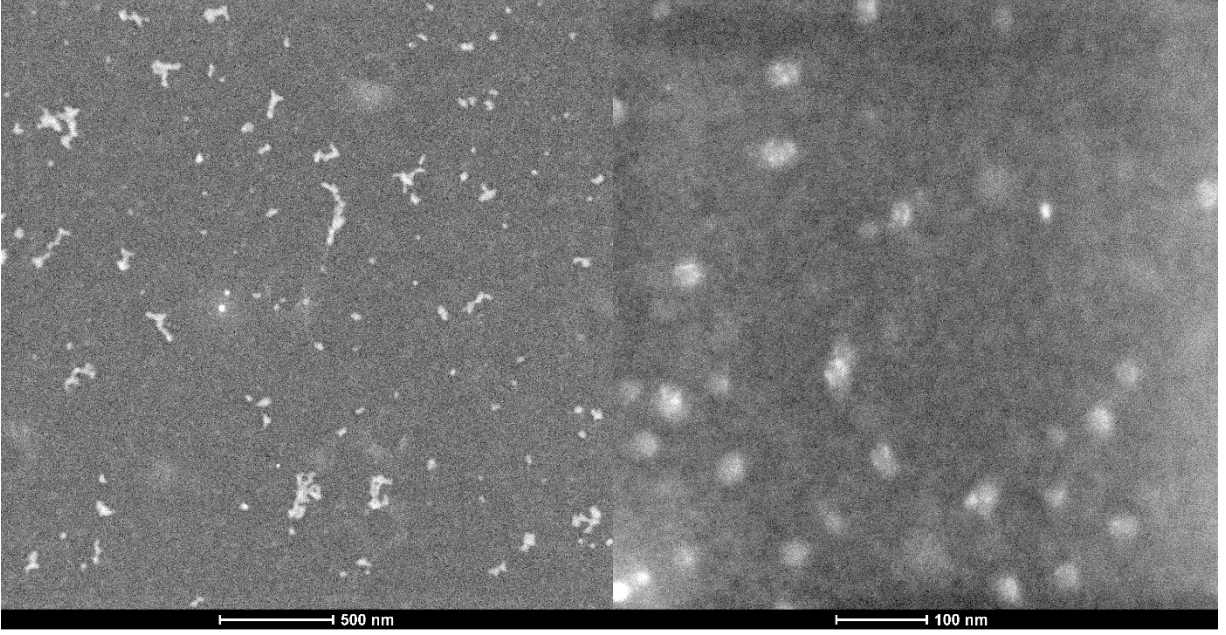


Şekil 4.1. Nanopartiküllerin zeta boyut analizleri; PIN1(A), PIN2(B), PIN3(C) ve NIN(D) (Devamı).

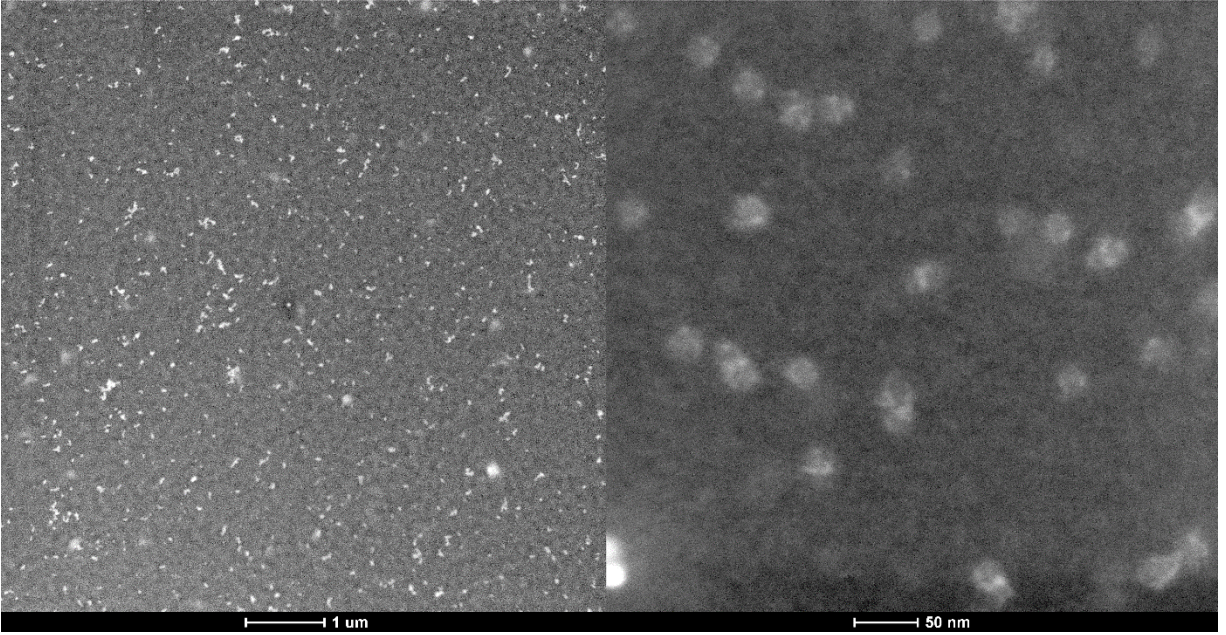
4.1.2. Taramalı-Geçirgenlik Elektron Mikroskobu (STEM) ve Geçirgenlik Elektron Mikroskobu (TEM) Analizi

Nanopartiküllerin yüzey morfolojisinin ve şekillerinin belirlenmesi STEM cihazı kullanılarak TEM ve STEM analizleri gerçekleştirilmiştir. Nanopartiküllerin farklı büyütme oranlarında alınan STEM görüntüleri Şekil 4.2 'de ve TEM görüntüleride Şekil 4.3'de verilmiştir. Nanopartiküllerin küresel formda ve yaklaşık 45 nm boyutlarında olduğu şekillerden anlaşılmaktadır. Nanopartiküllerin elektrostatik etkileşimler sonucu bir araya gelmesiyle nanopartiküller agrege olduğu şekilde görülmektedir. STEM ve TEM görüntülerinden elde edilen sonuçlar zeta boyut analiz sonuçlarıyla uyumludur. Bu sonuçlar küresel formda ve dar boyut dağılımında yaklaşık 45 nm boyutunda nanopartiküllerin başarılı bir şekilde sentezinin gerçekleştiğini göstermektedir.

A

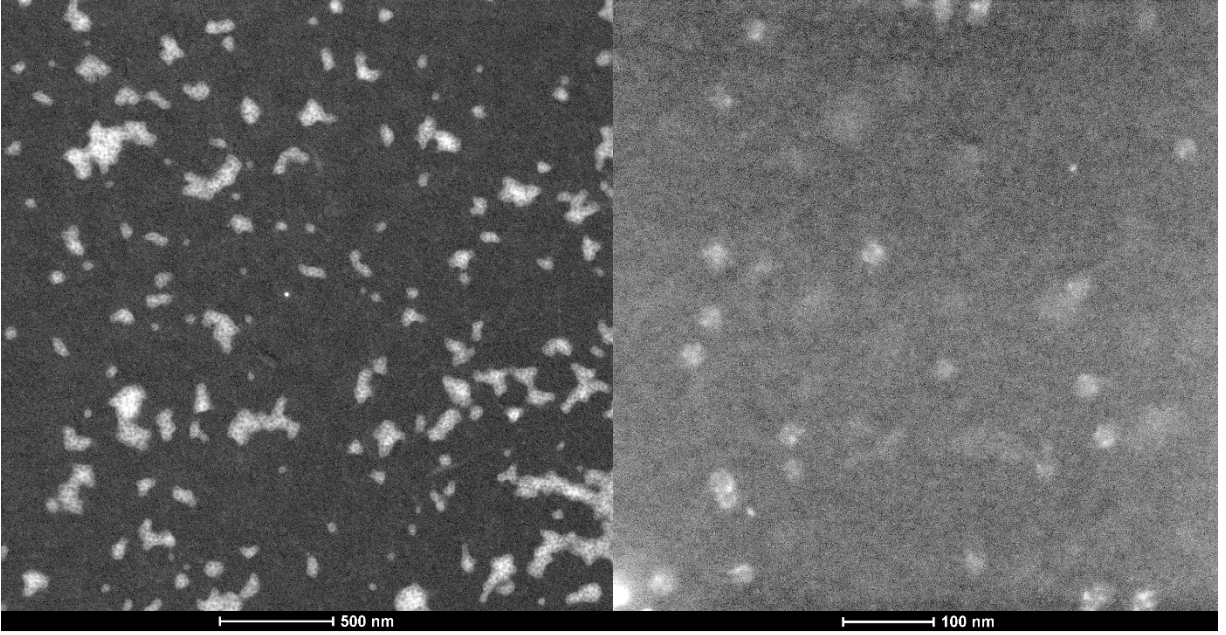


B

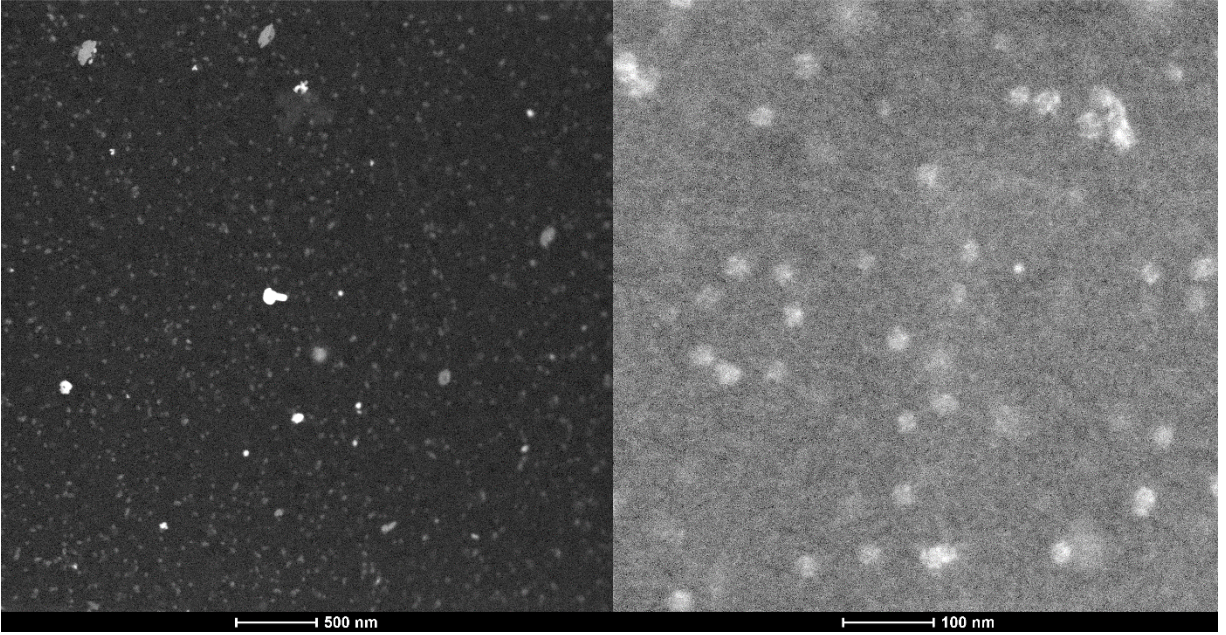


Şekil 4.2. PIN1 (A), PIN2 (B), PIN3 (C) ve NIN (D) nanopartiküllerinin STEM görüntüleri.

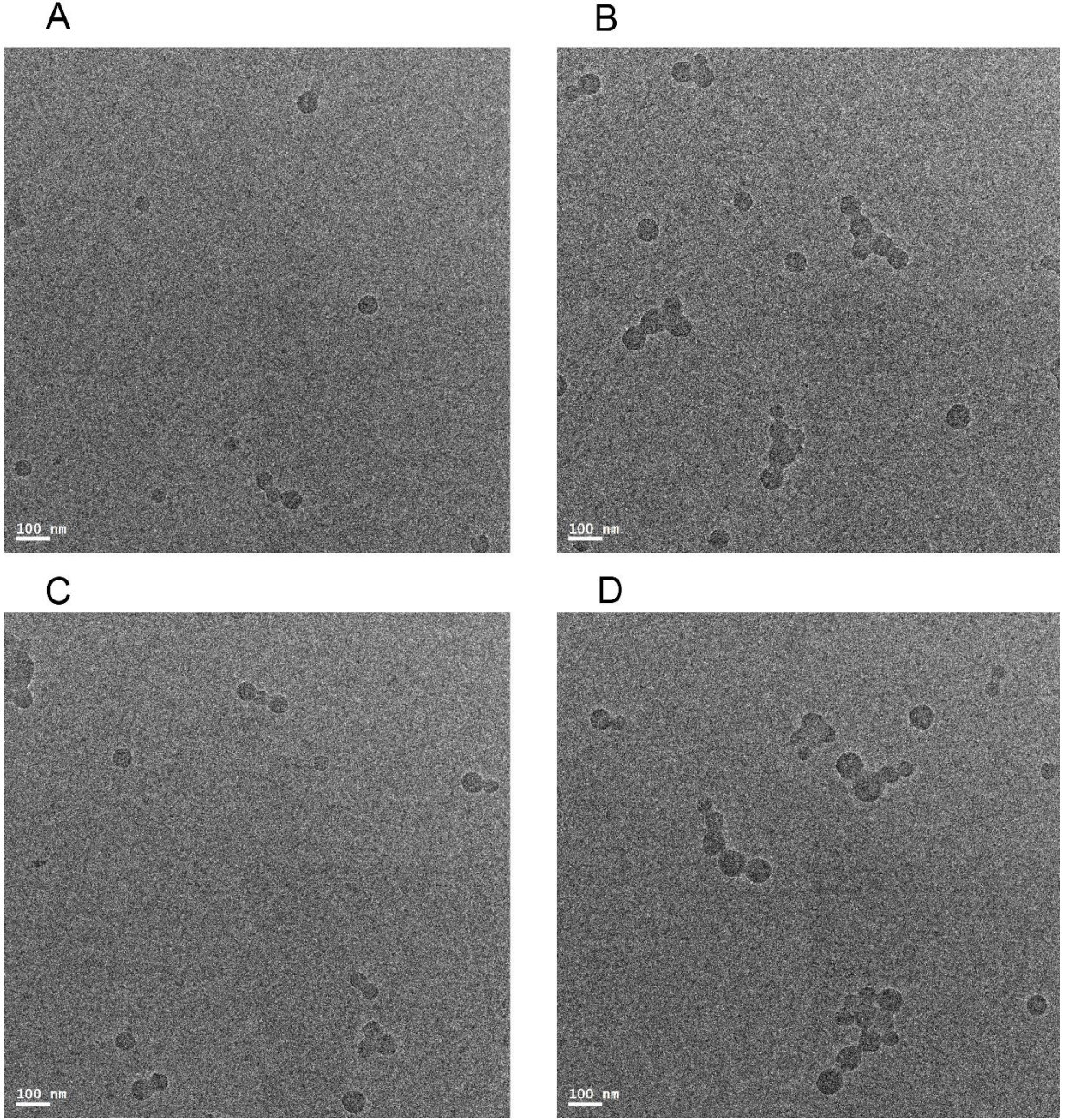
C



D



Şekil 4.2. PIN1 (A), PIN2 (B), PIN3 (C) ve NIN (D) nanopartiküllerinin STEM görüntüleri (Devamı).

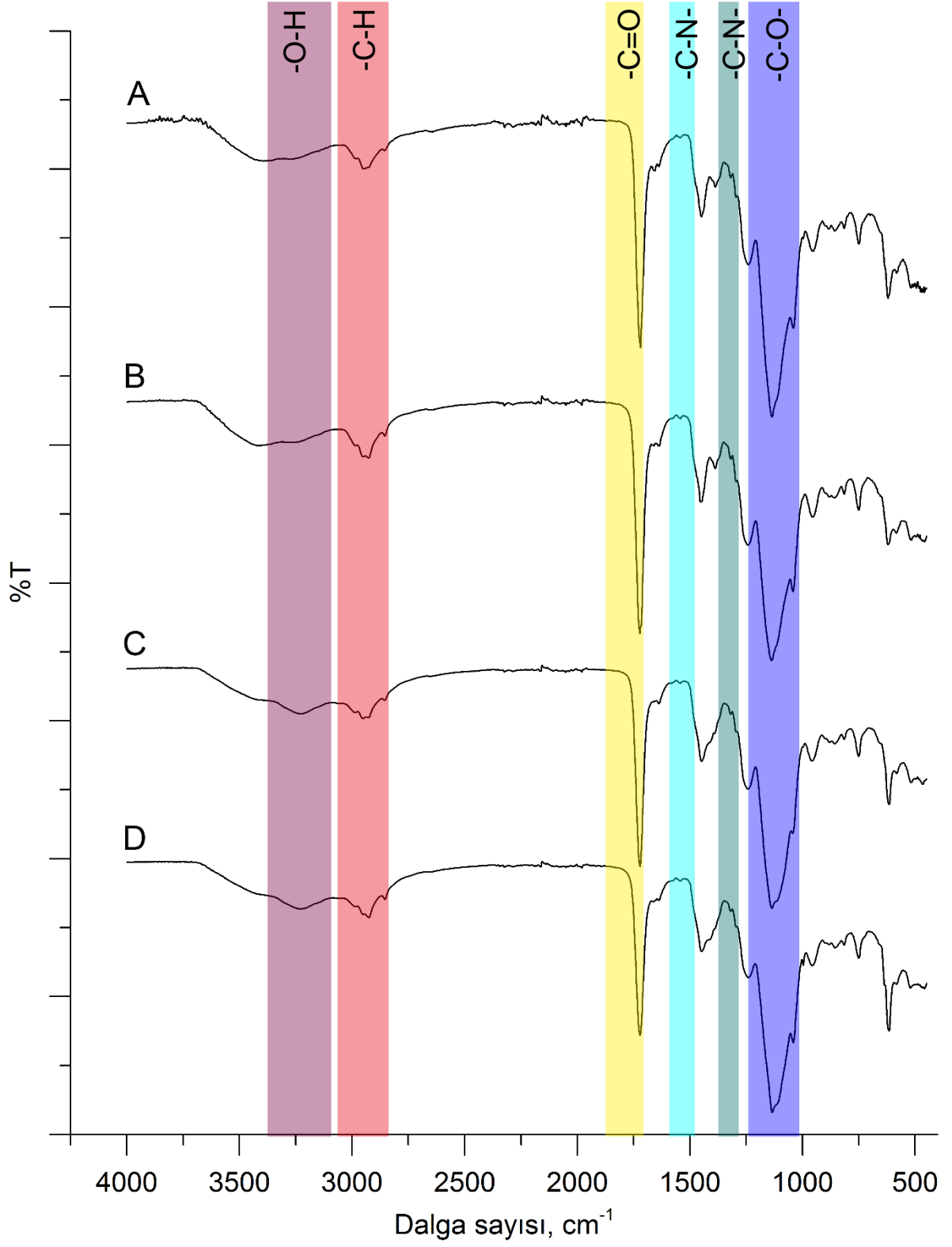


Şekil 4.3. PIN1 (A), PIN2 (B), PIN3 (C) ve NIN (D) nanopartiküllerinin TEM görüntüleri.

4.1.2. Zayıflatılmış Toplam Yansıma - Fourier Dönüştümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR-ATR) Analizi

Sentezlenen nanopartiküllerin kimyasal yapısının belirlenmesinde FTIR-ATR tekniği kullanılmıştır. Nanopartiküllerin FTIR-ATR spektrumu Şekil 4.4'de verilmiştir. Baskılanmış ve baskılanmamış nanopartiküllerin sentezinde EDMA, HEMA ve VIM

kullanılmıştır bu nedenle kimyasal yapılarının benzerlik göstermesi beklenmektedir. Spektrumlar incelendiğinde, tüm spektrumlarda EDMA ve HEMA'dan gelen C-H alifatik bükülmeleri 2950 cm^{-1} civarında; C=O ve C-O gerilmeleri bantları sırasıyla 1700 cm^{-1} ve 1145 cm^{-1} civarında; HEMA monomerinin nanopartiküllerin yapısına katıldığını gösteren O-H gerilme bantları 3200 cm^{-1} civarında; VIM fonksiyonel monomerinin yapıya katıldığını gösteren halka içerisindeki C-N gerilme bantları 1320 cm^{-1} ve 1540 cm^{-1} civarında ortaya çıkmıştır. Bu sonuçlar fonksiyonel monomerin baskılanmış ve baskılanmamış nanopartiküllerin yapısına katıldığını göstermektedir.



Şekil 4.4. PIN1 (A), PIN2 (B), PIN3 (C) ve NIN (D) nanopartiküllerinin FTIR-ATR spektrumları.

4.1.2. Elementel Analizi

Nanopartiküllerin kimyasal bileşiminin incelenmesinde elementel analiz cihazı kullanılmıştır. Elementel analiz maddelerin yapısındaki kütlece azot (N), kükürt (S), hidrojen (H) ve karbon (C) miktarlarını vermektedir. Elde edilen elementel analiz sonuçları Çizelge 4.1’de verilmiştir. Nanopartiküllerin yapısındaki azot kaynağı polimerleşen fonksiyonel monomerden (VIM) kaynaklanmaktadır bu nedenle nanopartiküllerin yapısına katılan fonksiyonel monomer miktarının belirlenmesinde azot stokiyometrisi kullanılmıştır. Sonuç olarak PIN1, PIN2, PIN3 ve NIN nanopartiküllerinin yapısına katılan fonksiyonel monomer miktarı sırası ile 1.401 mmol VIM/g, 1.324 mmol VIM/g 1.344 mmol VIM/g ve 1.449 mmol VIM/g olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.1. PIN1, PIN2, PIN3 ve NIN nanopartiküllerinin elemental analiz sonuçları.

Polimer	%C	%H	%N
PIN1	60,65848562	6,92485122	3,92348622
PIN2	60,79587452	6,99056824	3,70812488
PIN3	60,76524858	6,98658745	3,76184564
NIN	60,66058829	6,88545235	4,05742462

4.2. Baskılanmış ve Baskılanmamış Nanosensörlerin Karakterizasyonu

4.2.1. Elipsometre Analizi

Elipsometri gelen ışık dalgası polarizasyonu durumunda bir değişikliğe neden olacak bir optik sistemin herhangi bir fiziksel özelliği ölçmek için kullanılır. Bu, elipsometriyi birçok farklı uygulamada kullanışlı çok yönlü bir teknoloji yapar. Elipsometri, ince filmlerin kalınlık ölçümünde, malzemelerin ve ince tabakaların tanımlanmasında ve yüzeylerin karakterizasyonu alanlarında kullanılmaktadır. Kalınlık ölçümlerinde elipsometri 1 nm kadar ince katmanlardan birkaç mikron kalınlığındaki katmanlara kadar yüksek hassasiyet ve doğrulukta ölçüm yapmaktadır. Elipsometri bu çalışmada nanopartiküllerin çip yüzeyine immobilizasyonundaki tabaka sayısının belirlenmesi için kullanılmıştır. SPR altın çip yüzeyine immobilize edilen nanopartiküllerin oluşturduğu

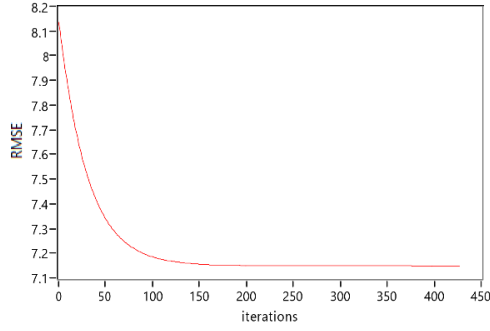
film kalınlıkları elipsometri ile belirlenmiş ve sonuçlar Şekil 4.5'de verilmiştir. Nanopartiküllerin yüzeye immobilizasyonunun ardından yaklaşık 100 nm civarında altın çip yüzeyinde tabaka oluşmuştur. Zeta boyut analizi ve TEM sonuçlarına göre nanopartiküllerin boyutları göze önüne alındığında çip yüzeyinde nanopartiküllerin immobilizasyonunun iki katman halinde gerçekleştiği sonucuna ulaşılmıştır.

A

results			
	best fit	+/-	unit
thickness (layer#0, sample)	98.7	2.7	nm
RMSE	7.147		

correlation	
	thickness
thickness (l)	1.000

show RMSE trace

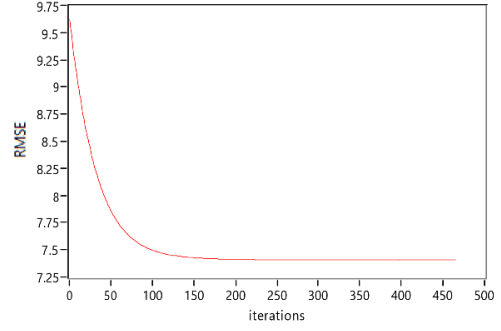


B

results			
	best fit	+/-	unit
thickness (layer#0, sample)	96.8	2.9	nm
RMSE	7.407		

correlation	
	thickness
thickness (l)	1.000

show RMSE trace

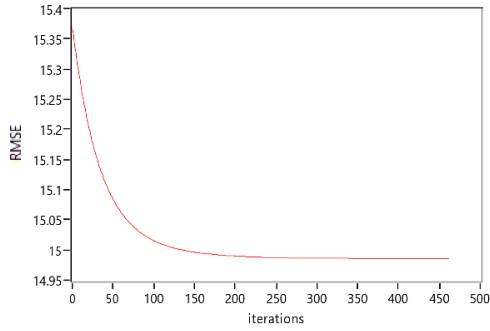


C

results			
	best fit	+/-	unit
thickness (layer#0, sample)	99.5	5.5	nm
RMSE	14.985		

correlation	
	thickness
thickness (l)	1.000

show RMSE trace

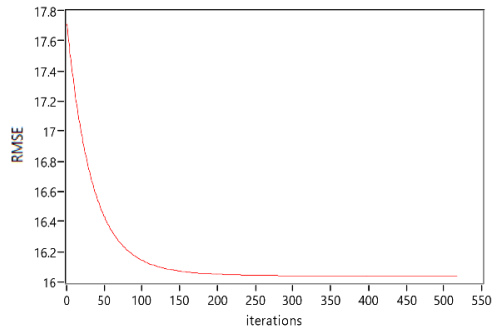


D

results			
	best fit	+/-	unit
thickness (layer#0, sample)	95.9	6.5	nm
RMSE	16.038		

correlation	
	thickness
thickness (l)	1.000

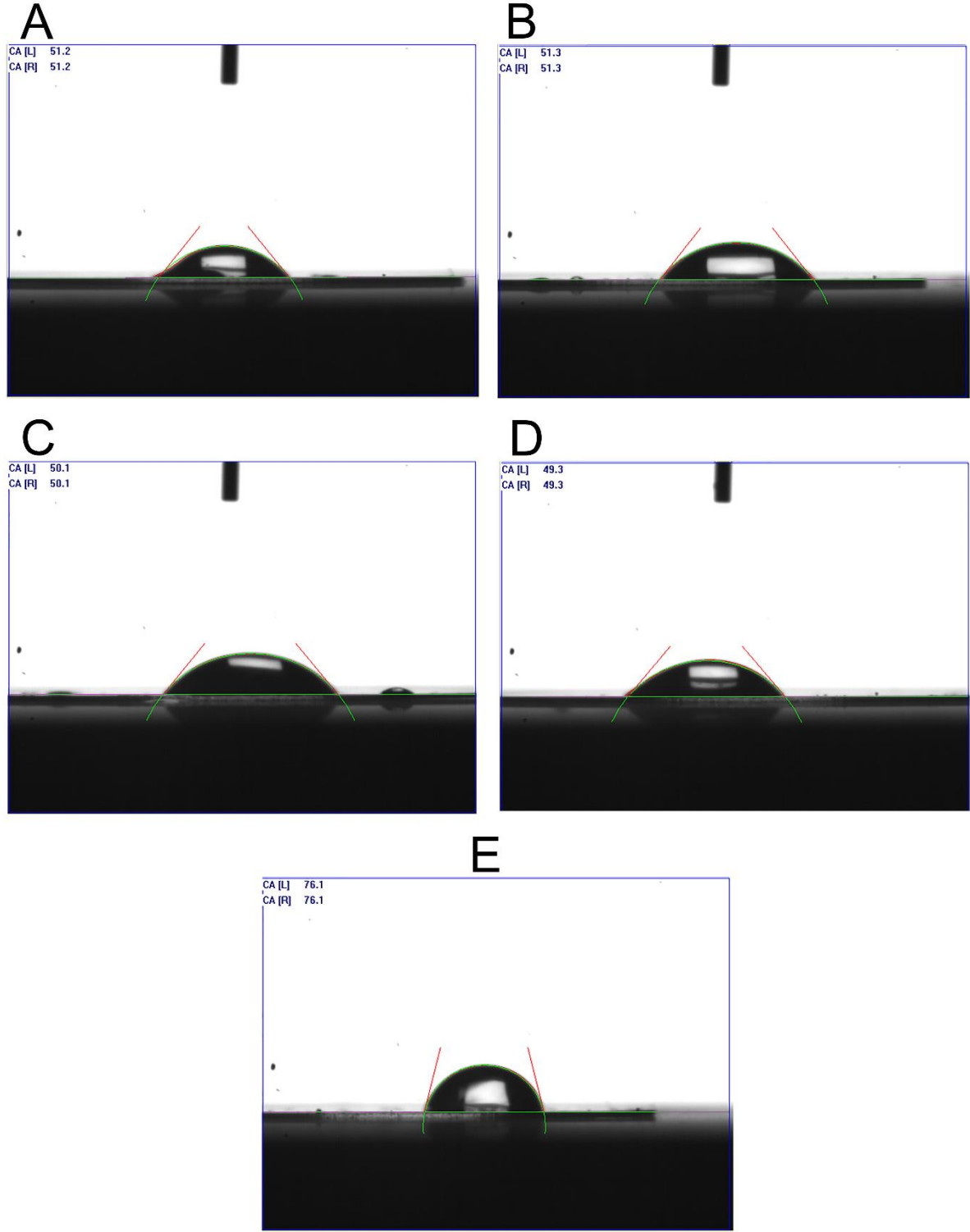
show RMSE trace



Şekil 4.5. PIN1 (A), PIN2 (B), PIN3 (C) ve NIN (D) nanopartiküllerinin elipsometri sonuçları.

4.1.2. Temas Açısı Analizi

SPR nanosensör çip yüzeyinin nanopartiküllerle modifikasyonu sonrasında çip yüzeyindeki hidrofilitate değişimi Temas Açısı yöntemiyle incelenmiştir. Nanopartiküllerin altın çip yüzey üzerine immobilizasyonu öncesi ve sonrası yapılan analizlerle yüzeyde meydana gelen hidrofilitate değişimi incelenmiştir. PIN1, PIN2, PIN3 ve NIN nanopartikülleri ile hazırlanan nanosensörlerin ve modifiye edilmemiş çip (UN) yüzeyine damlatılan suyun temas açısı ölçümleri Şekil 4.6'da verilmiştir. Temas açısı yüzey hidrofobitesine göre değişmektedir. Örneğin süperhidrofobik bir yüzey için suyun temas açısı değeri 180° [298-300] derece iken tamamen ıslanmış hidrofilik bir yüzey için bu değer 0° [301] olabilmektedir. Modifiye edilmemiş altın çip yüzeyi için temas açısı 76.1° iken PIN1, PIN2, PIN3 ve NIN nanopartiküllerinin yüzeye immobilizasyonu ile elde edilen nanosensörlerin temas açısı değerleri sırası ile 51.2° , 51.3° , 50.1° ve 49.3° olarak bulunmuştur. Temas açısındaki değişimler nanopartiküllerin yüzeye immobilizasyonu sonucu yüzey hidrofobitesinin değiştiğini göstermektedir. Nanopartiküllerin hidrofilik karakterde olması yüzey hidrofobitesini azaltarak temas açısı değerini düşürmüştür.



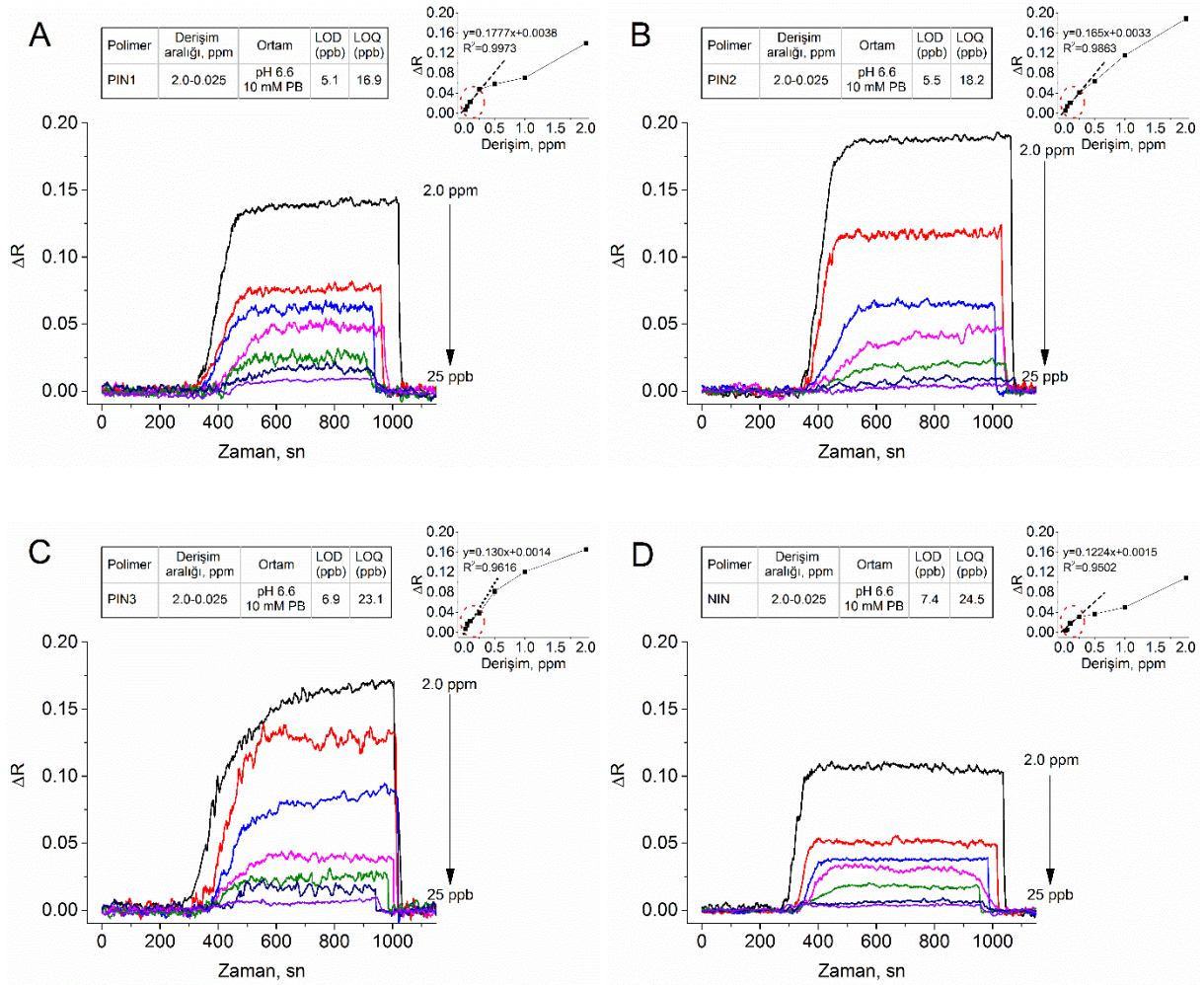
Şekil 4.6. PIN1 (A), PIN2 (B), PIN3 (C), NIN (D) ve UN (E) nanosensör çiplerinin temas açısı ölçümleri.

4.3. Yüzey Plazmon Rezonans Sensörlerin Kinetik Analizleri

Yüzey plazmon rezonans sensörler; hassas, seçici, etiket gerektirmeyen ve gerçek zamanlı bir analiz yöntemi olması nedeniyle sıkça tercih edilmektedir. SPR, biyomedikal bilimlerde, hücre ayırımı ve hücre yüzeyi karakterizasyonu, çevresel kirleticilerin tayini ve ilaç keşfi gibi çeşitli uygulamalar için tahrip edici olmayan, modüler ve esnek bir araçtır [302]. Hem nicel (kinetik ve termodinamik parametrelerin incelenmesi) hem de nitel (moleküler etkileşimlerin incelenmesi) tayine olanak sağlayan SPR sensörlerin avantajları kullanımlarını ilgi çekici hale getirmiştir [303].

Bu çalışma kapsamında yaygın olarak kullanılan bir kortikosteroid olan Prednisolon tayini için SPR temelli nanosensör geliştirilmiştir. WADA tarafından glukosteridler için belirlenen tayin limiti 30 ng/mL'dir. İlgili örnekte 0.030 ppm'den daha üst seviyede Prednisolona rastlanması halinde yasadışı olarak (doping) kullanıldığı varsayımı baz alınmaktadır [304-306].

Bu nedenle tez çalışması kapsamında dört farklı nanopartikül hazırlanmış ve her bir partikül için 0.025 ppm'den 2 ppm'e kadar olan Prednisolon derişimleri taranmıştır. Prednisolon tayini için en sık tercih edilen vücut sıvısı idrar olduğundan ilk olarak pH 6.6 fosfat tamponu ile çalışılmıştır. 2 ppm, 1 ppm, 0.5 ppm, 0.25 ppm, 0.1 ppm, 0.05 ppm ve 0.025 ppm derişimlerindeki prednisolon çözeltisi sisteme verilmiştir. Elde edilen sensogramlarda denge çözeltisi olarak sisteme tatbik edilen tamponun kırılma indisinde meydana getirdiği değişiklik başlangıç değeri (R_i) olarak değerlendirilmiştir. Prednisolon çözeltisi verildikten sonra kırılma indisinde bir artış gözlenmiştir. Prednisolon çözeltisinin meydana getirdiği değişiklik dengeye geldikten sonraki kırılma indisi ise bitiş değeri (R_f) olarak kabul edilmiştir. Prednisolonun sensör yüzeyine bağlanmasıyla kırılma indisinde meydana gelen değişiklik bitiş kırılma indisinin başlangıç kırılma indisinden çıkarılmasıyla hesaplanmış ($\Delta R=R_f-R_i$) ve Origin programı kullanılarak grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.7). Ayrıca derişimdeki değişikliğe karşı ΔR 'de meydana gelen değişiklik grafiğe geçirilmiştir.

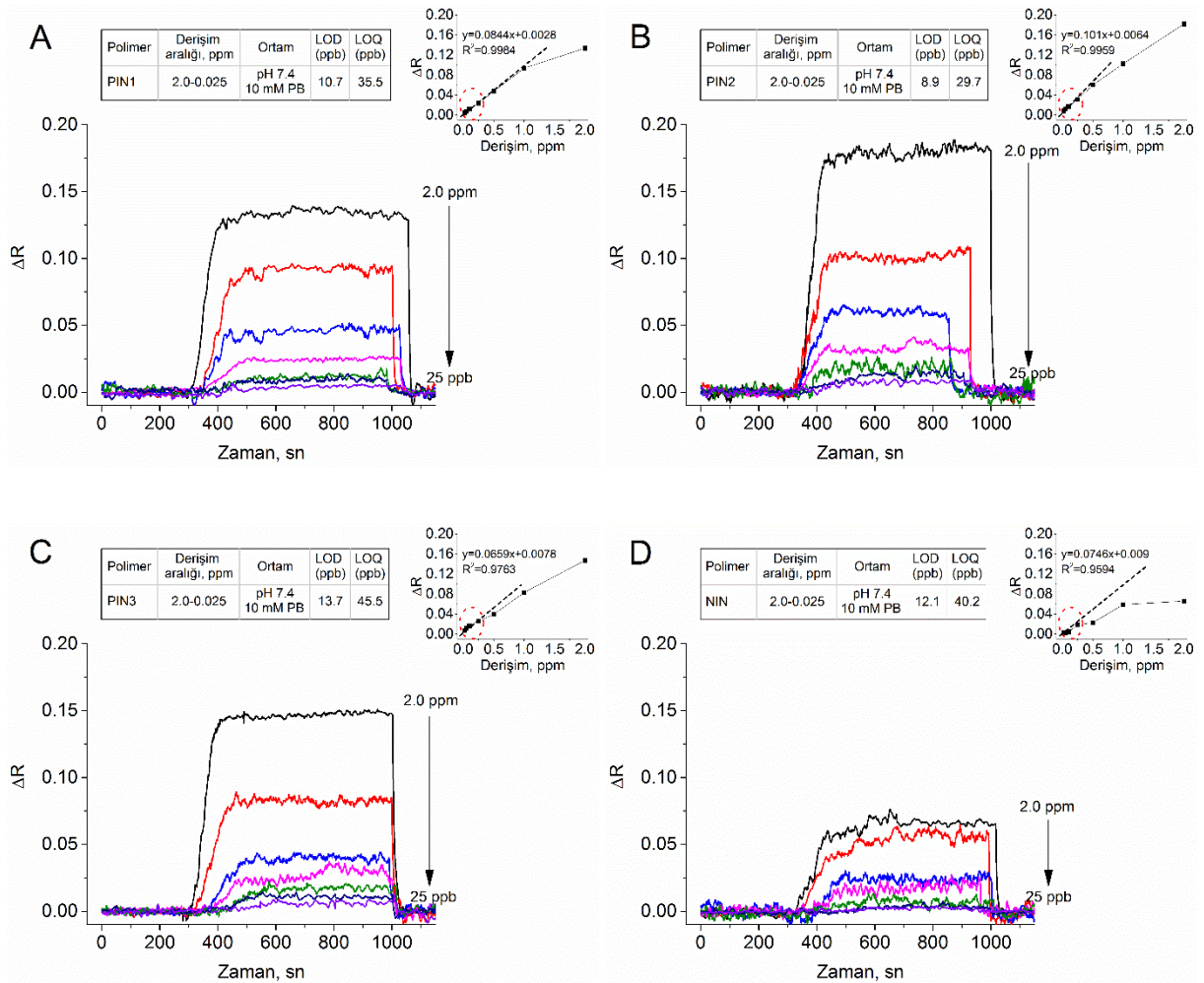


Şekil 4.7. Prednisolon tayini için hazırlanmış nanopartiküllerin 10 mM pH 6.6 fosfat tamponu varlığında zamana karşı ΔR sensogramları ve derişim- ΔR ilişkisi.

Hem sensogramlardan hem de kalibrasyon grafiklerinden görüldüğü üzere sistemde doğrusal bir artış söz konusudur. Prednisolon çözeltisinin derişimi arttıkça kırılma indisinde meydana getirdiği değişlik de artış göstermiştir. Ayrıca kalibrasyon grafiklerinden de görüldüğü gibi sistem 0.5 ppm'den sonra dengeye ulaşmıştır. Ayrıca her bir partikül için tayin limiti (LOD) hesaplanmış ve bu değerler PIN1, PIN2, PIN3 ve NIN kodlu partikülleri için sırasıyla 5.1 ppb, 5.5 ppb, 6.9 ppb ve 7.4 ppb olarak gösterilmiştir. Tayin alt sınırı (LOQ) ise aynı sıralamayla 16.9 ppb, 18.2 ppb, 23.1 ppb ve 24.5 ppb olarak belirlenmiştir. Derişim- ΔR grafiklerinden elde edilen denklemler ise PIN1, PIN2, PIN3 ve NIN kodlu partikülleri için sırasıyla $y = 0.1777x + 0.0038$, $y = 0.165x + 0.0033$, $y = 0.130x + 0.0014$ ve $y = 0.1224x + 0.0015$ olarak belirtilmiştir. Elde

edilen bu grafiklerin doğrusallık katsayıları ise (R^2) sırasıyla 0.9973, 0.9863, 0.9616 ve 0.9502 olarak bulunmuştur. Şekil 4.7’de gösterildiği gibi kalibrasyon grafiğinin denklemini/doğrusallığı, tayin limiti ve tayin alt sınırı baz alındığında PIN2 kodlu partikülün pH 6.6 için en iyi performansı gösterdiği belirlenmiştir.

Ayrıca çalışma kapsamında yapay plazmanın ortalama pH’ı olan pH 7.4 10 mM fosfat tamponuyla da çalışılmıştır. Verilerin analizi esnasında sensogramlar ΔR değeri baz alınmıştır. PIN1, PIN2, PIN3 ve NIN kodlu partiküllerin prednisolon kalıp molekülünün adsorpsiyon ilişkisi aynı yöntemle incelenmiştir. LOD, LOQ değerleri ve kalibrasyon grafiği Şekil 4.8’de gösterilmiştir.



Şekil 4.8. Prednisolon baskılanmış ve baskılanmamış nanopartiküllerin 10 mM pH 7.4 fosfat tamponu varlığında zamana karşı ΔR sensogramları ve derişim- ΔR ilişkisi.

Şekil 4.8’de görüldüğü gibi pH 7.4’de PIN1 için elde edilen LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 10.7 ppb ve 35.5 ppb olarak belirlenmiştir. 0.025–2.0 ppm derişim aralığındaki ΔR ’ye karşı değerlendirildiğinde ise elde edilen kalibrasyon grafiğinin denklemi ve doğrusallığı (R^2) sırasıyla $y = 0.0844x + 0.0028$ ve 0.9984 olarak belirlenmiştir.

pH 7.4’de PIN2 kodlu partikülün sensogramları incelenmiş LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 8.9 ppb ve 29.7 ppb olarak hesaplanırken, derişime karşı elde edilen ΔR değerleri baz alınarak çizilen grafiğın denklemi ve doğrusallığı sırasıyla $y = 0.101x + 0.0064$ ve 0.9959 olarak belirlenmiştir.

PIN3 kodlu nanopartikülün pH 7.4’de belirlenen LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 13.7 ppb ve 45.5 ppb iken ΔR -derişim doğrusunun denklemi ve doğrusallık katsayısı sırasıyla $y = 0.0659x + 0.0078$ ve 0.9763’tür.

Son olarak pH 7.4’de NIN için elde edilen LOD ve LOQ değerleri 12.1 ppb ve 40.2 ppb olarak belirtilmiştir. Derişime karşı kırılma indisinde meydana gelen değişikliğin gösterildiği grafiğın denklemi ve doğrusallık katsayısı ise $y = 0.0746x + 0.009$ ve 0.9594 olarak hesaplanmıştır.

Belirtilen LOD/LOQ değerleri ve derişime karşı kırılma indisi değişikliğinin doğrusallığı değerlendirildiğinde pH 7.4 için PIN2 kodlu partikülün performansının diğerlerinden daha iyi olduğu görülmüştür.

4.3.1. Denge Analizleri

Sensör yüzeyindeki analit bağlama bölgesinin toplam miktarı $[B]_0$, yüzeyin maksimum hedef bağlama kapasitesi cinsinden ifade edilirse, tüm konsantrasyon değerleri SPR cevap sinyali R olarak ifade edilebilir ve kütleden molar derişime geçiş ihtiyacını ortadan kaldırılır. Akış hücreinde bağlanmamış analit derişiminin sabit kaldığı yalancı-birinci derece koşulu için bağlanma aşağıdaki eşitlikle ifade edilebilir;

$$\frac{dR}{dt} = k_a C (R_{max} - R) - k_d R$$

Eşitlikte, dR/dt SPR cevap sinyalinin değişim hızını, R bağlanma sonucu oluşan sinyali ve R_{max} ise bağlanma sonucu oluşan maksimum sinyali; C , çözeltili derişimini; k_a ($M^{-1}s^{-1}$) bağlanma hız sabitini; k_d (s^{-1}) ayrışma hız sabitini ifade etmektedir. Bağlanma sabiti,

$K_A (M^{-1})=k_a/k_d$ olarak hesaplanabilir. Denge anında, $dR/dt = 0$ olduğundan eşitlik tekrar düzenlenirse;

$$\frac{R_e}{C} = K_A R_{max} - K_A R_e$$

Bağlanma sabiti, K_A , R_e/C 'ye karşı R_e 'nin grafiğe geçirilmesiyle elde edilir. Ayrışma sabiti, K_D , $1/K_A$ olarak hesaplanabilir.

4.3.2. Bağlanma Kinetik Analizleri

Bu veri analizleri aşağıdaki denklemle ilişkilendirilmektedir;

$$\frac{dR}{dt} = k_a C R_{max} - (k_a C + k_d)$$

Denklemden k_a ve k_d sırasıyla bağlanma ve ayrılma hız sabitlerini, C konsantrasyonu, R_{max} ise en yüksek kırıyım indisini vermektedir. dR/dt grafiğinin etkileşim kontrollü kinetik eğim çizgisi teorik olarak $-(k_a C + k_d)$ eğimine sahip bir doğru olacaktır. İlk bağlanma oranı ($R = 0$ 'da) analit konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve konsantrasyon ölçümleri için kullanılabilir. Eğer R_{max} değeri biliniyorsa hem k_a hem de k_d tek bir bağlanma sensogramından belirlenebilir. Ancak, R_{max} , deneysel olarak belirlenmesi genellikle zordur çünkü bu yüksek bir analit konsantrasyonu (yüzeyi tamamen doyurmak için) gerektirir. Bunun yerine tercih edilen bir yaklaşım, birkaç farklı analit konsantrasyonunda sensogramların elde edilmesidir. Başlangıçta ve analiz bitiminde, detektörden alınan toplam yanıtın anlık yanıtı karşı grafiğinin çizilmesiyle eğim olarak S değeri elde edilir.

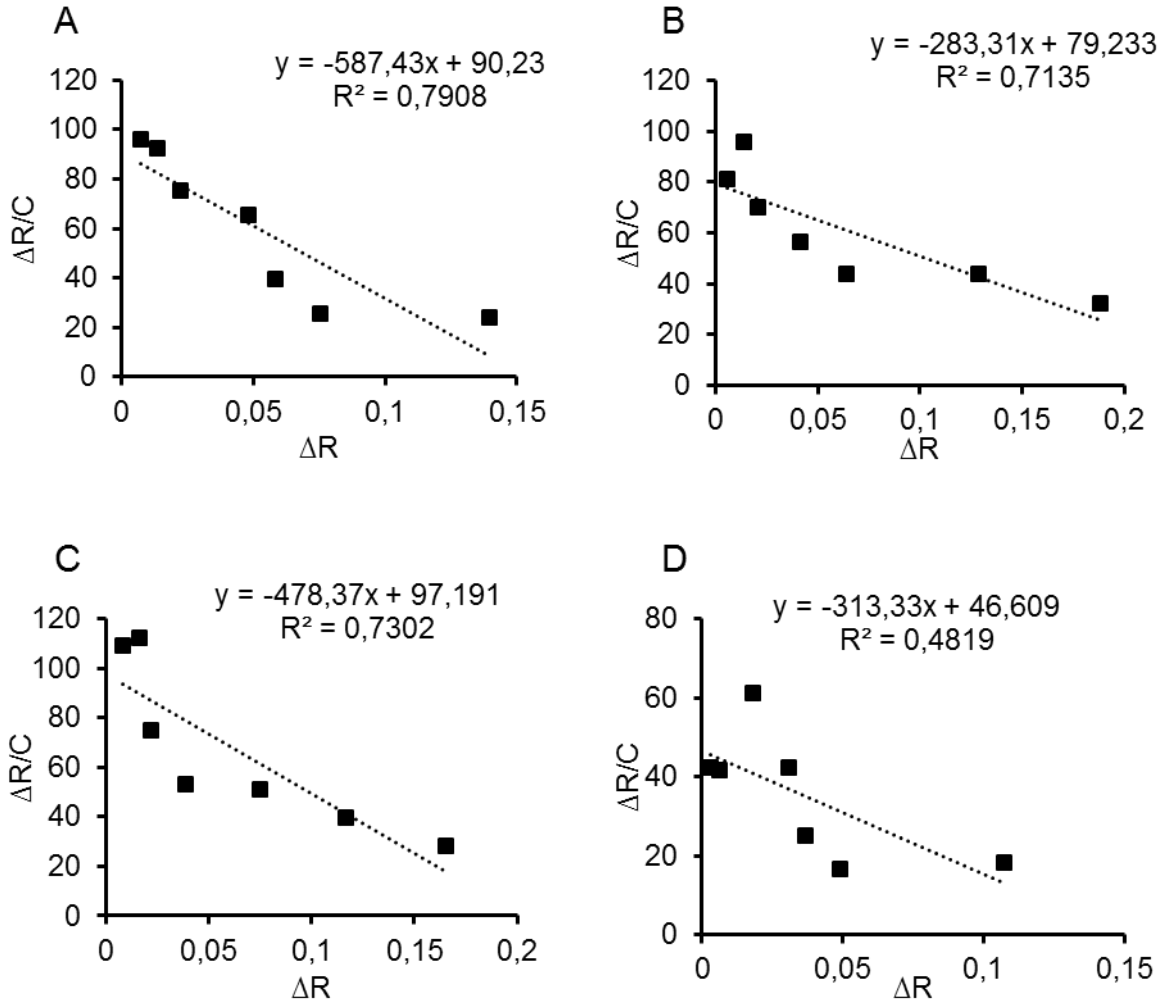
$$S = k_a C + k_d$$

Denklemden de görüldüğü üzere S 'nin C 'ye karşı çizilen doğrusal grafiğinin eğimi k_a değerini verir. Teoride $C=0$ olduğu durumda da k_d değerinin elde edilmesi beklenir ancak uygulamada $k_a C \gg k_d$ ise ayrılma hızı sabitinin güvenilir bir ölçüsü olarak kullanılamaz. Bu değeri elde etmek için daha doğru bir yol, doymuş bağlanma bölgelerinden hiç kalıp molekül içermeyen bir tampon çözeltisinin akışı esnasında kalıp moleküllerinin ayrılmalarının direkt olarak ölçülmesidir ve ayrılma sabiti şu şekilde ifade edilir:

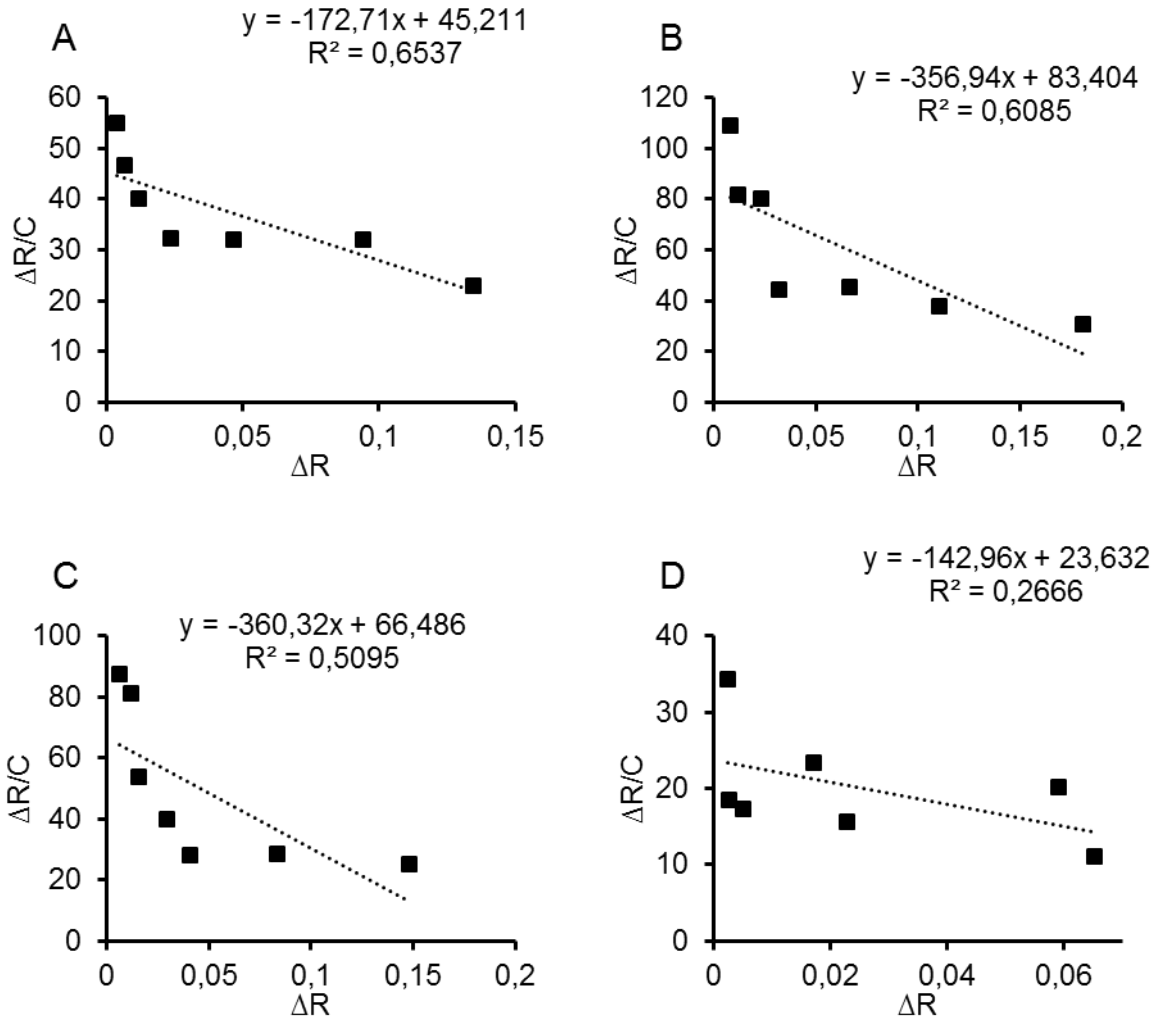
$$\ln\left(\frac{R_o}{R_t}\right) = k_d(t - t_o)$$

R_o başlangıçta (yani t_o anında) belirlenen yanıt seviyesiyken R_t ve t ayrılma eğrisi boyunca elde edilen değerleri temsil eder [307].

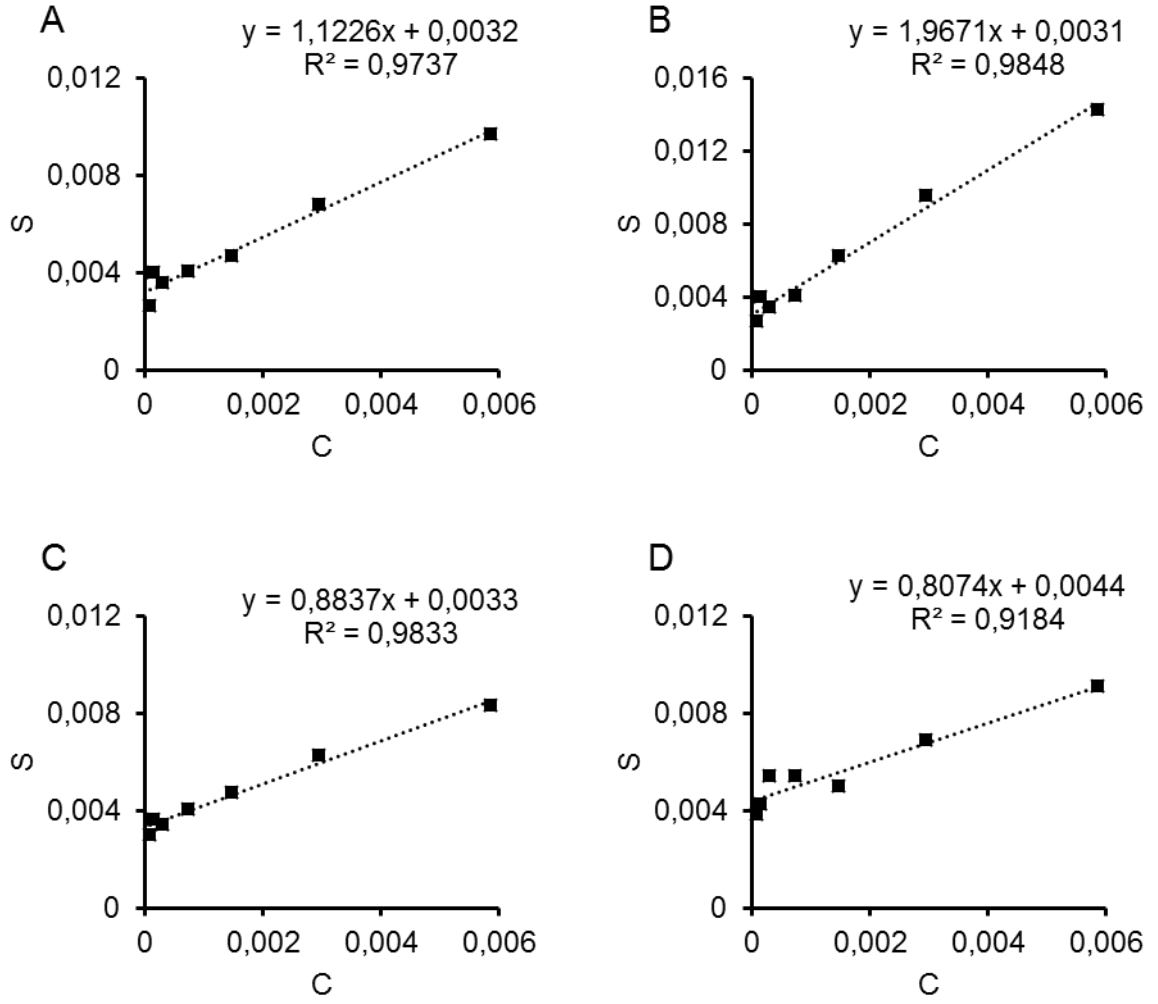
Denge ve bağlanma kinetik analizleri PIN1, PIN2, PIM3 ve NIN nanosensörlerinin pH 7.4 ve pH 6.6'da gerçekleştirilen kinetik analiz sonuçlarına uygulanmış ve çizilen grafikler Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11 ve Şekil 4.12'de verilmiştir. Doğru denklemlerinden elde edilen ΔR_{max} , k_a , k_d , K_A ve K_D parametreleri Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3'de özetlenmiştir.



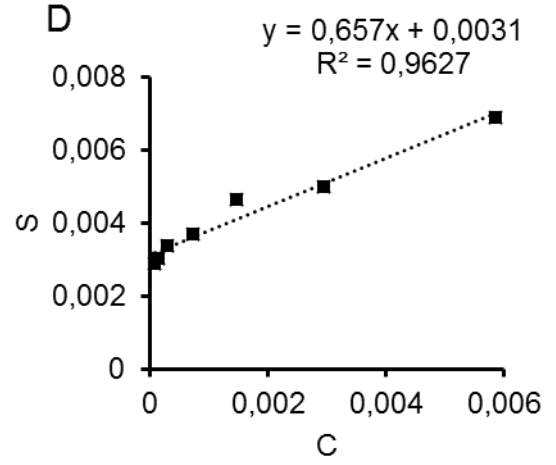
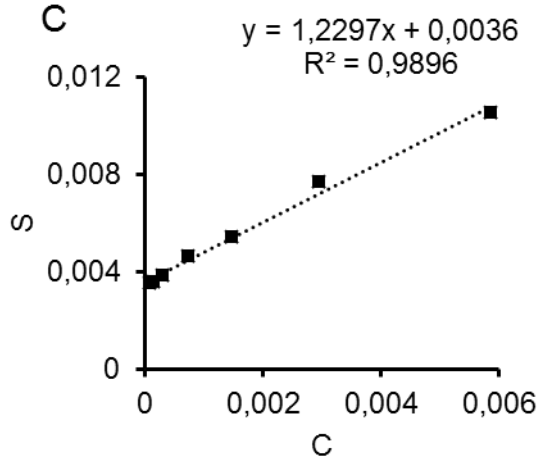
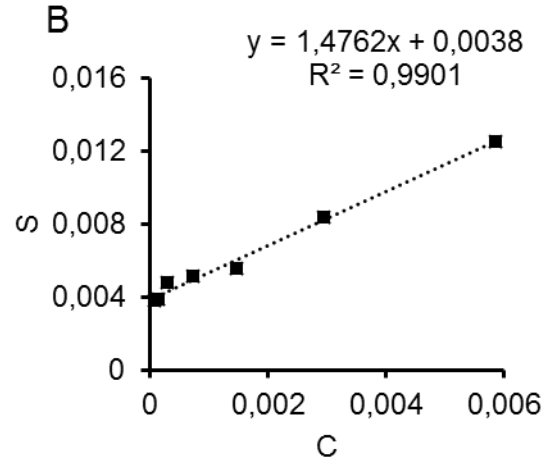
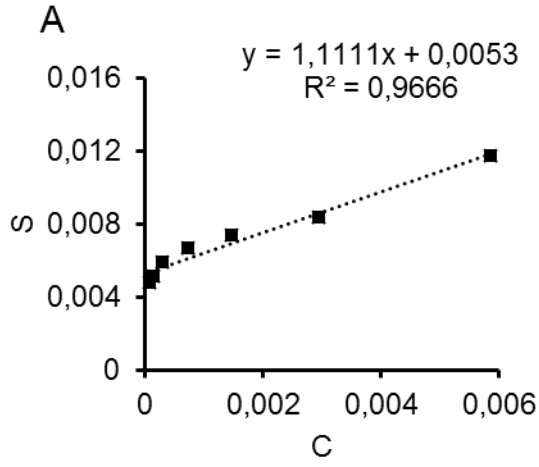
Şekil 4.9. pH 6.6'da gerçekleştirilen denge analizleri (Scathard Analizi) : PIN1 (A), PIN2 (B), PIN3 (C) ve NIN (D).



Şekil 4.10. pH 7.4'de gerçekleştirilen denge analizleri (Scatchard Analizi) : PIN1 (A), PIN2 (B), PIN3 (C) ve NIN (D).



Şekil 4.11. pH 6.6'da gerçekleştirilen bağlanma kinetik analizleri: PIN1 (A), PIN2 (B), PIN3 (C) ve NIN (D).



Şekil 4.12. pH 7.4'de gerçekleştirilen bağlanma kinetik analizleri: PIN1 (A), PIN2 (B), PIN3 (C) ve NIN (D).

Çizelge 4.2. pH 6.6'da nanosensörlerin Denge analiz ve Bağlanma kinetik analiz sonuçları.

	Denge Analizleri		Bağlanma Kinetik Analizleri	
PIN1	ΔR_{max}	0.153601	k_a , L/mmol.s	1.1226
	K_a , L/mmol	587.43	k_d , 1/s	0.0032
	K_d , mmol/L	0.001702	K_a , L/mmol	350.8125
	R^2	0.7908	K_d , mmol/L	0.002851
			R^2	0.9737
PIN2	ΔR_{max}	0.264378	k_a , L/mmol.s	1.9671
	K_a , L/mmol	299.28	k_d , 1/s	0.0031
	K_d , mmol/L	0.003341	K_a , L/mmol	634.5484
	R^2	0.7179	K_d , mmol/L	0.001576
			R^2	0.9848
PIN3	ΔR_{max}	0.203171	k_a , L/mmol.s	0.88847
	K_a , L/mmol	478.37	k_d , 1/s	0.0033
	K_d , mmol/L	0.00209	K_a , L/mmol	269.2939
	R^2	0.7302	K_d , mmol/L	0.003713
			R^2	0.9833
NIN	ΔR_{max}	0.148754	k_a , L/mmol.s	0.8074
	K_a , L/mmol	313.33	k_d , 1/s	0.0044
	K_d , mmol/L	0.003192	K_a , L/mmol	183.5
	R^2	0.4819	K_d , mmol/L	0.00545
			R^2	0.9184

Çizelge 4.3. pH 7.4'de nanosensörlerin Denge analiz ve Bağlanma kinetik analizleri sonuçları.

	Denge Analizleri		Bağlanma Kinetik Analizleri	
PIN1	ΔR_{max}	0.261774	k_a , L/mmol.s	1.1111
	K_a , L/mmol	172.71	k_d , 1/s	0.0053
	K_d , mmol/L	0.00579	K_a , L/mmol	209.6415
	R^2	0.6537	K_d , mmol/L	0.00477
			R^2	0.9666
PIN2	ΔR_{max}	0.233664	k_a , L/mmol.s	1.4762
	K_a , L/mmol	356.94	k_d , 1/s	0.0038
	K_d , mmol/L	0.002802	K_a , L/mmol	388.4737
	R^2	0.6085	K_d , mmol/L	0.002574
			R^2	0.9901
PIN3	ΔR_{max}	0.184519	k_a , L/mmol.s	1.2297
	K_a , L/mmol	360.32	k_d , 1/s	0.0036
	K_d , mmol/L	0.002775	K_a , L/mmol	341.5833
	R^2	0.5095	K_d , mmol/L	0.002928
			R^2	0.9896
NIN	ΔR_{max}	0.165305	k_a , L/mmol.s	0.657
	K_a , L/mmol	142.96	k_d , 1/s	0.0031
	K_d , mmol/L	0.006995	K_a , L/mmol	211.9355
	R^2	0.2666	K_d , mmol/L	0.004718
			R^2	0.9627

Denge analiz ve bağlanma kinetik analiz sonuçları incelendiğinde, regresyon katsayılarının oldukça düşük olması sebebiyle Scathard denge analiz yönteminin nanosensörlerin bağlanma analizlerinde yetersiz olduğu sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4.2'deki bağlanma analizleri incelendiğinde PIN1, PIN2, PIN3 ve NIN nanosensörleri için K_A değerleri sırasıyla 350.8 L/mmol, 634.5 L/mmol, 269.3 L/mmol ve 183.5 L/mmol olarak 0.974, 0.985, 0.983 ve 0.918 doğrulukta elde edilmiştir. Sonuçlardan görüldüğü gibi baskılanmış nanosensörlerin PRD'a olan afinitesinin baskılanmamış sensöre göre daha büyük olduğu görülmektedir. Ayrıca PIN2 kodlu nanosensörün en yüksek bağlanma sabitine sahip olduğu bulunmuştur.

Çizelge 4.3'deki bağlanma analizleri incelendiğinde PIN1, PIN2, PIN3 ve NIN nanosensörleri için hesaplanan K_A değerleri sırasıyla 209.6 L/mmol, 388.5 L/mmol, 341.6 L/mmol ve 211.9 L/mmol olarak 0.967, 0.990, 0.990 ve 0.963 doğrulukta elde edilmiştir. Baskılanmış sensörlerin pH 7.4 ortamında pH 6.6 ortamında olduğu gibi PRD'a olan afinitesinin baskılanmamış sensöre göre daha büyük olduğu görülmektedir. Ayrıca PIN2 kodlu nanosensörün pH 7.4 ortamında da en yüksek bağlanma sabitine sahip olduğu bulunmuştur.

4.3.3. İzoterm Modelleri

SPR çipinin yüzeyine ligandın bağlanarak tayin sisteminin en verimli şekilde çalışması için denge sisteminin en uygun korelasyonunun oluşturulması esastır [308]. Freundlich, Langmuir, Brunauer-Emmett-Teller, Redlich–Peterson, Dubinin-Radushkevich, Temkin, Toth, Koble-Corrigan, Sips, Khan, Hill, Flory Huggins ve Radke-Prausnitz izotermi gibi çeşitli izotermier bağlanma dengesinin analizinde kullanılmaktadır. Bağlanma dengesi; bağlanma ve ayrılma oranının eşit olduğu bir dinamik denge durumu olarak tanımlanmaktadır [309]. Yüzey adsorpsiyon izoterm modellerinin bu kadar çok türetilmesi temelde termodinamiğin ikinci yasasına dayanır [310, 311]. Bu çalışmada beş doğrusal yüzey adsorpsiyon izotermine yer verilecektir ancak bu izotermier arasında Langmuir ve Freundlich en çok kullanılanlardır.

1909 yılında Freundlich, katı destek malzemelerinin birim kütlesi tarafından adsorbe edilen maddenin sabit sıcaklıkta, basıncı veya konsantrasyonu ile adsorpsiyonunun izotermal değişimini gösteren ampirik bir ifade oluşturmuştur. Bu formül Freundlich

adsorpsiyon izoterm eşitliği olarak bilinmektedir. Freundlich izoterm modeli, heterojen yüzey üzerinde adsorpsiyon, ısı ve afinitelerin sıradışı bir dağılım sergilediği çok katmanlı adsorpsiyon sistemine uygulanabilir [312, 313]. Lineer olmayan Freundlich adsorpsiyon izoterm eşitliği aşağıdaki formülle gösterilmektedir.

$$q_e = K_F C_e^{1/n}$$

Denklemden q_e denge durumunda gram yüzeye adsorbe edilen ligand miktarıdır (mg g^{-1}), C_e ise denge durumundaki çözeltideki ligand derişimidir (mg L^{-1}), K_F değeri Freundlich sabitidir ($\text{mg}^{1-1/n} \text{g}^{-1} \text{L}^{1/n}$) ve $1/n$ bağlanma yoğunluğu ya da yüzeyin heterojenitesidir.

Son yıllarda, Freundlich izotermi organik bileşiklerin ve oldukça reaktif türlerin heterojen adsorpsiyon sistemlerinde sıkça kullanılmaktadır. Freundlich eşitliğinin doğrusallaştırılmış hali aşağıdaki denklemlerle ifade edilmektedir.

$$\log q_e = \log K_F + \frac{1}{n} \log C_e$$

$1/n$ 'nin 0 ila 1 arasında değışimiyle birlikte $\log q_e$ 'nin $\log C_e$ 'ye karşı çizilen grafiğin doğrusal eğimi adsorpsiyon yoğunluğunu ve yüzeyin heterojenitesinin bir ölçüsüdür. Bu değerler sıfıra yaklaştıkça yüzey adsorpsiyonunun heterojenitesi artar. $1/n$ değerinin birin üzerinde olması toplu adsorpsiyonun bir göstergesidir. Son zamanlarda Freundlich izotermi, yüksek konsantrasyonlarda termodinamiğin temel yasalarından biri olan Henry yasasına uygulanamamasından dolayı onaylanmamıştır [314, 315].

İlk defa 1916'da katı yüzey üzerine gaz adsorpsiyonunu tanımlamak için geliştirilmiş olan Langmuir izotermi daha sonra sabit sıcaklıkta farklı adsorbenlerin performansını ölçmek için geleneksel olarak kullanılmıştır [309]. Langmuir izoterm modeli aşağıdaki gibi bir takım varsayımlara dayanmaktadır:

- i) Tek tabakalı adsorpsiyon (adsorben tabakası yalnızca bir molekül kalınlığındadır).
- ii) Adsorpsiyon sadece belirli sayıda iyi tanımlanmış alanlarda gerçekleşebilir.
- iii) Tüm adsorpsiyon alanları aynı veya eşdeğerdir, adsorbe edilmiş moleküller arasında ve hatta bitişik alanlar arasında bile bir yanıl etkileşim ve sterik engel yoktur.

iv) Langmuir İzoterminde homojen adsorpsiyon söz konusudur. Yani her molekül, yüzey düzleminde adsorben kayması olmadan sabit ısı ve aktivasyon enerjisine sahiptir (tüm kaviteleler adsorben için eşit afiniteye sahiptir)[316, 317].

Doğrusal olmayan Langmuir izotermi aşağıdaki gibi ifade edilmektedir:

$$q_e = \frac{q_m K_L C_e}{1 + K_L C_e}$$

Eşitlikte belirtilen q_e ve C_e Freunlich izoterminde belirtilmiştir ancak q_m adsorbenin tek tabakalı adsorpsiyon kapasitesini ifade ederken (mg g^{-1}) K_L Langmuir sabitidir (L mg^{-1}).

Bir analitin adsorbendeki belirli bir yere bağlanarak aynı yere başka bir analitin bağlanmasını engelleyerek denge doygunluk noktasında doğrusal olmayan Langmuir grafiğinde bir plato oluşturur [318, 319].

Langmuir modeli katı adsorben üzerine çözünen adsorpsiyonu tanımlamak için en çok kullanılan modellerdir, ancak doğrusal bir model olmadığından modelin bir optimizasyon programı kullanılarak tekrarlanması gerektirir. Günümüzde, optimizasyon programlarının kullanılmasını önlemek için Langmuir modelinin doğrusallaştırılmış bir versiyonu yaygın olarak kullanılmaktadır. Doğrusal ve doğrusal olmayan Langmuir denklemleri matematiksel olarak eşdeğer olmasına rağmen, doğrusallaştırılmış Langmuir denklemlerinin çeşitli sınırlamaları vardır. Langmuir izoterm modelinin farklı doğrusal matematiksel ifadeleri Çizelge 4.4'de gösterilmiştir [309, 320].

Çizelge 4.4. Sıkça kullanılan izoterm modelleri

Sıkça Kullanılan Modeller	Eşitlikleri	Sınırlamaları
Hanes–Woolf	$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{q_m K_L} + \frac{C_e}{q_m}$	Eşitlik, izoterm denge konsantrasyonu C_e 'nin ve C_e/q_m 'in bağımsız değişkenler olmamasından dolayı Langmuir modeline uymayan verilere bile iyi uyum sağlayabilir.
Lineweaver–Burke	$\frac{1}{q_e} = \frac{1}{q_m} + \frac{1}{K_L q_m C_e}$	Eşitlik yüksek $1/q_e$ değerlerinde ya da düşük q_e değerlerinde aşırı duyarlı olduğundan başlangıç noktasına yakın doğrusal çizimlerde anlamsızdır.
Eadie–Hofstee	$q_e = q_m - \frac{q_e}{K_L C_e}$	Bu modelde, q_e ve $1/C_e$ arasındaki korelasyon oldukça düşüktür; dolayısıyla, denklem Langmuir modeline uyan verilere zayıf uyum sağlar.
Scatchard	$\frac{q_e}{C_e} = K_L q_m - K_L q_e$	Bu modelde de, q_e ve $1/C_e$ arasındaki korelasyon oldukça düşüktür ve aynı nedenden dolayı denklem Langmuir modeline uyan verilere zayıf uyum sağlar.

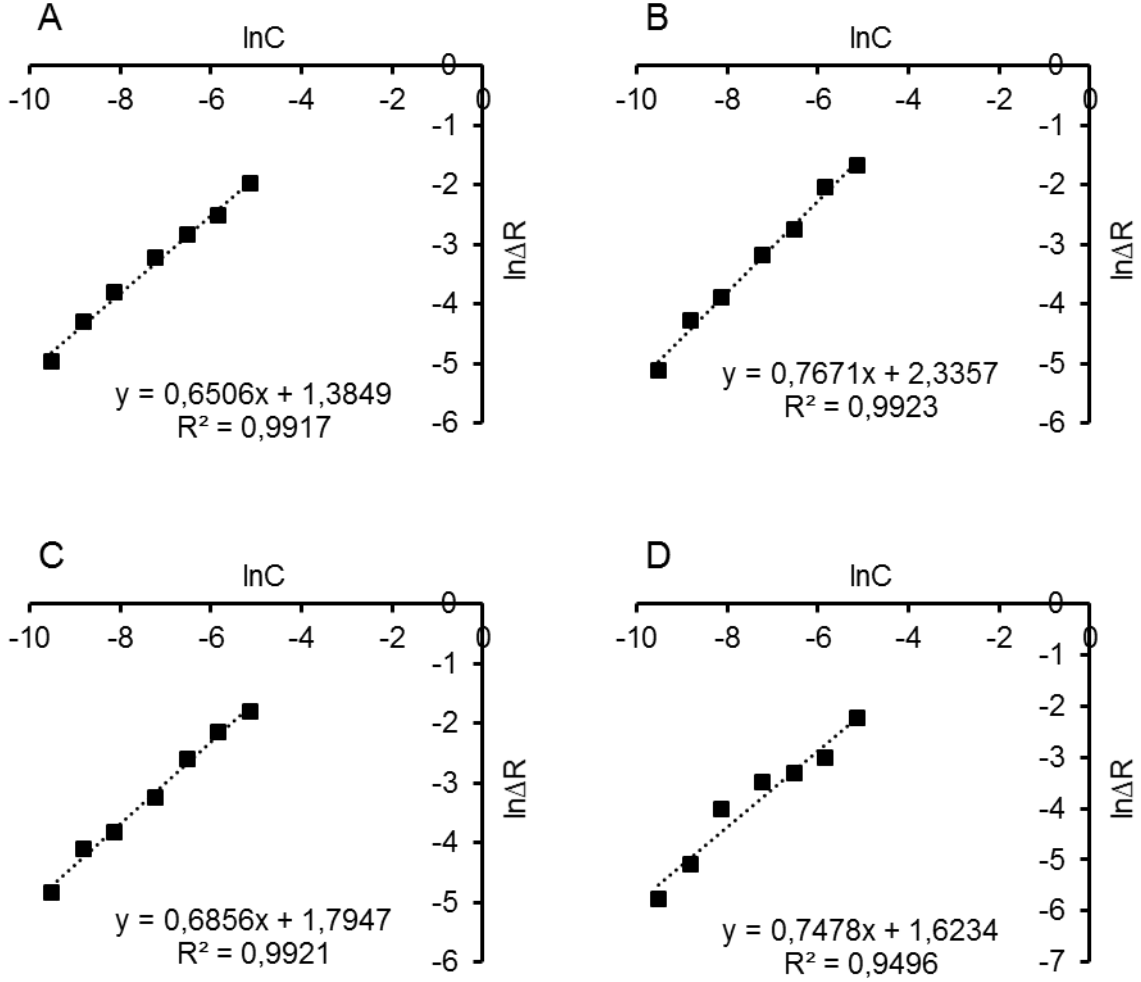
Langmuir-Freundlich modeli birden çok bağlanma bölgesi içeren yapılarda bağlanma analizlerinin gerçekleştirilmesi için uygundur. Bağlanma kinetik parametreleri aşağıdaki eşitlikten elde edilir;

$$\frac{\Delta R}{\Delta R_{max}} = \left(\frac{R_{max} C^{1/n}}{1 + K_D C^{1/n}} \right)$$

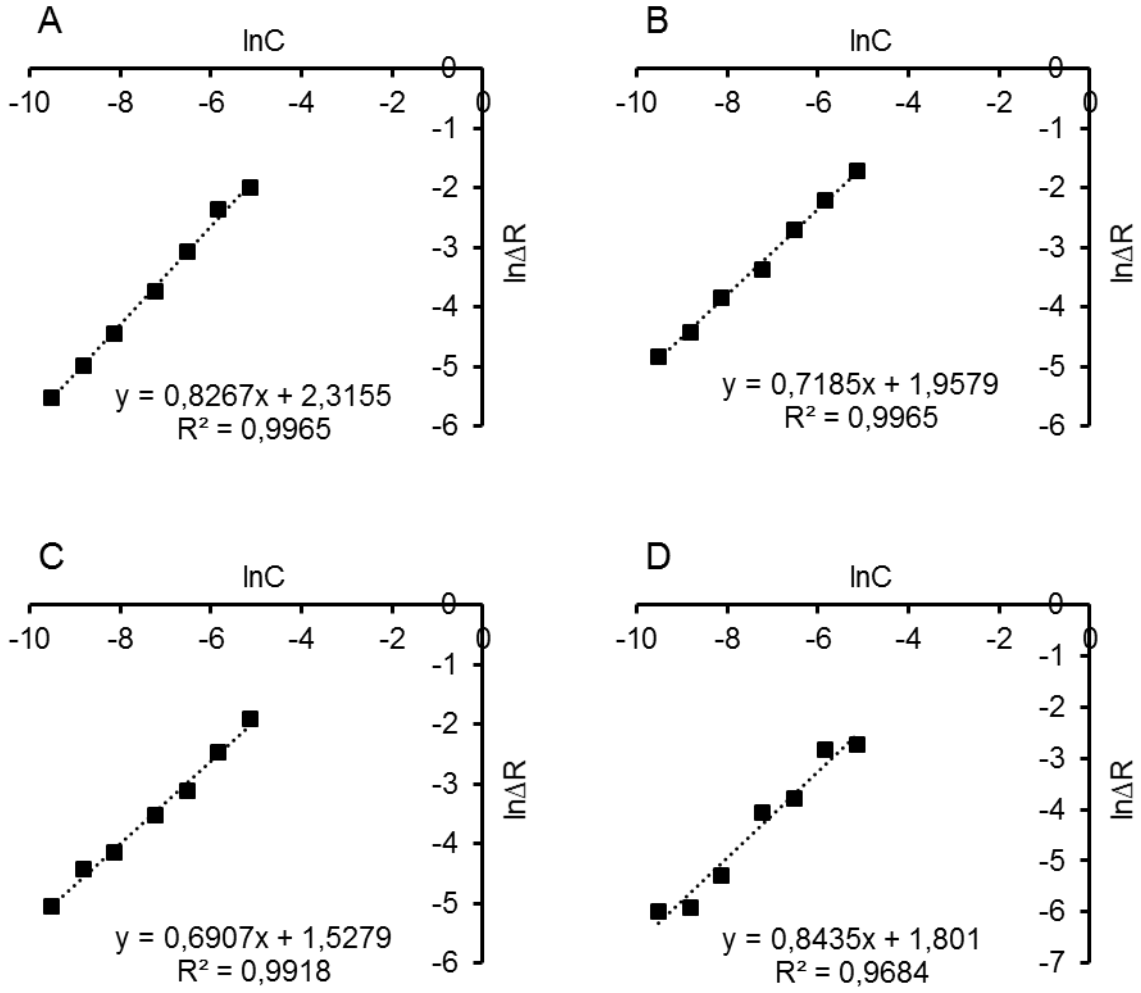
Eşitlikte C analit derişimini; ΔR sensörün verdiği sinyali ve ΔR_{max} ise maximum sinyali ifade etmektedir.

PRD tayini için pH 6.6 ve pH 7.4'de gerçekleştirilen kinetik analiz verilerine Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich izotermi uygulanmıştır (Şekil 4.13-4.18).

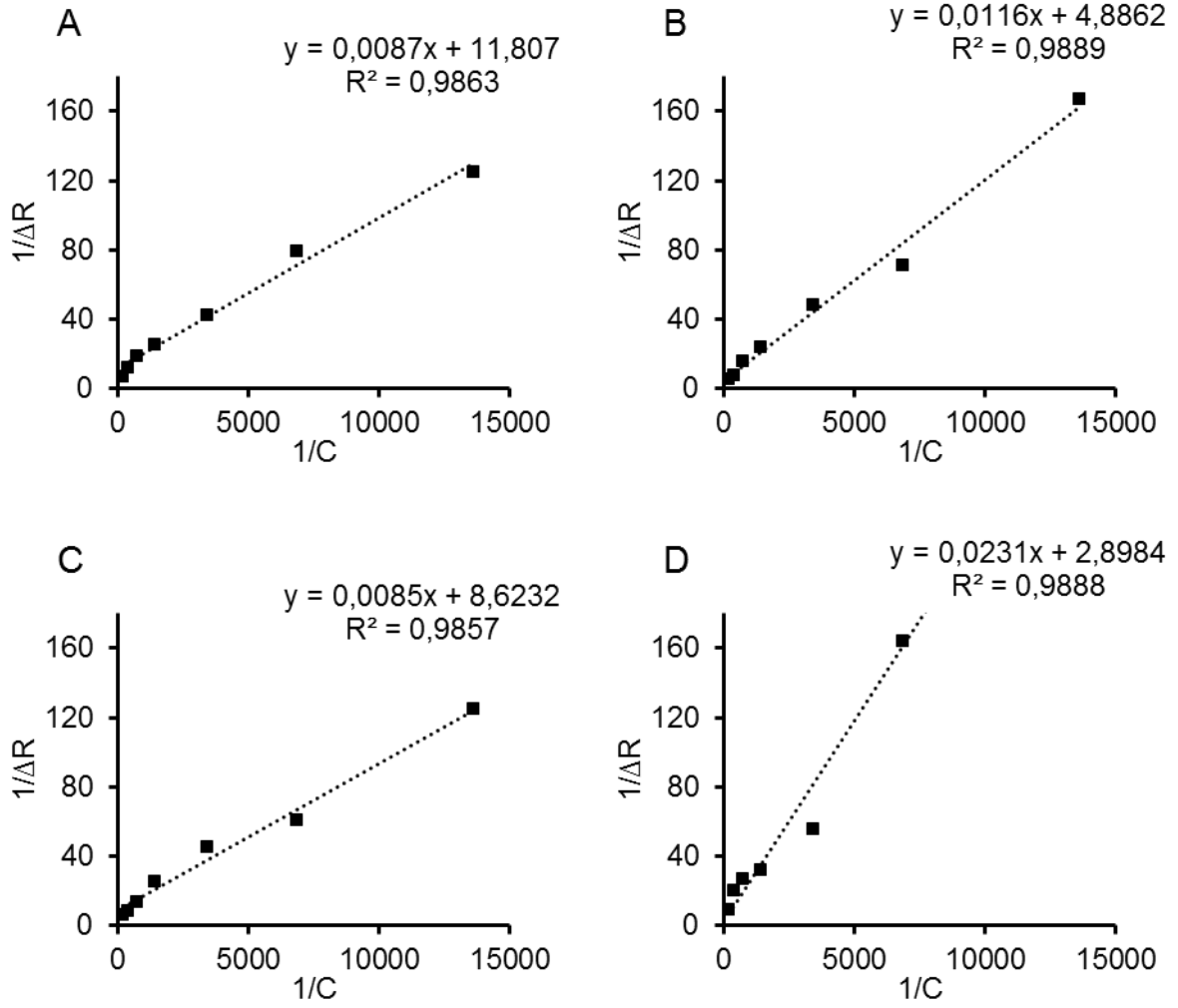
Grafiklerden elde edilen bağlanma parametreleri Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6'da özetlenmiştir.



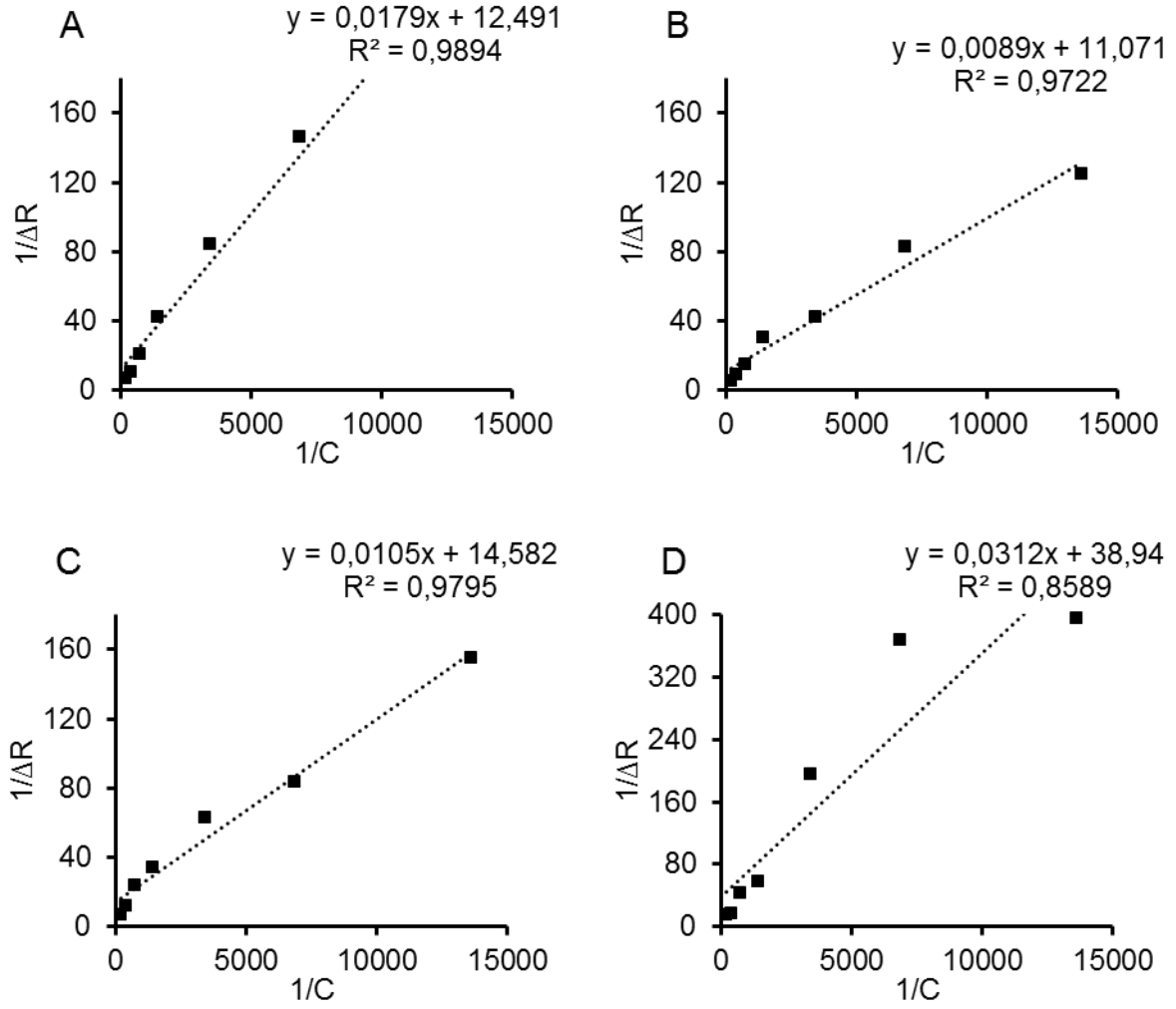
Şekil 4.13. Freundlich izoterm modelinin pH 6.6'da gerçekleştirilen analiz verilerine uygulanmasıyla elde edilen grafikler: PIN1 (A), PIN2 (B), PIN3 (C) ve NIN (D).



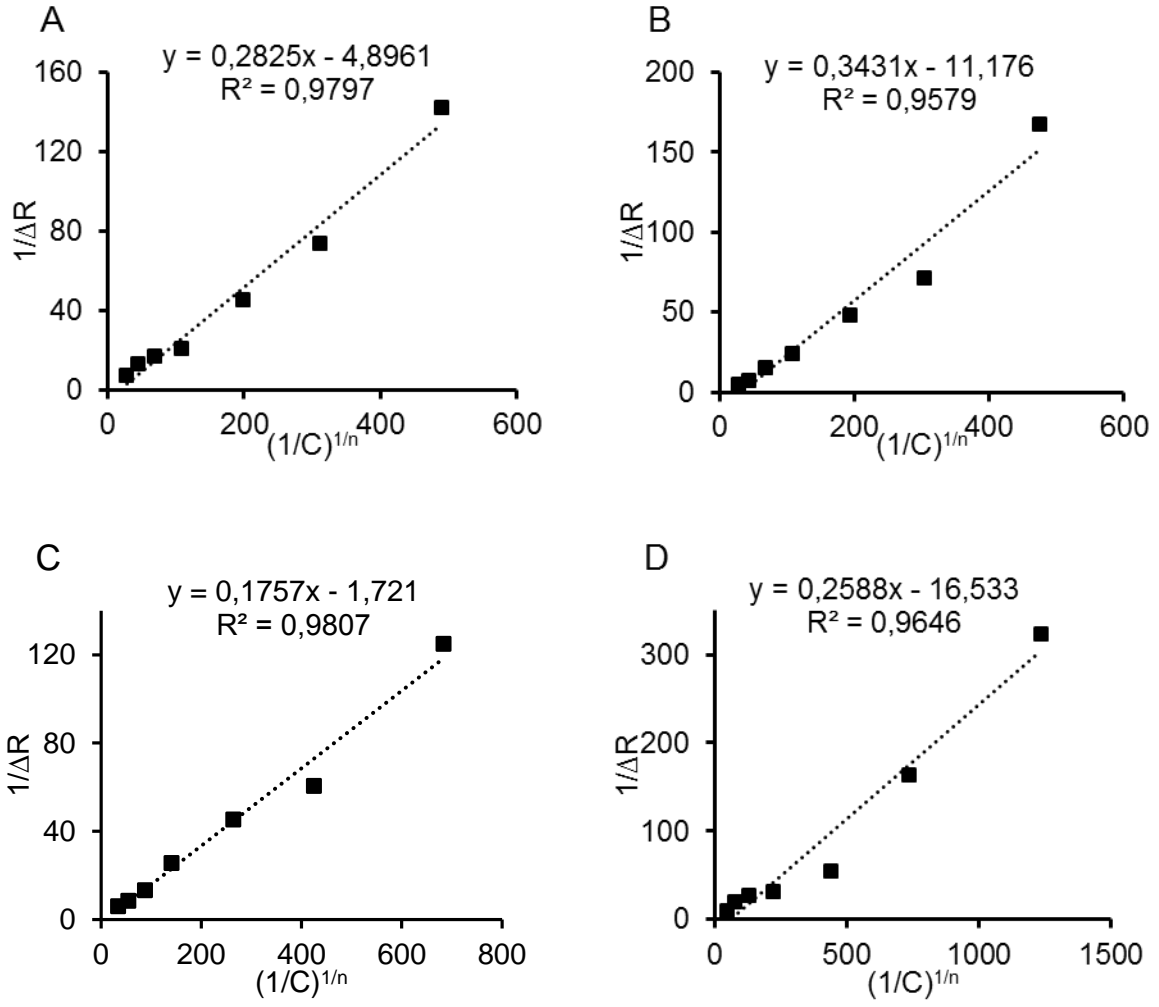
Şekil 4.14. Freundlich izoterm modelinin pH 7.4'de gerçekleştirilen analiz verilerine uygulanmasıyla elde edilen grafikler: PIN1 (A), PIN2 (B), PIN3 (C) ve NIN (D).



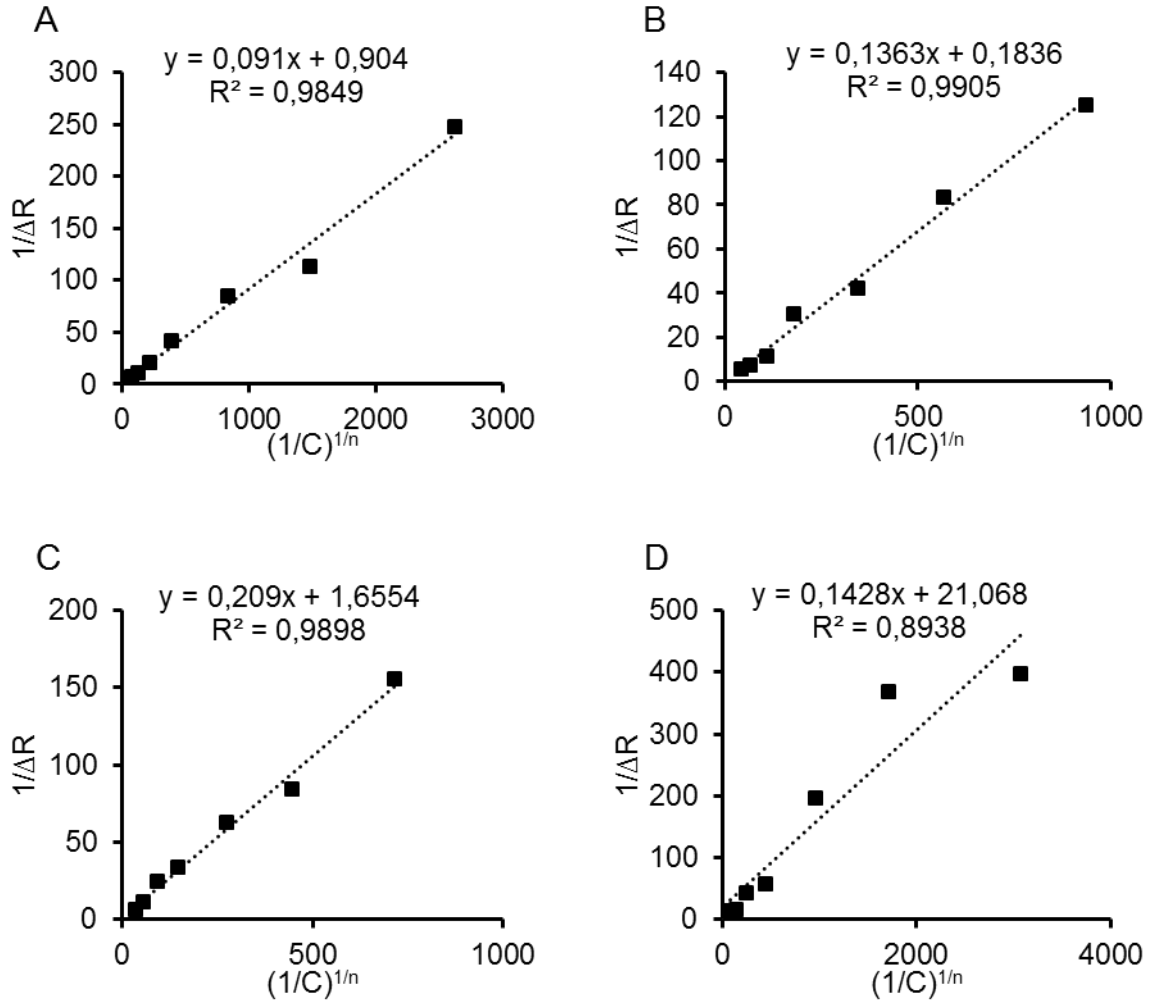
Şekil 4.15. Langmuir izoterm modelinin pH 6.6'da gerçekleştirilen analiz verilerine uygulanmasıyla elde edilen grafikler: PIN1 (A), PIN2 (B), PIN3 (C) ve NIN (D).



Şekil 4.16. Langmuir izoterm modelinin pH 7.4'de gerçekleştirilen analiz verilerine uygulanmasıyla elde edilen grafikler: PIN1 (A), PIN2 (B), PIN3 (C) ve NIN (D).



Şekil 4.17. Langmuir-Freundlich izoterm modelinin pH 6.6'da gerçekleştirilen analiz verilerine uygulanmasıyla elde edilen grafikler: PIN1 (A), PIN2 (B), PIN3 (C) ve NIN (D).



Şekil 4.18. Langmuir-Freundlich izoterm modelinin pH 7.4’de gerçekleştirilen analiz verilerine uygulanmasıyla elde edilen grafikler: PIN1 (A), PIN2 (B), PIN3 (C) ve NIN (D).

Çizelge 4.5. pH 6.6'da elde edilen verilere uygulanan Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich izotermi analizleri.

	Langmuir		Freundlich		Langmuir-Freundlich	
PIN1	ΔR_{\max}	0.084696	ΔR_{\max}	3.9944	ΔR_{\max}	0.204244
	K_d , mM	1357.126	1/n	0.6506	1/n	0.6506
	K_a , L/mM	0.000737	R^2	0.9917	K_d , mM	0.060518
	R^2	0.9863			K_a , L/mM	16.52413
					R^2	0.9797
PIN2	ΔR_{\max}	0.204658	ΔR_{\max}	10.3367	ΔR_{\max}	0.089477
	K_d , mM	421.2241	1/n	0.7671	1/n	0.7671
	K_a , L/mM	0.002374	R^2	0.9923	K_d , mM	0.0307
	R^2	0.9889			K_a , L/mM	32.57359
					R^2	0.9579
PIN3	ΔR_{\max}	0.115966	ΔR_{\max}	6.017669	ΔR_{\max}	0.581058
	K_d , mM	1014.494	1/n	0.6856	1/n	0.6856
	K_a , L/mM	0.000986	R^2	0.9921	K_d , mM	0.102092
	R^2	0.9857			K_a , L/mM	9.795105
					R^2	0.9807
NIN	ΔR_{\max}	0.345018	ΔR_{\max}	5.0703	ΔR_{\max}	0.060485
	K_d , mM	125.4719	1/n	0.7478	1/n	0.7478
	K_a , L/mM	0.00797	R^2	0.9496	K_d , mM	0.015654
	R^2	0.9889			K_a , L/mM	63.88331
					R^2	0.9646

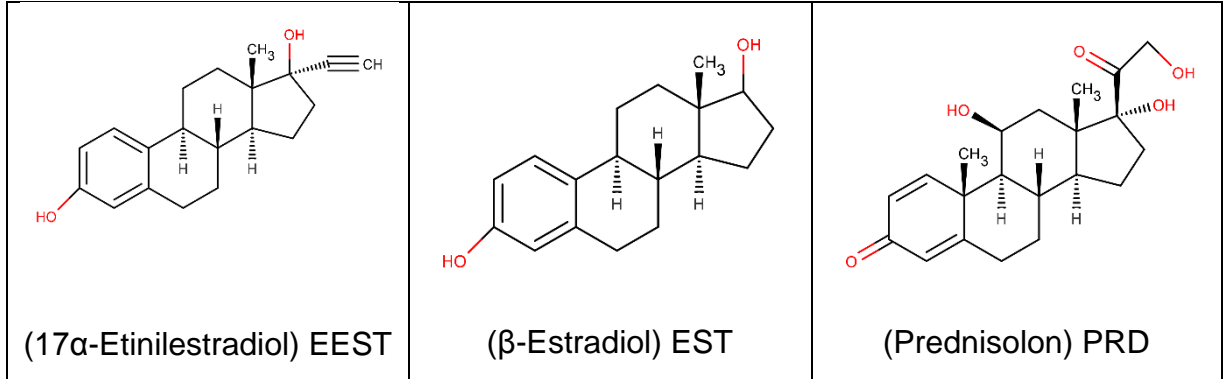
Çizelge 4.6. pH 7.4'de elde edilen verilere uygulanan Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich izotermi analizleri.

	Langmuir		Freundlich		Langmuir-Freundlich	
PIN1	ΔR_{\max}	0.080058	ΔR_{\max}	10.12999	ΔR_{\max}	1.106195
	K_d , mM	697.8212	1/n	0.8267	1/n	0.8267
	K_a , L/mM	0.001433	R^2	0.9965	K_d , mM	0.100664
	R^2	0.9894			K_a , L/mM	9.934066
					R^2	0.9849
PIN2	ΔR_{\max}	0.090326	ΔR_{\max}	7.084434	ΔR_{\max}	5.446623
	K_d , mM	1243.933	1/n	0.7185	1/n	0.7185
	K_a , L/mM	0.000804	R^2	0.9965	K_d , mM	0.742375
	R^2	0.9722			K_a , L/mM	1.347029
					R^2	0.9905
PIN3	ΔR_{\max}	0.068578	ΔR_{\max}	4.608489	ΔR_{\max}	0.604084
	K_d , mM	1388.762	1/n	0.6907	1/n	0.6907
	K_a , L/mM	0.000722	R^2	0.9918	K_d , mM	0.126253
	R^2	0.9795			K_a , L/mM	7.920574
					R^2	0.9898
NIN	ΔR_{\max}	0.025667	ΔR_{\max}	6.0557	ΔR_{\max}	0.047465
	K_d , mM	1248.718	1/n	0.8435	1/n	0.8435
	K_a , L/mM	0.000801	R^2	0.9684	K_d , mM	0.006778
	R^2	0.8589			K_a , L/mM	147.535
					R^2	0.8938

pH 6.6 ve pH 7.4 ortamlarında gerçekleştirilen analiz sonuçlarına uygulanan izoterm modellerinden elde edilen bağlanma sabitleri Çizelge 4.5 ve 4.6'da özetlenmiştir. Her iki çizelgedede Regresyon katsayısı değerleri incelendiğinde nanosensörler ile PRD arasındaki etkileşimi en iyi Freundlich izotermi açıklamaktadır. Freundlich izoterminden hesaplanan en yüksek sinyal değeri (ΔR_{max}) ve yüzey heterojenitesi ($1/n$) PIN1, PIN2, PIN3 ve NIN nanosensörleri için pH 6.6 için sırasıyla 3.99,10.34, 6.02 ve 5.07; 0.65, 0.76, 0.68 ve 0.75; pH 7.4 için ise 10.13, 7.08, 4.61 ve 6.06; 0.83, 0.72, 0.69 ve 0.84 olarak elde edilmiştir. Freundlich izotermi MIP'lerin heterojenitesinin belirlenmesinde sıkça kullanılmaktadır. MIP'lerin bağlama bölgeleri yüksek afiniteye veya yüksek seçiciliğe sahip olma özelliklerinden sadece birine yöneldiklerinden heterojenlik gösterirler. Polimerlerdeki heterojen dağılım MIP'lerin yüksek afiniteli bağlama bölgelerinin fazla olduğunu gösterir. Heterojenite baskılama etkisinin belirlenmesinde mükemmel bir araçtır [321, 322].

4.4. SPR Nanosensörün Yarışmalı Kinetik Veri Analizleri ve Baskılama Seçiciliğinin Belirlenmesi

Nanosensörün PRD'ye karşı seçiciliğinin belirlenmesi için EST ve EEST kullanılarak yarışmalı kinetik veri analizleri yapılmıştır. Şekil 4.19'da gösterildiği üzere EST ve EEST, PRD'ye hem yapısal olarak hem de molekül ağırlıkları bakımından benzemektedir. Ayrıca EST ve EEST'de PRD gibi steroid sınıfında yer almaktadır.



Şekil 4.19. EEST, EST ve PRD'nin kimyasal yapılarının karşılaştırılması

SPR'de yarışmalı kinetik veri analizleri için öncelikle her bir yarışmacı ajan için seçicilik katsayısı (k) aşağıdaki formüle göre hesaplanır.

$$k = \frac{\Delta R_{kalıp}}{\Delta R_{yarışmacı ajan}}$$

Daha sonra her bir yarışmacı ajan için bağıl baskılama sabiti (k') belirlenir. Bunun için öncelikle hem baskılanmış partiküller için hemde baskılanmamış partiküller için seçicilik katsayıları hesaplanır ve aşağıda ifade edildiği gibi bu değerler sırasıyla birbirine oranlanır.

$$k' = \frac{k_{baskılanmış NP}}{k_{baskılanmamış NP}}$$

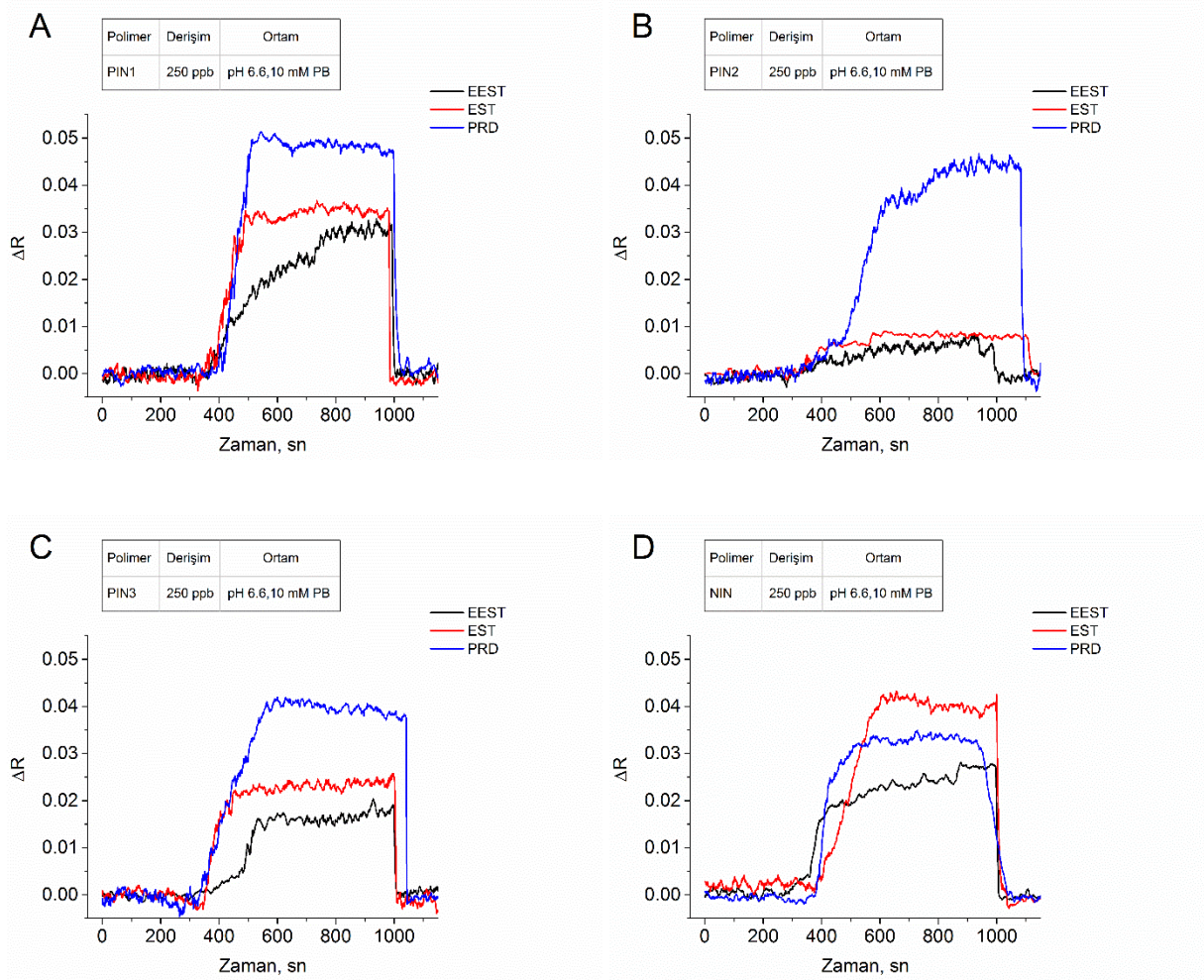
Bu tez kapsamında hazırlanmış olan her bir partikül için yani PIN1, PIN2, PIN3 ve NIN kodlu nanopartiküllerle hazırlanan SPR nanosensörler için pH 6.6'da seçicilik katsayısı ve bağıl baskılama katsayısı Şekil 4.20'de verilen sensogramlar baz alınarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.7 ve Çizelge 4.8).

Çizelge 4.7. pH 6.6'da EEST ve EST için hesaplanan seçicilik katsayıları

Yarışmacı Ajan	k_{PIN1}	k_{PIN2}	k_{PIN3}	k_{NIN}
EEST	1.655	9.00	2.353	1.385
EST	1.371	6.429	1.667	0.818

Çizelge 4.8. pH 6.6'da EEST ve EST için hesaplanan bağıl baskılama katsayıları

Yarışmacı Ajan	$k'_{PIN1/NIN}$	$k'_{PIN2/NIN}$	$k'_{PIN3/NIN}$
EEST	1.195	6.500	1.699
EST	1.676	7.857	2.037



Şekil 4.20. Baskılanmış ve baskılanmamış nanosensörlerin 10 mM pH 6.6 fosfat tamponu varlığında EEST, EST ve PRD'ye karşı yarışmalı kinetik veri sensogramları.

Çizelge 4.7 incelendiğinde pH 6.6'da PIN1 kodlu nanosensörün PRD için seçiciliği EEST ve EST için sırasıyla 1.655 ve 1.371 kat daha yüksektir. PIN2 kodlu nanosensör için bu değerler 9.00 ve 6.429 olarak değişirken PIN3 kodlu sensör için 2.353 ve 1.667 olarak belirlenmiştir. Baskılanmamış sensör olan NIN'da ise bu seçicilik katsayıları sırasıyla 1.385 ve 0.818 olarak hesaplanmış ve baskılanmamış sensörün PRD'ye karşı bir seçiciliğinin olmadığı gösterilmiştir.

Çizelge 4.8'de ise pH 6.6'da hesaplanan bağıl baskılama katsayılarına yer verilmiştir. Bağıl baskılama katsayısı, baskılanmış sensörün baskılanmamış sensöre göre PRD'ye olan seçiciliğini göstermektedir. Bağıl baskılama katsayıları belirlenirken baskılanmış

olan partikülün seçicilik katsayısı yani kalıp moleküle karşı kırılma indisinde oluşturduğu değişikliğin yarışmacı ajanların kırılma indisinde oluşturduğu değişiklik oranı baskılanmamış olan sensörün seçicilik katsayısına oranlanmıştır. Bağlı baskılama katsayı değerleri PIN1, PIN2 ve PIN3 kodlu sensörlerin EEST ve EST'e göre PRD'nu baskılanmamış sensörden sırasıyla 1.195; 6.500 ve 1.699 ve 1.676; 7.857 ve 2.037 kat daha fazla tanıdığını göstermiştir. Seçicilik katsayısı ve bağlı baskılama katsayısı değerleri incelendiğinde pH 6.6'da PRD için PIN2 kodlu sensörün PIN1 ve PIN3 kodlu sensörlere göre daha iyi bir tanıma hafızasına sahip olduğu görülmüştür.

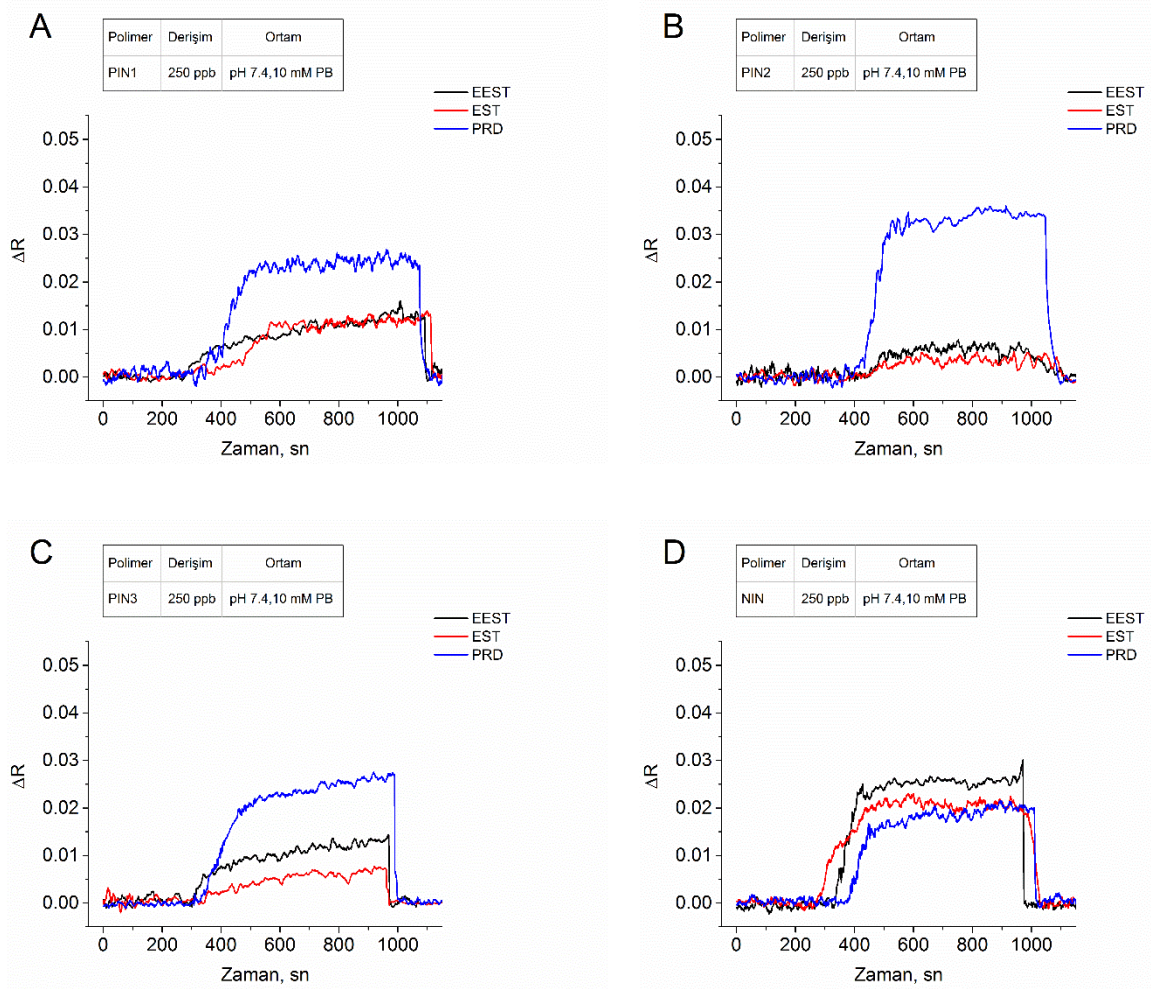
pH 7.4'de PRD, EEST ve EST'nin 0.25 ppm'lik çözeltileri kullanılarak seçicilik çalışmaları tekrar edilmiştir. pH 6.6'da olduğu gibi pH 7.4'de de k (seçicilik katsayısı) ve k' (bağlı baskılama katsayısı) değerleri hesaplanarak Çizelge 4.9 ve 4.10'da gösterilmiştir. Bu verilerin analizi için Şekil 4.21'de gösterilen sensogramlar kullanılmıştır.

Çizelge 4.9. pH 7.4'de EEST ve EST için hesaplanan seçicilik katsayıları

Yarışmacı Ajan	k_{PIN1}	k_{PIN2}	k_{PIN3}	k_{NIN}
EEST	2.167	7.600	1.929	0.720
EST	2.364	12.667	3.857	0.857

Çizelge 4.10. pH 7.4'de EEST ve EST için hesaplanan bağlı baskılama katsayıları

Yarışmacı Ajan	$k'_{PIN1/NIN}$	$k'_{PIN2/NIN}$	$k'_{PIN3/NIN}$
EEST	3.009	10.556	2.679
EST	2.758	14.778	4.500



Şekil 4.21. PIN1, PIN2, PIN3 ve NIN nanosensörlerinin 10 mM pH 7.4 PB'de seçicilik sensogramları.

Çizelge 4.9'da pH 7.4'de yarışmacı ajanlara ve kalıp moleküle karşı PIN1, PIN2, PIN3 ve NIN kodlu nanopartiküllerle hazırlanmış olan sensörlerin seçicilik katsayıları gösterilmiştir. Bu verilere göre PRD, EEST'ye göre PIN1, PIN2, PIN3 ve NIN için sırasıyla 2.167; 7.600; 1.929 ve 0.720 kat daha seçicidir. EST için ise PRD'ye karşı nanosensörler aynı sıralamayla 2.364; 12.667; 3.857 ve 0.857 kat seçicilik göstermiştir. Bu sonuçlara göre pH 7.4'de de PIN2 kodlu nanosensör her iki yarışmacı ajan da baz alındığında PRD'ya karşı PIN1 ve PIN3 kodlu sensörlere göre daha seçicidir.

Çizelge 4.10'da ise bağıl baskılama katsayıları pH 7.4 için gösterilmiştir. Baskılanmış ve baskılanmamış sensörler için elde edilen veriler oranlanarak baskılama verimliliği

hakkında bilgi edinilmiştir. Nanosensörler sırasıyla PRD'yi EEST'ye göre 3.009; 10.556 ve 2.679 kat daha seçici tanırken bu değerler EST için 2.758; 14.778 ve 4.500 kat olarak hesaplanarak spesifik kavitelelerin bütün baskılanmış sensörlerde başarılı bir şekilde oluşturulduğu görülmüştür. Ancak bu değerler kendi içinde kıyaslandığında ise PIN2 kodlu SPR sensörünün diğerlerine göre baskılama verimliliğinin daha yüksek olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

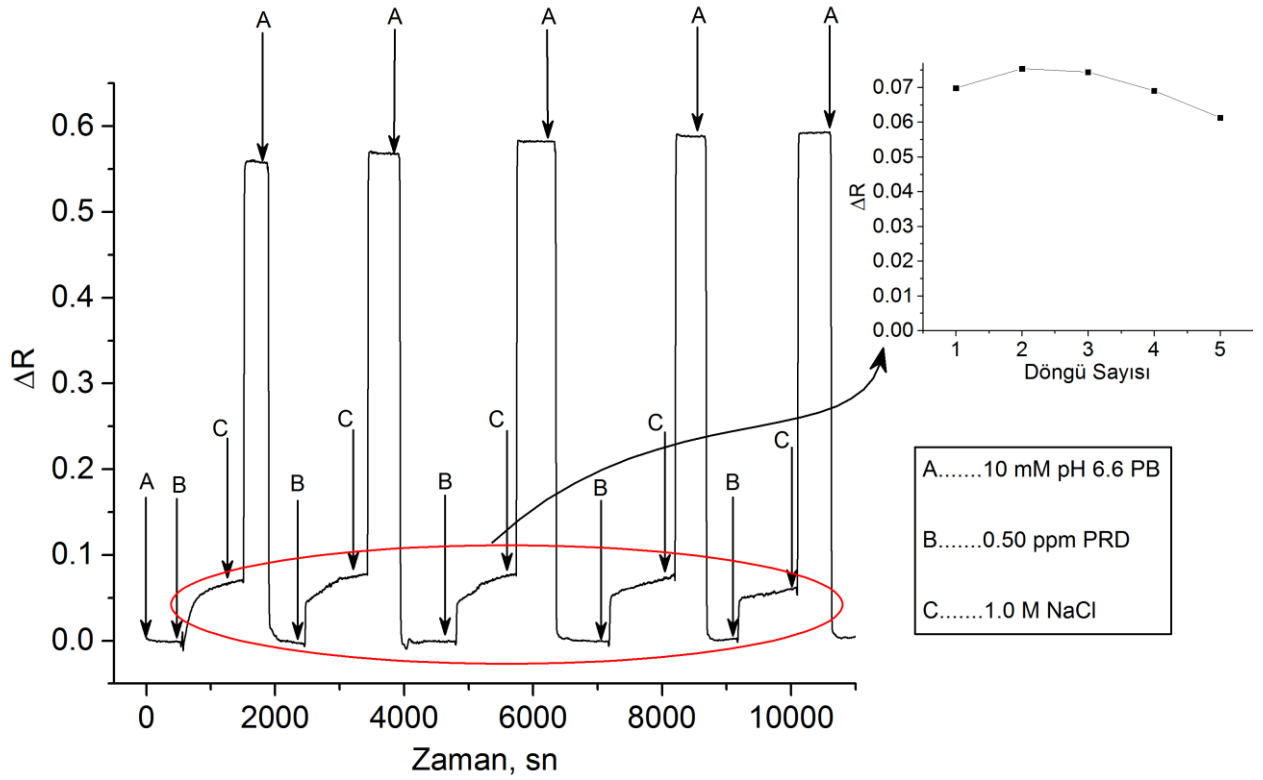
4.5. SPR Nanosensörün Tekrar Kullanılabilirliğinin Belirlenmesi

Biyosensörlerin gerçek uygulamalarda kullanılabilmesi için tekrar kullanılabilir özellikte olmaları en önemli özelliklerindendir. Bu özellik nanosensörler için en çok rağbet gören özelliklerdendir ve endüstride kullanılabilme olasılığını artırır [322].

Tez çalışması için tekrar kullanılabilirlik deneyleri 0.5 ppm PRD'nin sensör sistemine artarda beş kez enjekte edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Bu deneyler için hem seçicilik hem de tayin limiti açısından en iyi sonucu gösteren PIN2 kodlu sensör ve pH 6.6 fosfat tamponu kullanılmıştır. Şekil 4.22'de gösterildiği üzere bu çalışma için ilk olarak dengelem tamponu daha sonra 0.5 ppm'lik PRD çözeltisi ve son olarak da desorpsiyon çözeltisi sisteme tatbik edilmiştir. Aynı işlem beş kere tekrar edilmiş ve elde edilen kırınım indisi şeklinde gösterilmiştir. Daha sonra yüzde bağıl standart sapma (% RSD) değeri hesaplanmıştır.

$$\%RSD = \frac{\Delta R_{ort}}{\Delta R_{max}} \times 100$$

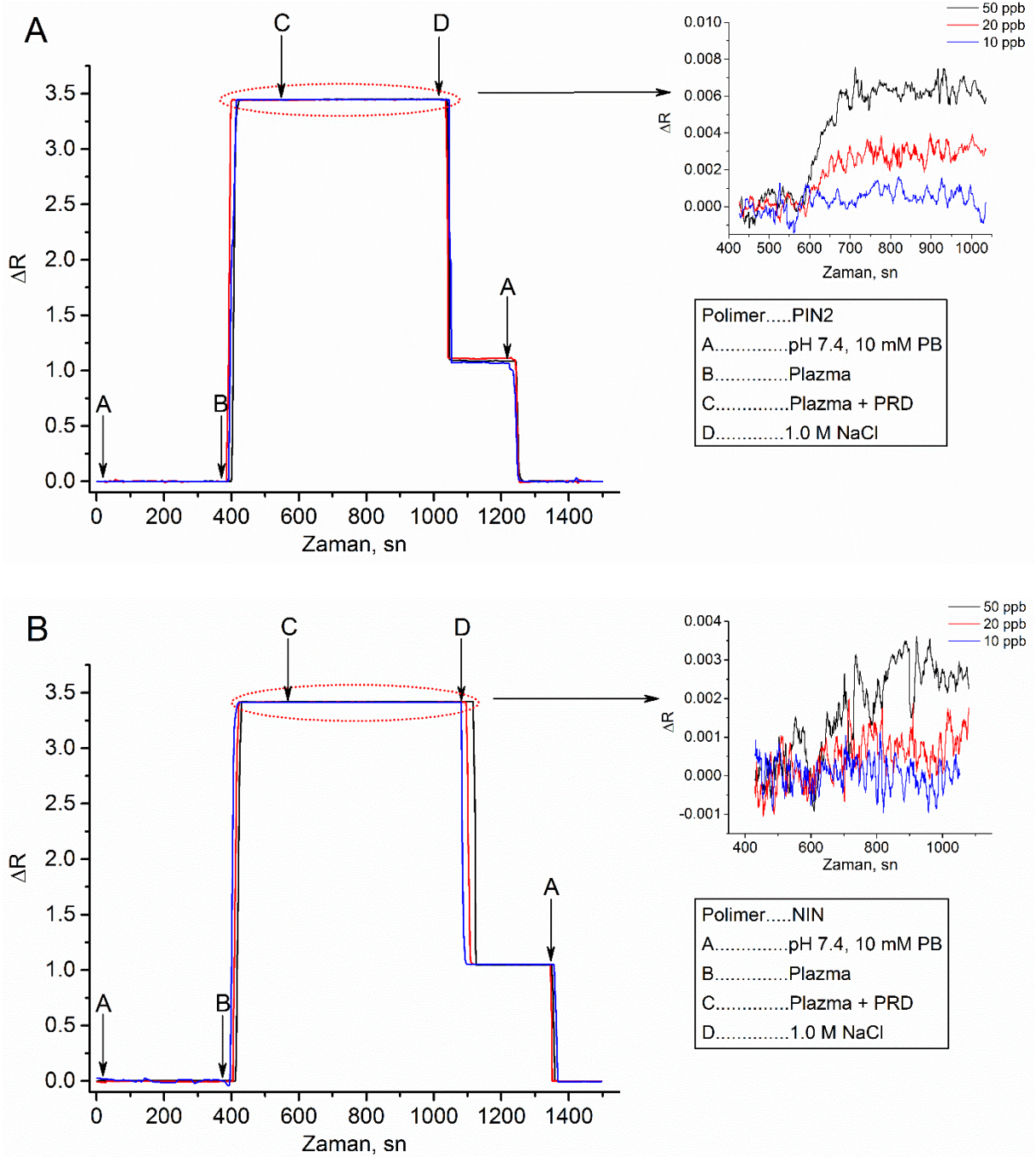
Formülde ifade edildiği gibi aynı derişim için elde edilen kırılma indisleri izlenmiş ve beş ölçümün ortalaması alınmıştır (ΔR_{ort}) ve bu değer aynı derişimde kırılma indisinde en yüksek değışiklik değerine (ΔR_{max}) oranlanmıştır. Elde edilen sonuç yüzde olarak ifade edilerek beş kullanımdan sonra bile sensörün % 92.8 verimlilikle aynı sonucu gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkılarak sensörün tekrar kullanılabilirliğinin yüksek olduğu ve endüstriyel uygulamalarda kullanılmaya aday olabileceği varsayımını düşündürmüştür.



Şekil 4.22. SPR nanosensörün tekrar kullanılabilirlik sensogramı.

4.6. Doğal Kaynak ile Kinetik Veri Analizleri

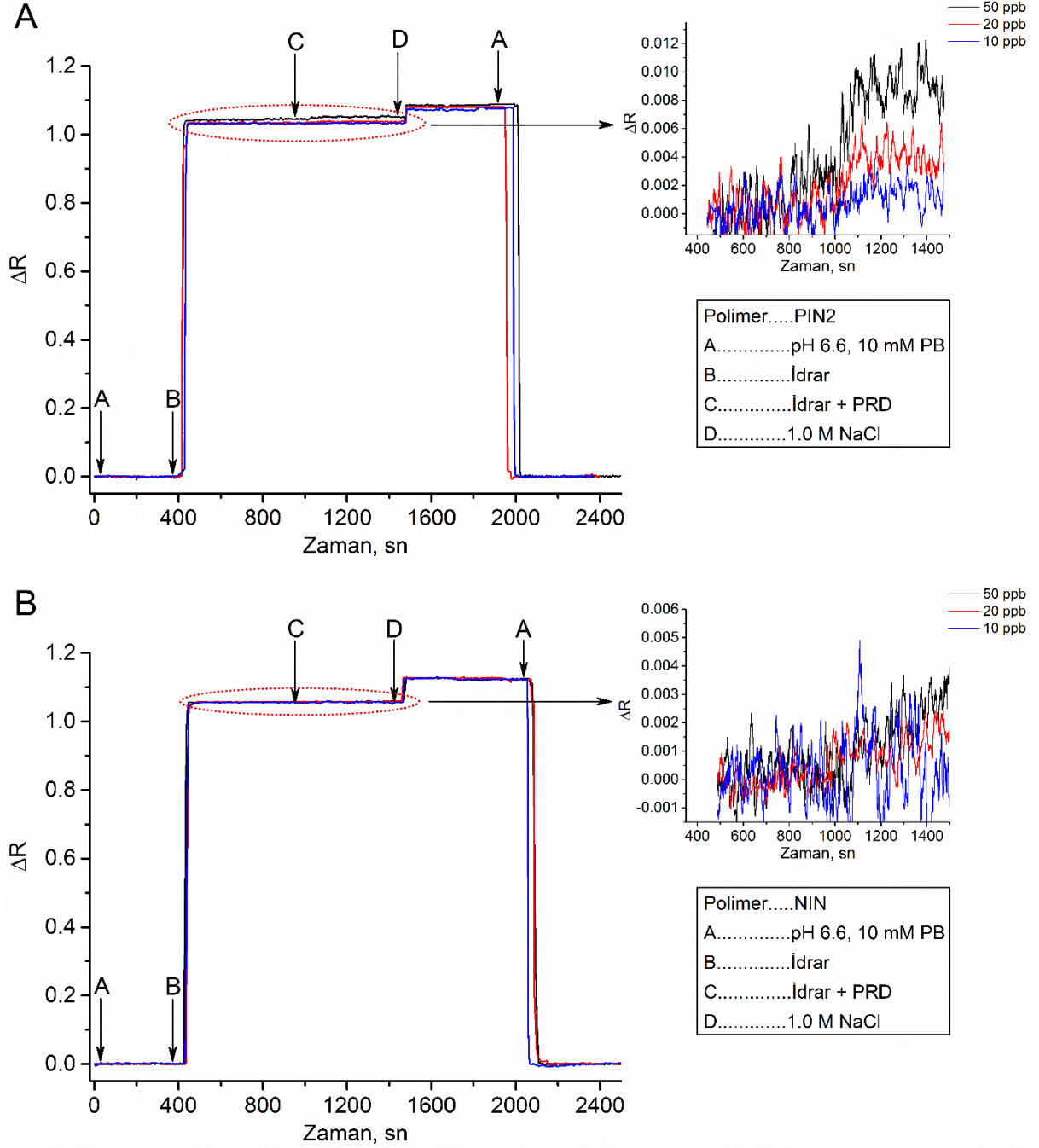
SPR nanosensörün doğal kaynaklarda verdiği yanıtın incelenmesi için ilk olarak yapay plazma örneği ile çalışılmıştır. Şekil 4.23'de gösterildiği üzere sisteme ilk olarak dengeleme tamponu verilmiştir. Daha sonra plazma örneği verilmiştir ve kırılma indisindeki değişiklik gözlenmiştir. Bu değişiklik ortamın yoğunluğunda meydana gelen değişiklikten kaynaklanmaktadır. Sistem dengeye geldikten sonra 10 ppb, 20 ppb ve 50 ppb PRD içeren plazma örnekleri sisteme tatbik edilmiştir. Kırılma indisindeki değişiklik grafikten de görüldüğü gibi artan kalıp molekül derişimiyle artmıştır (Şekil 4.23-A). Son olarak sisteme desorpsiyon çözeltisi olan 1 M NaCl ile bağlanan kalıp moleküller ayrılmıştır. Desorpsiyon çözeltisinin yoğunluğu daha düşük olduğundan normalin aksine sinyalde azalma gözlenmiştir. Ayrıca Şekil 4.23-B'de baskılanmamış partiküllerle hazırlanan NIN kodlu sensörün plazma örneğine verdiği yanıt gösterilmiştir. Uygulanan işlem aynı koşullarda olmasına rağmen herhangi kayda değer ve anlamlı bir yanıt alınamamıştır.



Şekil 4.23. PIN2 ve NIN nanosensörlerinin farklı derişimlerde PRD içeren (10, 20 ve 50 ppb) yapay plazma çözeltilerinin sensogramları.

Diğer bir vücut sıvısı olan idrar PRD tayini için en sık kullanılan örnektir. Bu nedenle yapay idrar çözeltisi içerisine farklı derişimlerde PRD çözülmüştür. Ancak bu çalışmada plazma ile çalışılırken kullanılan pH 7.4 tamponu yerine idrar pH'ına daha yakın bir pH

olan 6.6 ile çalışılmıştır. İşlem yapay plazma örneği ile aynı yöntem takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada da en iyi sonuçlar PIN2 kodlu sensörle alındığından aynı SPR sensörle çalışılmıştır. Şekil 4.24'de hem baskılanmamış hemde baskılanmış olan sensörün PRD varlığında kırılma indisinde meydana gelen değişiklik gösterilmiştir. Sensogramlardan da görüleceği üzere baskılanmamış sensörün yanıtı tayin için anlamlı bir fark oluşturmazken baskılanmış sensörde PRD tayini oldukça başarılı bir şekilde tayin limiti olan 30 ppb'nin altında ve üstünde belirlenmiştir.



Şekil 4.24. Baskılanmış (PIN2) (A) ve baskılanmamış (NIN) (B) optik sensörün idrar örneğinde PRD tayin yanıtı.

Çizelge 4.11’de literatürde şimdiye kadar PRD tayini için kullanılan yöntemlerin tayin aralıkları, tayin limitleri ve doğal kaynak analizi için kullandıkları çözeltileri gösterilmiştir. Çizelgede de gösterildiği gibi hazırladığımız sensör yüksek performanslı sıvı

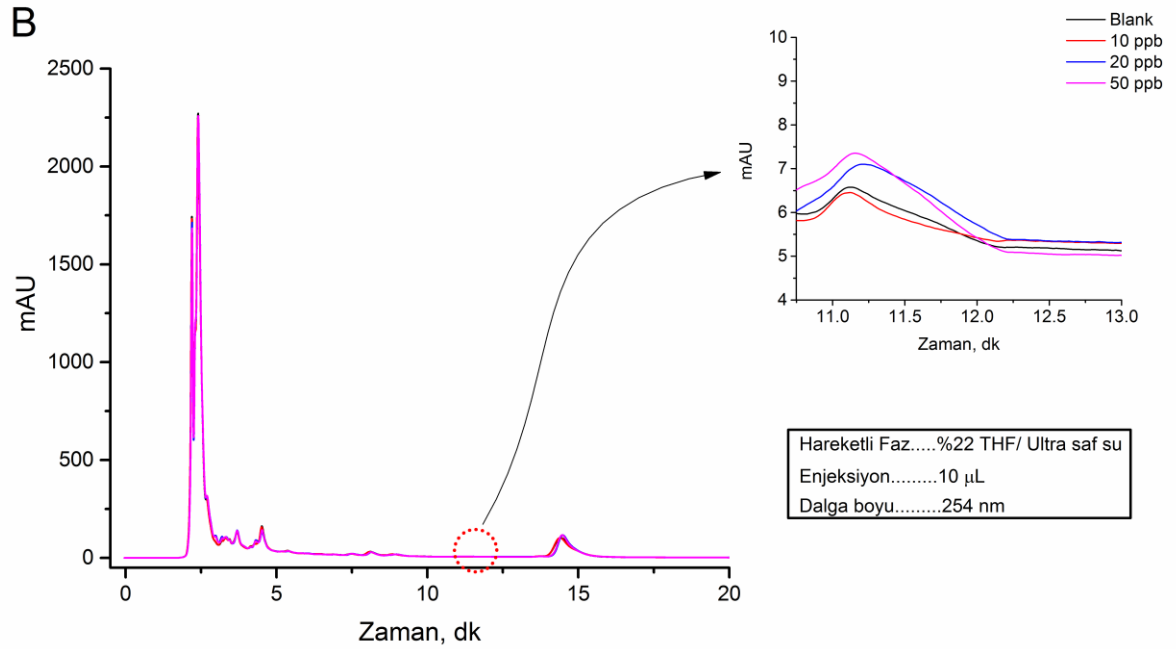
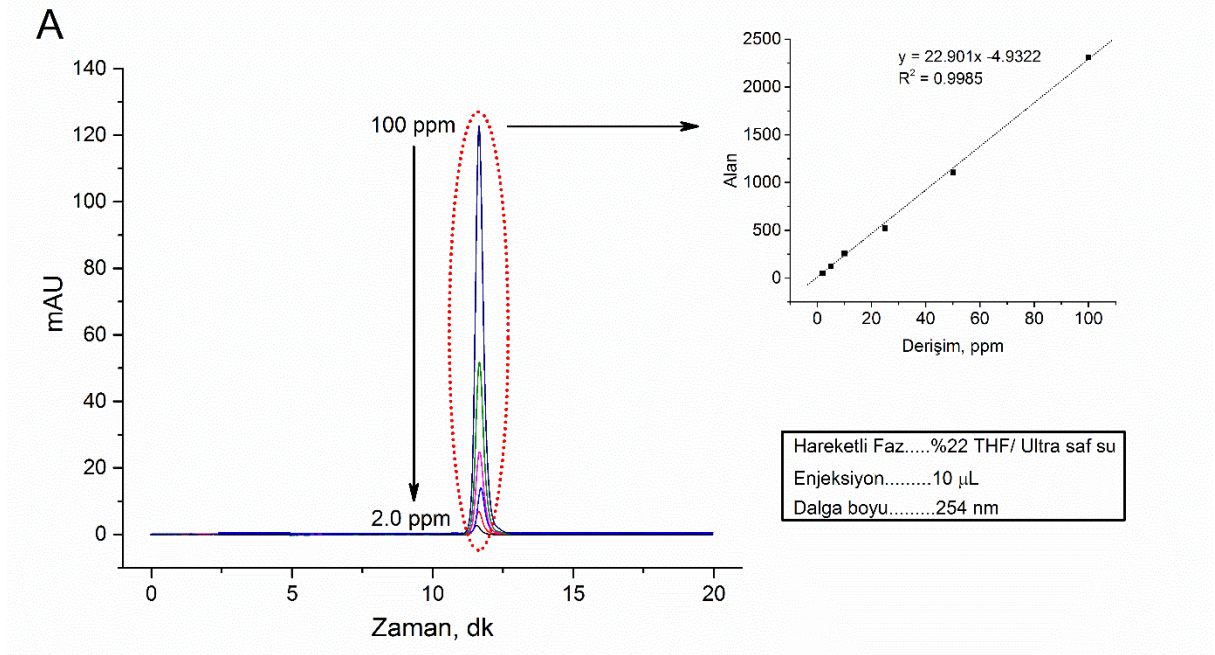
kromatografisi–kütle spektroskopisi (HPLC-MS) tandem sistemleriyle bile karşılaştırılabilir nitelikte olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.11. Literatürde PRD tayinine yönelik kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması.

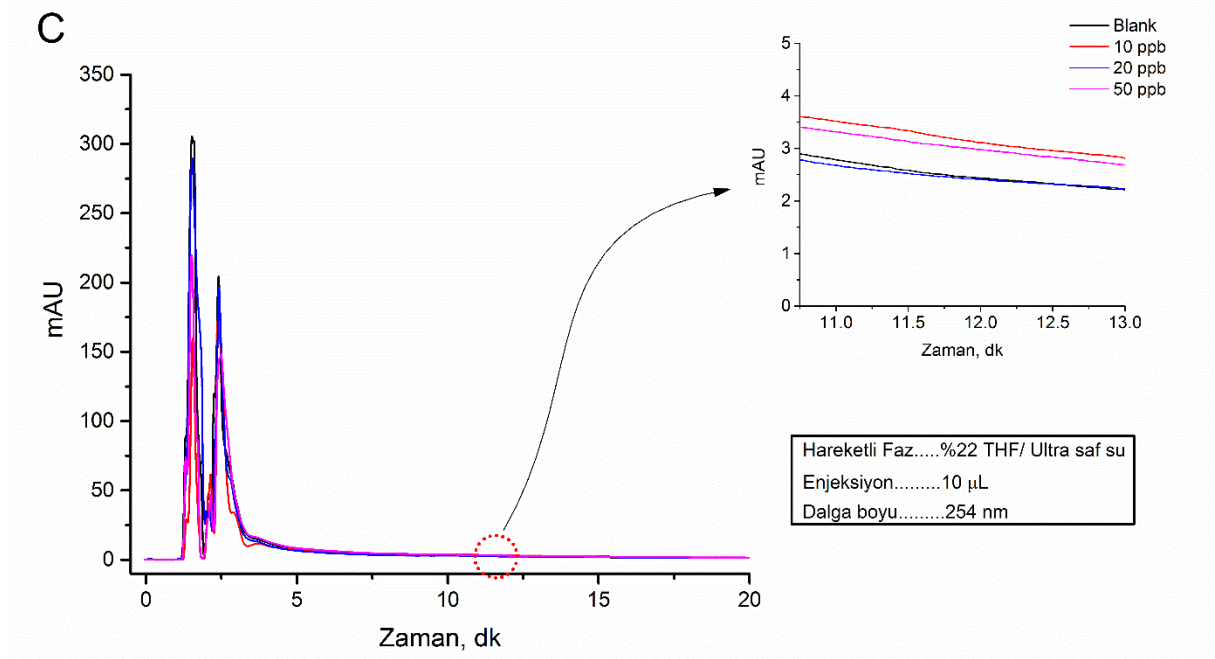
Kullanılan Yöntem	Tayin Aralığı	Tayin Limiti	Çalışılan Doğal Örnekler	Çalışma
HPLC-MS ³	1.01 - 4.08 ng/mL	0.5 ng/mL	İdrar	[323]
HPLC-MS ³	1 - 200 ng/mL	10 pg/mL	İdrar	[269]
Voltametik Analiz	3.604 - 36040 ng/mL	32.44 pg/mL	İdrar ve Plazma	[324]
HPLC-DAD	50 - 450 ng/mL	1.0 ng/mL	İdrar ve Plazma	[325]
LC	25 - 600 ng/mL	4.8 ng/mL	İdrar ve Plazma	[293]
LC-MS/MS	10.7 - 398 ng/mL	225 pg/mL	Plazma	[326]
MS/MS	4.8 - 400 ng/mL	-----	Plazma	[327]
HPLC	2 - 300 µg/mL	-----	Doğal örneklerle çalışılmamıştır	[294]
HPLC	100 - 1500 ng/mL	-----	Plazma, Tam kan ve idrar	[328]
HPLC	40 - 160 µg/mL	0.175 µg/mL	Doğal örneklerle çalışılmamıştır	[329]
SPE	4.2 - 10 µg/mL	0.250 µg/mL	Doğal örneklerle çalışılmamıştır	[330]
HPLC	20 - 100 µg/mL	-----	Doğal örneklerle çalışılmamıştır	[331]
UV	6 - 20 µg/mL	-----	Doğal örneklerle çalışılmamıştır	[331]
HPLC	5.01 - 1002 µg/mL	2.10 µg/mL	Plazma	[332]
Floresan Spektrofotometre	0.5 - 2.7 µg/mL	6.0 ng/mL	Doğal örneklerle çalışılmamıştır	[333]
RP-HPLC	2 - 1000 ng/mL	5.9 ng/mL	Plazma	[334]
MIP-SPR Nanosensör	25-2000 ng/mL	5.1 ng/mL	İdrar ve Plazma	Bu çalışma

4.7. Yüzey Plazmon Rezonans Sisteminin Validasyonu

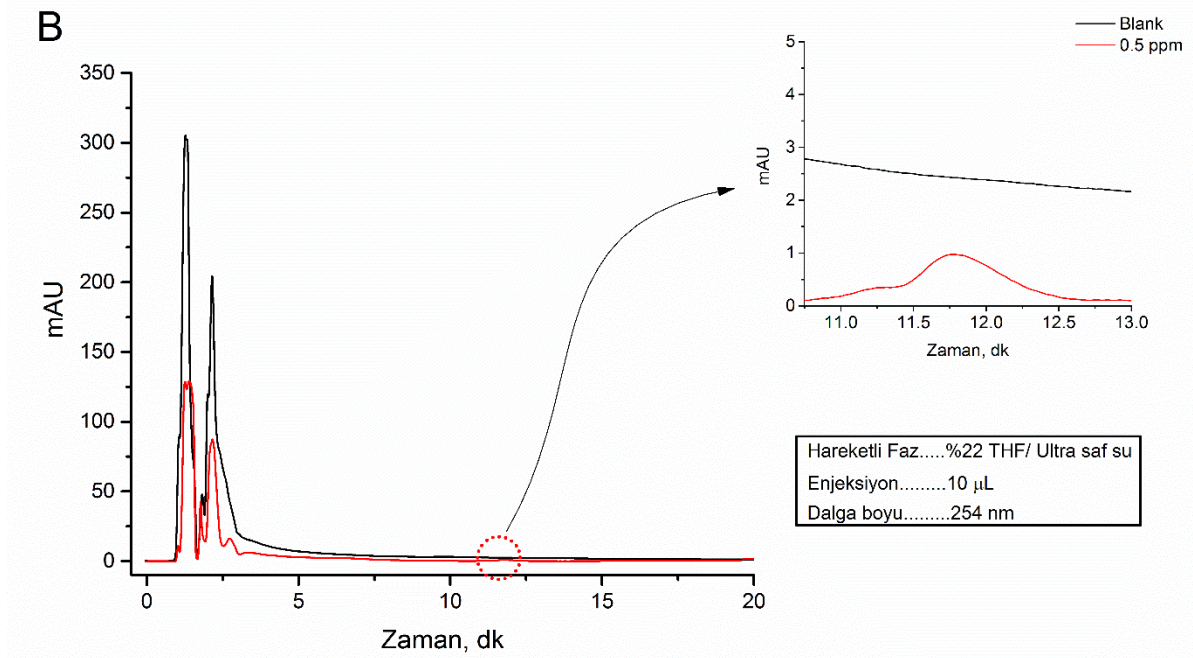
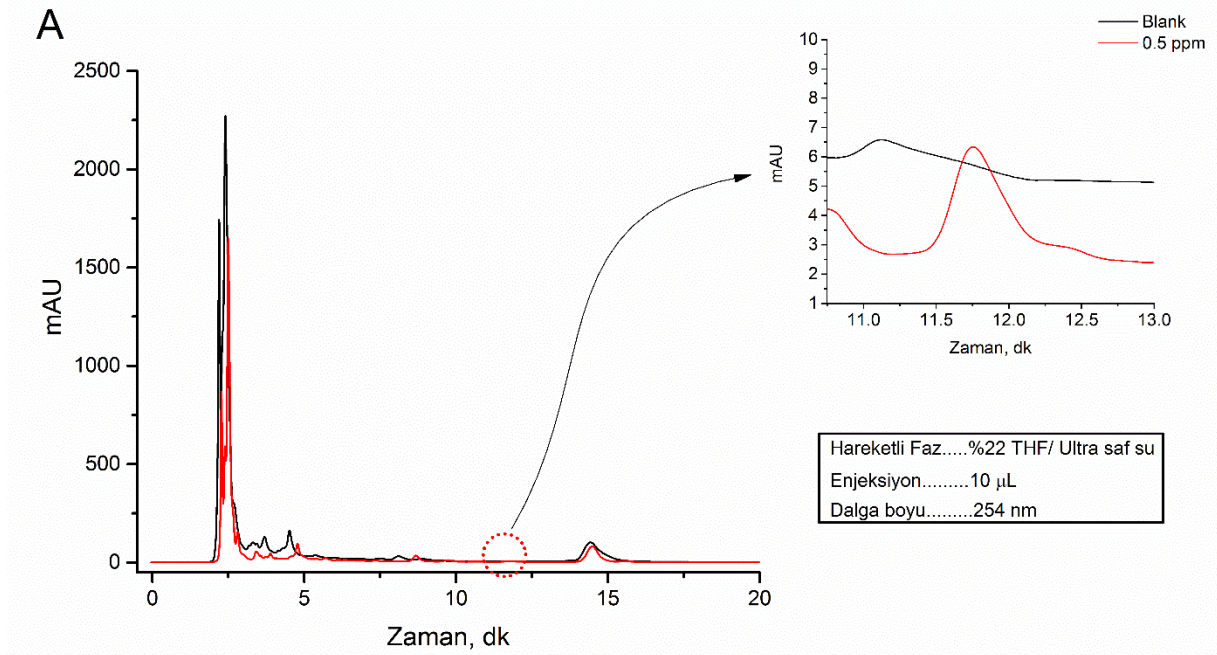
Vücut sıvılarından prednisolon tayini için geliştirilen nanosensör sisteminin doğruluğunun belirlenebilmesi için HPLC yöntemi kullanılmıştır. Hazırlanan prednisolon içeren yapay plazma ve idrar örnekleri nanosensör sisteminde analiz edildikten sonra aynı örnekler HPLC sisteminde incelenmiştir. Örneklerin HPLC sisteminde incelenmesinde prednisolon için valide edilmiş yöntem kullanılmıştır. HPLC sisteminde alıkonma süresinin belirlenmesi ve kalibrasyon grafiğinin oluşturulması için farklı derişimlerde (2-100 ppm) PRD içeren örnekler hareketli faz içerisinde çözülerek hazırlanmış ve British Pharmacopoeia'da belirtilen yöntemle sisteme verilmiştir. Prednisolon için alıkonma süresi 11.75 dk olarak belirlenmiş ve kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur (Şekil 4.25 (A)). Oluşturulan kalibrasyon grafiğinden LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.30 ppm ve 1.00 ppm olarak belirlenmiştir. Elde edilen LOD ve LOQ değerleri literatürle uyumludur. PRD için alıkonma süresinin belirlenmesinin ardından 10 ppb, 20 ppb ve 50 ppb içeren yapay plazma ve idrar örnekleri HPLC sistemine verilmiştir. Elde edilen kromatogramlar Şekil 4.25 (A ve B)'de verilmiştir. HPLC sistemi için LOD (0.30 ppm) değerinin bu derişim değerlerinden büyük olması sebebiyle LOD değerinin altında HPLC sistemi PRD tayini için uygun değildir ve Şekil 4.25'de görüldüğü gibi 10 ppb, 20 ppb ve 50 ppb PRD içeren örneklerin kromatogramlarının 11.75 dk'sında (PRD alıkonma süresi) pik gözlemlenememiştir. 2000 ppb PRD içeren yapay plazma ve idrar örnekleri sisteme verilmiş ve elde edilen kromatogramlar ve sensogram Şekil 4.26'da verilmiştir. Yapay plazma ve idrar örneklerinin HPLC ve nanosensör sonuçları Çizelge 4.12'de özetlenmiştir.



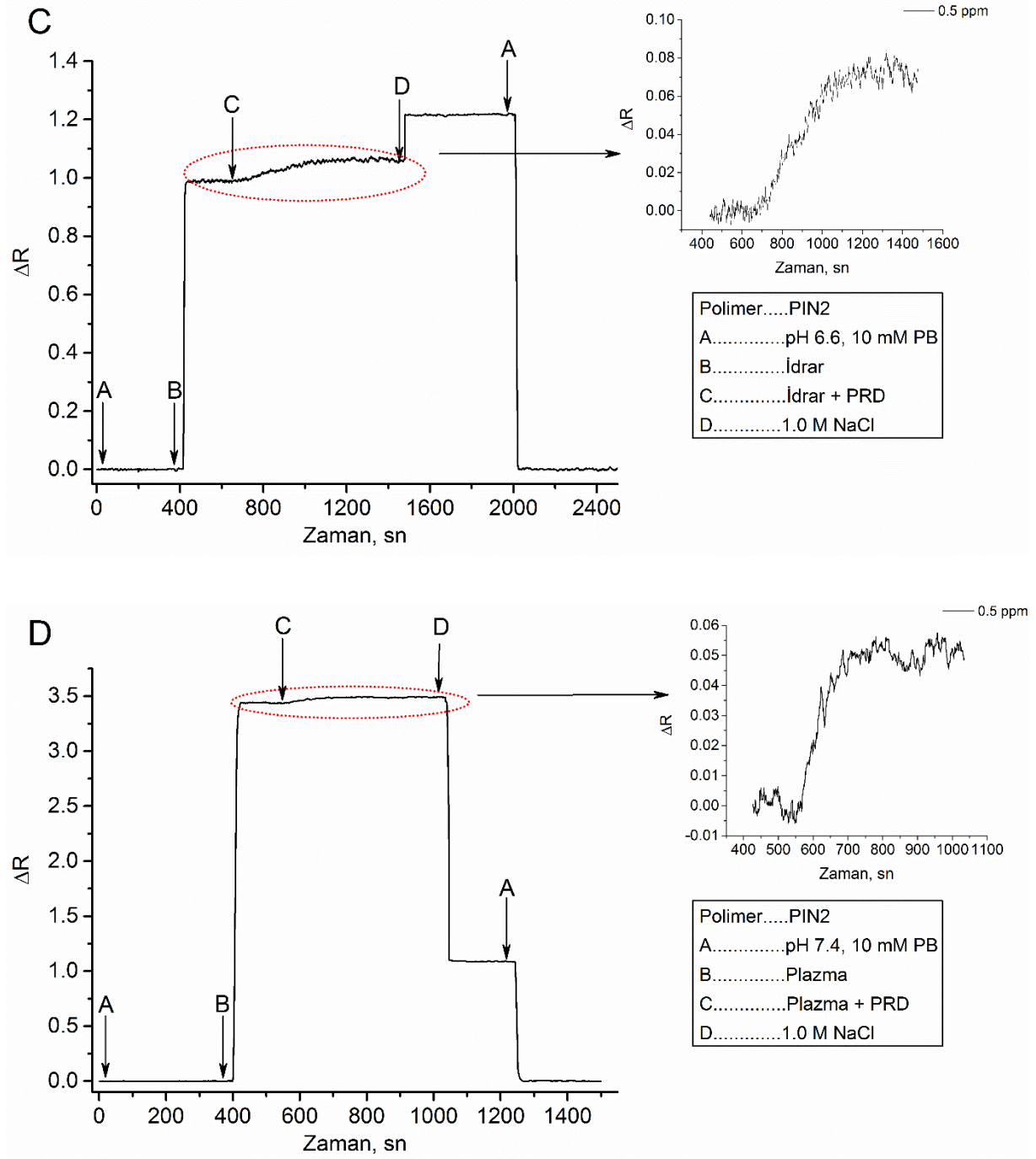
Şekil 4.25. HPLC Analizi: (A) 2.0 ppm-100 ppm PRD içeren örneklerin; (B) 10 ppb, 20 ppb ve 50 ppb PRD içeren yapay idrar örneklerinin; (C) 10 ppb, 20 ppb ve 50 ppb PRD içeren yapay plazma örneklerinin kromatogramları.



Şekil 4.25. HPLC Analizi: (A) 2.0 ppm-100 ppm PRD içeren örneklerin; (B) 10 ppb, 20 ppb ve 50 ppb PRD içeren yapay idrar örneklerinin; (C) 10 ppb, 20 ppb ve 50 ppb PRD içeren yapay plazma örneklerinin kromatogramları (Devamı).



Şekil 4.26. Yapay idrar ve yapay plazma örneklerinin HPLC kromatogramları (A-B) ve sensogramları (C-D).



Şekil 4.26. Yapay idrar ve yapay plazma örneklerinin HPLC kromatogramları (A-B) ve sensogramları (C-D) (Devamı).

Çizelge 4.12. Yapay plazma ve yapay idrar örneklerinin HPLC ve SPR analizleri.

Yöntem	Ortam	Derişim, ppm	Belirlenen derişim, ppm	Geri kazanım, %
HPLC	Yapay idrar	Blank	-	0
		0.01	-	0
		0.02	-	0
		0.05	-	0
		0.5	0.490 ± 0.0180	98 ± 3.6
	Yapay plazma	Blank	-	0
		0.01	-	0
		0.02	-	0
		0.05	-	0
		0.5	0.470 ± 0.0240	94 ± 4.8
SPR PIN2 Nanosensör	Yapay idrar	Blank	-	-
		0.01	0.009 ± 0.0008	90 ± 8.0
		0.02	0.022 ± 0.0017	107 ± 8.5
		0.05	0.054 ± 0.0015	108 ± 3.0
		0.5	0.470 ± 0.0019	94 ± 3.8
	Yapay plazma	Blank	-	0
		0.01	0.009 ± 0.0011	90 ± 11.0
		0.02	0.021 ± 0.0011	105 ± 5.5
		0.05	0.056 ± 0.0014	112 ± 2.8
		0.5	0.490 ± 0.0025	98 ± 5.0

Çizelge 4.12 incelendiğinde geliştirilen PRD baskılanmış nanosensörün vücut sıvılarından PRD tayin limitinin HPLC'den daha düşük olduğu ve yüksek derişimlerde ise geri kazanım değerlerinin karşılaştırılabilir olduğu sonucuna varılmıştır.

5. YORUM

Bu tez çalışması kapsamında sıkça kullanılan bir glukokortikosteroid Prednisolonun tayinine yönelik optik temelli sensörler geliştirilmiştir. Prednisolonun özellikle doping olarak kullanılması durumu söz konusu olduğundan ve plazmada yarılanma ömrü 3 saat olduğundan hızlı ve seçici bir şekilde tayini oldukça önemlidir. Bu nedenle seçicilik için moleküler baskılama teknolojisine; hızlı ve portatif bir yöntemin geliştirilmesi için ise yüzey plazmon rezonans sistemine başvurulmuştur. Bu nedenle ilk olarak üç farklı oranda baskılanmış partikül hazırlanmıştır. Aynı zamanda spesifik olmayan bağlanmaların etkisini göstermek için baskılanmamış partikülde hazırlanmıştır. Partiküllerin hazırlanması için iki fazlı mini-emülsiyon polimerizasyonu kullanılmıştır ve sulu faz tüm yapılar için aynı iken organik fazda sadece kullanılan kalıp molekülün miktarında değişiklik yapılmıştır. Bütün partiküllerin SPR çip sensörü yüzeyine tanıma aracı olarak yerleştirilmesinden önce boyut analizleri iki farklı metolla gerçekleştirilmiştir. SPR'de kullanılabilmesi için bu partiküllerin 200 nm'nin aşağısında olmaları gerekiyordu ve PIN1, PIN2, PIN3 ve NIN kodlu partiküllerin Zeta-sizer ile belirlenen boyutları sırasıyla 44.65 nm, 47.56 nm, 46.49 nm ve 41.62 nm olarak ölçülürken bu değerlerin STEM boyut analizi ölçümlerinde belirlenen ortalama 45 nm'lik değerle uyum içinde olduğu görülmüştür. Ayrıca fonksiyonel monomerin yapıya girdiğinin belirlenmeside oldukça önemlidir. Bu nedenle yapısal karakterizasyon için elemental analiz ve FTIR sonuçlarına başvurulmuştur. Bu analizlerde yapıların birbirinin neredeyse aynı olduğu görülmüştür organik fazın aynı olması ve elde edilen ürünün aynı olması durumu söz konusu olduğundan bu sonuçlar beklenenle uyum göstermiştir. Ayrıca 3360 cm⁻¹ civarında görülen N-H gerilme bantları ve 1630 cm⁻¹ civarında görülen N-H bükülme bantları vinil imidazolün yapıya girdiğinin göstergesidir. Partiküllerin istenilen şekilde hazırlanıldığından emin olunduktan sonra altın çip yüzeyine farklı yöntemlerle tutturulmuştur ve karakterizasyonu için elipsometre ve temas açısı ölçümlerine yer verilmiştir. Elipsometre ile yapılan yüzey ölçümlerinde partiküllerin yüzeye tutturulduğu ve yüzey topolojisinde 100 nm'lik bir değişiklik oluşturduğu belirlenmiştir. Temas açısı ölçümleri ile yüzeyin su tutucu özelliğinin nasıl değiştiği gösterilmiştir. Boş çip için elde edilen değerler ile partikül tutturulduktan sonra elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında temas açısında 25°'lik bir azalma gözlenmiş ve

bu yüzeyin hidrofilitésinin arttığını göstermektedir. Hazırlanan partikülün hidrofilik karakteri fonksiyonel monomerden kaynaklanmakta olduğundan bu sonuç olasıdır. Karakterizasyon işlemlerinden sonra kinetik analizlere geçilmiştir. Kinetik analizler için iki farklı pH'da tampon tercih edilmiştir. Bunlardan biri kanın ortalama pH'ına yakın olan pH 7.4 diğeri ise prednisolonun tayini için en sık kullanılan vücut sıvısı olan idrarın ortalama pH'ı olan pH 6.6'dır. Kinetik veri analizleri için PIN1, PIN2, PIN3 ve NIN kodlu sensörler 2 ppm'den 0.025 ppm aralığında PRD ile SPR yardımıyla etkileştirilmiştir. Her bir sensör için elde edilen tayin limiti sırasıyla pH 6.6 için 5.1 ppb, 5.5 ppb, 6.9 ppb ve 7.4 ppb iken bu değerler pH 7.4 için 10.7 ppb, 8.9 ppb, 13.7 ppb ve 12.1 ppb olarak bulunmuştur. Ayrıca tayin alt sınırları da pH 6.6 için 16.9 ppb, 18.2 ppb, 23.1 ppb ve 24.2 ppb hesaplanmıştır. pH 7.4 için ise belirlenen tayin alt sınırları sırasıyla 35.5 ppb, 29.7 ppb, 45.5 ppb ve 40.2 ppb'dir. Elde edilen sonuçlara göre PIN2 kodlu sensör pH 6.6'da en iyi yanıtı göstermiştir. Ayrıca bu sonuçlar literatürdeki çalışmalarla kıyaslandığında yeni geliştirdiğimiz bu yöntemin HPLC-MS gibi zahmetli, zaman alıcı, operatör gerektiren ve pahalı yöntemlerle bile kıyaslanabilmektedir. Elde edilen veriler izoterm modellerine uygulanmıştır ve sensörlerin en çok Freundlich modeline uyum sağladığı gözlenmiştir. Yarışmacı ajanlarla sensörlerin seçiciliği de kanıtlanmıştır. Elde edilen sensörler pH 6.6'da PRD'yi EEST'ye göre sırasıyla 1.195; 6.500 ve 1.699 kat daha seçici tanırken, bu değerler EST için 1.676; 7.857 ve 2.037 olarak değişmiştir. pH 7.4'de ise bu değerler sırasıyla 3.009; 10.556; 2.679 ve 2.758; 14.778; 4.500 olarak değişmiştir. Ayrıca hazırlanmış sensörün tekrar kullanılabilirliği denenmiş ve beş denemeden sonra bile sensörün % 92.8 verimle yanıt verdiği belirlenmiştir. Doğal kaynaklardan analizin gerçekleştirilmesi için yapay plazma ve yapay idrar çözeltileri kullanılmıştır. En iyi sonuçlar PIN2 kodlu sensörle alındığından bu çalışmalar için tercih edilmiştir. 10 ppb, 20 ppb ve 50 ppb PRD örneği plazma ve idrar içerisinde başarılı bir şekilde tayin edilmiştir. Son olarak HPLC ile sistemin validasyonu gerçekleştirilmiştir. Öncelikle standart prosedür ile kalibrasyon grafiği elde edilmiş ve SPR sensöre verilen çözelti HPLC'ye tatbik edildikten sonra elde edilen pikin alanı kalibrasyon grafiğinden elde edilen formülle derişime çevirilmiştir. Sonuçta sensörün HPLC ile oldukça iyi bir uyum içerisinde olduğu görülmüştür.

KAYNAKLAR

- [1] M. J. Whitcombe, N. Kirsch, and I. A. Nicholls, "Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years 2004–2011," *Journal of Molecular Recognition*, vol. 27, pp. 297-401, 2014.
- [2] J. E. Lofgreen and G. A. Ozin, "Controlling morphology and porosity to improve performance of molecularly imprinted sol–gel silica," *Chemical Society Reviews*, vol. 43, pp. 911-933, 2014.
- [3] C. Alexander, H. S. Andersson, L. I. Andersson, R. J. Ansell, N. Kirsch, I. A. Nicholls, *et al.*, "Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003," *Journal of molecular recognition*, vol. 19, pp. 106-180, 2006.
- [4] J. K. Fink, *Polymeric sensors and actuators*: John Wiley & Sons, 2012.
- [5] L. Chen, X. Wang, W. Lu, X. Wu, and J. Li, "Molecular imprinting: perspectives and applications," *Chemical Society Reviews*, vol. 45, pp. 2137-2211, 2016.
- [6] H. Qiu, L. Fan, X. Li, L. Li, M. Sun, and C. Luo, "A microflow chemiluminescence sensor for indirect determination of dibutyl phthalate by hydrolyzing based on biological recognition materials," *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, vol. 75, pp. 123-129, 2013.
- [7] Z. Xu, K. M. A. Uddin, T. Kamra, J. Schnadt, and L. Ye, "Fluorescent boronic acid polymer grafted on silica particles for affinity separation of saccharides," *ACS applied materials & interfaces*, vol. 6, pp. 1406-1414, 2014.
- [8] Y. Han, X. Yuan, M. Zhu, S. Li, M. J. Whitcombe, and S. A. Piletsky, "A Catalytic and Shape-Memory Polymer Reactor," *Advanced Functional Materials*, vol. 24, pp. 4996-5001, 2014.
- [9] O. K. Castell, D. A. Barrow, A. R. Kamarudin, and C. J. Allender, "Current practices for describing the performance of molecularly imprinted polymers can be misleading and may be hampering the development of the field," *Journal of Molecular Recognition*, vol. 24, pp. 1115-1122, 2011.
- [10] L. Chen, S. Xu, and J. Li, "Recent advances in molecular imprinting technology: current status, challenges and highlighted applications," *Chemical Society Reviews*, vol. 40, pp. 2922-2942, 2011.
- [11] Y. Hoshino and K. J. Shea, "The evolution of plastic antibodies," *Journal of Materials Chemistry*, vol. 21, pp. 3517-3521, 2011.
- [12] R. Schirhagl, "Bioapplications for molecularly imprinted polymers," *Analytical chemistry*, vol. 86, pp. 250-261, 2013.
- [13] S. Li, S. Cao, M. J. Whitcombe, and S. A. Piletsky, "Size matters: challenges in imprinting macromolecules," *Progress in Polymer Science*, vol. 39, pp. 145-163, 2014.
- [14] S. Xu, H. Lu, X. Zheng, and L. Chen, "Stimuli-responsive molecularly imprinted polymers: versatile functional materials," *Journal of Materials Chemistry C*, vol. 1, pp. 4406-4422, 2013.
- [15] S. Suriyanarayanan, P. J. Cywinski, A. J. Moro, G. J. Mohr, and W. Kutner, "Chemosensors based on molecularly imprinted polymers," in *Molecular Imprinting*, ed: Springer, 2010, pp. 165-265.

- [16] K. Haupt, *Molecular imprinting* vol. 325: Springer Science & Business Media, 2012.
- [17] M. J. Whitcombe, I. Chianella, L. Larcombe, S. A. Piletsky, J. Noble, R. Porter, *et al.*, "The rational development of molecularly imprinted polymer-based sensors for protein detection," *Chemical Society Reviews*, vol. 40, pp. 1547-1571, 2011.
- [18] D. R. Kryscio and N. A. Peppas, "Critical review and perspective of macromolecularly imprinted polymers," *Acta Biomaterialia*, vol. 8, pp. 461-473, 2012.
- [19] E. Verheyen, J. P. Schillemans, M. van Wijk, M.-A. Demeniex, W. E. Hennink, and C. F. van Nostrum, "Challenges for the effective molecular imprinting of proteins," *Biomaterials*, vol. 32, pp. 3008-3020, 2011.
- [20] G. Aragay, F. Pino, and A. Merkoci, "Nanomaterials for sensing and destroying pesticides," *Chemical reviews*, vol. 112, pp. 5317-5338, 2012.
- [21] J. Tan, Z.-T. Jiang, R. Li, and X.-P. Yan, "Molecularly-imprinted monoliths for sample treatment and separation," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 39, pp. 207-217, 2012.
- [22] M. Zhang, J. Zeng, Y. Wang, and X. Chen, "Developments and trends of molecularly imprinted solid-phase microextraction," *Journal of chromatographic science*, vol. 51, pp. 577-586, 2013.
- [23] W. J. Cheong, S. H. Yang, and F. Ali, "Molecular imprinted polymers for separation science: a review of reviews," *Journal of separation science*, vol. 36, pp. 609-628, 2013.
- [24] A. Martín-Esteban, "Molecularly-imprinted polymers as a versatile, highly selective tool in sample preparation," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 45, pp. 169-181, 2013.
- [25] Y. Hu, J. Pan, K. Zhang, H. Lian, and G. Li, "Novel applications of molecularly-imprinted polymers in sample preparation," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 43, pp. 37-52, 2013.
- [26] X. Song, S. Xu, L. Chen, Y. Wei, and H. Xiong, "Recent advances in molecularly imprinted polymers in food analysis," *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 131, 2014.
- [27] Y. Fuchs, O. Soppera, and K. Haupt, "Photopolymerization and photostructuring of molecularly imprinted polymers for sensor applications—A review," *Analytica chimica acta*, vol. 717, pp. 7-20, 2012.
- [28] B. Van Dorst, J. Mehta, K. Bekaert, E. Rouah-Martin, W. De Coen, P. Dubruel, *et al.*, "Recent advances in recognition elements of food and environmental biosensors: a review," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 26, pp. 1178-1194, 2010.
- [29] L. Prodi, M. Montalti, and N. Zaccheroni, *Luminescence applied in sensor science* vol. 300: Springer Science & Business Media, 2011.
- [30] H. Yan and K. H. Row, "Characteristic and synthetic approach of molecularly imprinted polymer," *International journal of molecular Sciences*, vol. 7, pp. 155-178, 2006.
- [31] G. Wulff, W. Vesper, R. Grobe-Einsler, and A. Sarhan, "Enzyme-analogue built polymers, 4. On the synthesis of polymers containing chiral cavities and their

- use for the resolution of racemates," *Die Makromolekulare Chemie*, vol. 178, pp. 2799-2816, 1977.
- [32] K. J. Shea and D. Y. Sasaki, "An analysis of small-molecule binding to functionalized synthetic polymers by ^{13}C CP/MAS NMR and FT-IR spectroscopy," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 113, pp. 4109-4120, 1991.
- [33] E. Takano, Y. Taguchi, T. Ooya, and T. Takeuchi, "Dummy template-imprinted polymers for Bisphenol A prepared using a Schiff base-type template molecule with post-imprinting oxidation," *Analytical Letters*, vol. 45, pp. 1204-1213, 2012.
- [34] Z. Zhang, J. Li, X. Song, J. Ma, and L. Chen, "Hg $^{2+}$ ion-imprinted polymers sorbents based on dithizone–Hg $^{2+}$ chelation for mercury speciation analysis in environmental and biological samples," *RSC Advances*, vol. 4, pp. 46444-46453, 2014.
- [35] J. Fu, L. Chen, J. Li, and Z. Zhang, "Current status and challenges of ion imprinting," *Journal of Materials Chemistry A*, vol. 3, pp. 13598-13627, 2015.
- [36] O. Hayden and F. L. Dickert, "Selective microorganism detection with cell surface imprinted polymers," *Advanced Materials*, vol. 13, pp. 1480-1483, 2001.
- [37] A. Takátsy, Á. Végvári, S. Hjertén, and F. Kilar, "Universal method for synthesis of artificial gel antibodies by the imprinting approach combined with a unique electrophoresis technique for detection of minute structural differences of proteins, viruses and cells (bacteria). Ib. Gel antibodies against proteins (hemoglobins)," *Electrophoresis*, vol. 28, pp. 2345-2350, 2007.
- [38] D. Cai, L. Ren, H. Zhao, C. Xu, L. Zhang, Y. Yu, *et al.*, "A molecular-imprint nanosensor for ultrasensitive detection of proteins," *Nature nanotechnology*, vol. 5, pp. 597-601, 2010.
- [39] Z. Zhang, M. Li, J. Ren, and X. Qu, "Cell-Imprinted Antimicrobial Bionanomaterials with Tolerable Toxic Side Effects," *Small*, vol. 11, pp. 1258-1264, 2015.
- [40] W. Zhang, X.-W. He, Y. Chen, W.-Y. Li, and Y.-K. Zhang, "Composite of CdTe quantum dots and molecularly imprinted polymer as a sensing material for cytochrome c," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 26, pp. 2553-2558, 2011.
- [41] Y. Zhang, D. Song, L. M. Lanni, and K. D. Shimizu, "Importance of functional monomer dimerization in the molecular imprinting process," *Macromolecules*, vol. 43, pp. 6284-6294, 2010.
- [42] K. Golker, B. r. C. Karlsson, G. D. Olsson, A. M. Rosengren, and I. A. Nicholls, "Influence of composition and morphology on template recognition in molecularly imprinted polymers," *Macromolecules*, vol. 46, pp. 1408-1414, 2013.
- [43] J. Fasihi, S. A. Alahyari, M. Shamsipur, H. Sharghi, and A. Charkhi, "Adsorption of uranyl ion onto an anthraquinone based ion-imprinted copolymer," *Reactive and Functional Polymers*, vol. 71, pp. 803-808, 2011.
- [44] M. Shamsipur, A. Besharati-Seidani, J. Fasihi, and H. Sharghi, "Synthesis and characterization of novel ion-imprinted polymeric nanoparticles for very fast and highly selective recognition of copper (II) ions," *Talanta*, vol. 83, pp. 674-681, 2010.
- [45] J. Otero-Romaní, A. Moreda-Piñeiro, P. Bermejo-Barrera, and A. Martín-Esteban, "Ionic imprinted polymer for nickel recognition by using the bi-functionalized 5-vinyl-8-hydroxyquinoline as a monomer: Application as a new

- solid phase extraction support," *Microchemical Journal*, vol. 93, pp. 225-231, 2009.
- [46] S. C. L. Pinheiro, A. B. Descalzo, I. M. Raimundo Jr, G. Orellana, and M. C. Moreno-Bondi, "Fluorescent ion-imprinted polymers for selective Cu (II) optosensing," *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 402, pp. 3253-3260, 2012.
- [47] D. James, J. M. Gladis, A. Pandey, G. Naidu, and T. P. Rao, "Design of two-dimensional biomimetic uranyl optrode and its application to the analysis of natural waters," *Talanta*, vol. 74, pp. 1420-1427, 2008.
- [48] S. Xu, L. Chen, J. Li, Y. Guan, and H. Lu, "Novel Hg 2+-imprinted polymers based on thymine–Hg 2+–thymine interaction for highly selective preconcentration of Hg 2+ in water samples," *Journal of hazardous materials*, vol. 237, pp. 347-354, 2012.
- [49] R. Wagner, W. Wan, M. Biyikal, E. Benito-Peña, M. C. Moreno-Bondi, I. Lazraq, *et al.*, "Synthesis, spectroscopic, and analyte-responsive behavior of a polymerizable naphthalimide-based carboxylate probe and molecularly imprinted polymers prepared thereof," *The Journal of organic chemistry*, vol. 78, pp. 1377-1389, 2013.
- [50] S. Banerjee and B. König, "Molecular imprinting of luminescent vesicles," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 135, pp. 2967-2970, 2013.
- [51] H. G. Wu, X. J. Ju, R. Xie, Y. M. Liu, J. G. Deng, C. H. Niu, *et al.*, "A novel ion-imprinted hydrogel for recognition of potassium ions with rapid response," *Polymers for Advanced Technologies*, vol. 22, pp. 1389-1394, 2011.
- [52] X. Li, M. Li, J. Li, F. Lei, X. Su, M. Liu, *et al.*, "Synthesis and characterization of molecularly imprinted polymers with modified rosin as a cross-linker and selective SPE-HPLC detection of basic orange II in foods," *Analytical Methods*, vol. 6, pp. 6397-6406, 2014.
- [53] P. Li, T. Wang, F. Lei, P. Tang, X. Tan, Z. Liu, *et al.*, "Rosin-based molecularly imprinted polymers as the stationary phase in high-performance liquid chromatography for selective separation of berberine hydrochloride," *Polymer International*, vol. 63, pp. 1699-1706, 2014.
- [54] J. M. Gladis and T. P. Rao, "Effect of porogen type on the synthesis of uranium ion imprinted polymer materials for the preconcentration/separation of traces of uranium," *Microchimica Acta*, vol. 146, pp. 251-258, 2004.
- [55] J. Saloni, K. Walker, and G. Hill Jr, "Theoretical Investigation on Monomer and Solvent Selection for Molecular Imprinting of Nitrocompounds," *The Journal of Physical Chemistry A*, vol. 117, pp. 1531-1534, 2013.
- [56] Z. Xu, G. Fang, and S. Wang, "Molecularly imprinted solid phase extraction coupled to high-performance liquid chromatography for determination of trace dichlorvos residues in vegetables," *Food Chemistry*, vol. 119, pp. 845-850, 2010.
- [57] K. Booker, C. I. Holdsworth, C. M. Doherty, A. J. Hill, M. C. Bowyer, and A. McCluskey, "Ionic liquids as porogens for molecularly imprinted polymers: propranolol, a model study," *Organic & biomolecular chemistry*, vol. 12, pp. 7201-7210, 2014.
- [58] G. Schmid, *Nanoparticles: from theory to application*: John Wiley & Sons, 2011.

- [59] K. Nogi, M. Naito, and T. Yokoyama, *Nanoparticle technology handbook*: Elsevier, 2012.
- [60] K. E. Geckeler and H. Nishide, *Advanced nanomaterials*: John Wiley & Sons, 2009.
- [61] X. Wang, C. J. Summers, and Z. L. Wang, "Large-scale hexagonal-patterned growth of aligned ZnO nanorods for nano-optoelectronics and nanosensor arrays," *Nano Letters*, vol. 4, pp. 423-426, 2004.
- [62] J. Jang and J. H. Oh, "Novel crystalline supramolecular assemblies of amorphous polypyrrole nanoparticles through surfactant templating," *Chemical Communications*, pp. 2200-2201, 2002.
- [63] H. Fudouzi and Y. Xia, "Photonic papers and inks: color writing with colorless materials," *Advanced Materials*, vol. 15, pp. 892-896, 2003.
- [64] S. Brahim, D. Narinesingh, and A. Guiseppi-Elie, "Amperometric determination of cholesterol in serum using a biosensor of cholesterol oxidase contained within a polypyrrole-hydrogel membrane," *Analytica chimica acta*, vol. 448, pp. 27-36, 2001.
- [65] Q. Zhang and K. T. Chuang, "Adsorption of organic pollutants from effluents of a Kraft pulp mill on activated carbon and polymer resin," *Advances in Environmental Research*, vol. 5, pp. 251-258, 2001.
- [66] J. P. Rao and K. E. Geckeler, "Polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control parameters," *Progress in Polymer Science*, vol. 36, pp. 887-913, 2011.
- [67] K. Landfester, "Miniemulsion polymerization and the structure of polymer and hybrid nanoparticles," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 48, pp. 4488-4507, 2009.
- [68] R. H. Staff, K. Landfester, and D. Crespy, "Recent advances in the emulsion solvent evaporation technique for the preparation of nanoparticles and nanocapsules," in *Hierarchical Macromolecular Structures: 60 Years after the Staudinger Nobel Prize II*, ed: Springer, 2013, pp. 329-344.
- [69] D. Quintanar-Guerrero, E. Allémann, H. Fessi, and E. Doelker, "Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers," *Drug development and industrial pharmacy*, vol. 24, pp. 1113-1128, 1998.
- [70] E. Y. Sun, L. Josephson, K. A. Kelly, and R. Weissleder, "Development of nanoparticle libraries for biosensing," *Bioconjugate chemistry*, vol. 17, pp. 109-113, 2006.
- [71] M. Antonietti and K. Landfester, "Polyreactions in miniemulsions," *Progress in Polymer Science*, vol. 27, pp. 689-757, 2002.
- [72] J. M. Asua, "Miniemulsion polymerization," *Progress in polymer science*, vol. 27, pp. 1283-1346, 2002.
- [73] P. Couvreur, G. Barratt, E. Fattal, and C. Vauthier, "Nanocapsule technology: a review," *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, vol. 19, 2002.
- [74] D. Moinard-Checot, Y. Chevalier, S. Briançon, H. Fessi, and S. Guinebrière, "Nanoparticles for drug delivery: review of the formulation and process difficulties illustrated by the emulsion-diffusion process," *Journal of nanoscience and nanotechnology*, vol. 6, pp. 2664-2681, 2006.

- [75] C. P. Reis, R. J. Neufeld, A. J. Ribeiro, and F. Veiga, "Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles," *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 2, pp. 8-21, 2006.
- [76] G. A. Hussein and W. G. Pitt, "Micelles and nanoparticles for ultrasonic drug and gene delivery," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 60, pp. 1137-1152, 2008.
- [77] J. Kreuter, *Colloidal drug delivery systems* vol. 66: CRC Press, 1994.
- [78] P. Couvreur, "Polyalkylcyanoacrylates as colloidal drug carriers," *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*, vol. 5, pp. 1-20, 1987.
- [79] D. L. Wise, *Handbook of pharmaceutical controlled release technology*: CRC Press, 2000.
- [80] P. Couvreur, C. Dubernet, and F. Puisieux, "Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends," *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, vol. 41, pp. 2-13, 1995.
- [81] K. Geckeler and J. Stirn, "Polyreaktionen—Mechanismen, Systematik, Relevanz," *Naturwissenschaften*, vol. 80, pp. 487-500, 1993.
- [82] J. W. Vanderhoff, M. S. El-Aasser, and J. Ugelstad, "Polymer emulsification process," ed: Google Patents, 1979.
- [83] R. Gurny, N. Peppas, D. Harrington, and G. Banker, "Development of biodegradable and injectable latices for controlled release of potent drugs," *Drug Development and Industrial Pharmacy*, vol. 7, pp. 1-25, 1981.
- [84] N. Anton, J.-P. Benoit, and P. Saulnier, "Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—a review," *Journal of Controlled Release*, vol. 128, pp. 185-199, 2008.
- [85] D. Lemoine and V. Pr eat, "Polymeric nanoparticles as delivery system for influenza virus glycoproteins," *Journal of Controlled Release*, vol. 54, pp. 15-27, 1998.
- [86] M. Zambaux, F. Bonneaux, R. Gref, P. Maincent, E. Dellacherie, M. Alonso, *et al.*, "Influence of experimental parameters on the characteristics of poly (lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method," *Journal of Controlled Release*, vol. 50, pp. 31-40, 1998.
- [87] C. Bindschaedler, R. Gurny, and E. Doelker, "Process for preparing a powder of water-insoluble polymer which can be redispersed in a liquid phase, the resulting powder and utilization thereof," ed: Google Patents, 1990.
- [88] F. Ganachaud and J. L. Katz, "Nanoparticles and Nanocapsules Created Using the Ouzo Effect: Spontaneous Emulsification as an Alternative to Ultrasonic and High-Shear Devices," *ChemPhysChem*, vol. 6, pp. 209-216, 2005.
- [89] E. Allémann, R. Gurny, and E. Doelker, "Preparation of aqueous polymeric nanodispersions by a reversible salting-out process: influence of process parameters on particle size," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 87, pp. 247-253, 1992.
- [90] F. De Jaeghere, E. Allémann, J.-C. Leroux, W. Stevels, J. Feijen, E. Doelker, *et al.*, "Formulation and lyoprotection of poly (lactic acid-co-ethylene oxide) nanoparticles: influence on physical stability and in vitro cell uptake," *Pharmaceutical research*, vol. 16, pp. 859-866, 1999.
- [91] C. A. Nguyen, E. Allémann, G. Schwach, E. Doelker, and R. Gurny, "Synthesis of a novel fluorescent poly (D, L-lactide) end-capped with 1-pyrenebutanol used

- for the preparation of nanoparticles," *European journal of pharmaceutical sciences*, vol. 20, pp. 217-222, 2003.
- [92] M. L. Zweers, G. H. Engbers, D. W. Grijpma, and J. Feijen, "In vitro degradation of nanoparticles prepared from polymers based on DL-lactide, glycolide and poly (ethylene oxide)," *Journal of Controlled Release*, vol. 100, pp. 347-356, 2004.
- [93] S. A. Galindo-Rodríguez, F. Puel, S. Briançon, E. Allémann, E. Doelker, and H. Fessi, "Comparative scale-up of three methods for producing ibuprofen-loaded nanoparticles," *European journal of pharmaceutical sciences*, vol. 25, pp. 357-367, 2005.
- [94] M. L. Zweers, G. H. Engbers, D. W. Grijpma, and J. Feijen, "Release of anti-restenosis drugs from poly (ethylene oxide)-poly (DL-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles," *Journal of controlled release*, vol. 114, pp. 317-324, 2006.
- [95] Y. Fan, Y. Wang, Y. Fan, and J. Ma, "Preparation of insulin nanoparticles and their encapsulation with biodegradable polyelectrolytes via the layer-by-layer adsorption," *International journal of pharmaceutics*, vol. 324, pp. 158-167, 2006.
- [96] H. Fessi, F. Puisieux, J. P. Devissaguet, N. Ammoury, and S. Benita, "Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement," *International journal of pharmaceutics*, vol. 55, pp. R1-R4, 1989.
- [97] B. Mishra, B. B. Patel, and S. Tiwari, "Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery," *Nanomedicine: Nanotechnology, biology and medicine*, vol. 6, pp. 9-24, 2010.
- [98] A. Dalpiaz, E. Vighi, B. Pavan, and E. Leo, "Fabrication via a nonaqueous nanoprecipitation method, characterization and in vitro biological behavior of N6-cyclopentyladenosine-loaded nanoparticles," *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 98, pp. 4272-4284, 2009.
- [99] F.-Y. Cheng, S. P.-H. Wang, C.-H. Su, T.-L. Tsai, P.-C. Wu, D.-B. Shieh, *et al.*, "Stabilizer-free poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles for multimodal biomedical probes," *Biomaterials*, vol. 29, pp. 2104-2112, 2008.
- [100] O. Thioune, H. Fessi, J. Devissaguet, and F. Puisieux, "Preparation of pseudolatex by nanoprecipitation: influence of the solvent nature on intrinsic viscosity and interaction constant," *International journal of pharmaceutics*, vol. 146, pp. 233-238, 1997.
- [101] H. Murakami, M. Kobayashi, H. Takeuchi, and Y. Kawashima, "Preparation of poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method," *International journal of pharmaceutics*, vol. 187, pp. 143-152, 1999.
- [102] J. Chang, Y. Jallouli, M. Kroubi, X.-b. Yuan, W. Feng, C.-s. Kang, *et al.*, "Characterization of endocytosis of transferrin-coated PLGA nanoparticles by the blood-brain barrier," *International journal of pharmaceutics*, vol. 379, pp. 285-292, 2009.
- [103] T. Nassar, A. Rom, A. Nyska, and S. Benita, "Novel double coated nanocapsules for intestinal delivery and enhanced oral bioavailability of tacrolimus, a P-gp substrate drug," *Journal of controlled release*, vol. 133, pp. 77-84, 2009.
- [104] C. Fessi, J.-P. Devissaguet, F. Puisieux, and C. Thies, "Process for the preparation of dispersible colloidal systems of a substance in the form of nanoparticles," ed: Google Patents, 1992.

- [105] Y. I. Jeong, C. S. Cho, S. H. Kim, K. S. Ko, S. I. Kim, Y. H. Shim, *et al.*, "Preparation of poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles without surfactant," *Journal of applied polymer science*, vol. 80, pp. 2228-2236, 2001.
- [106] M. Kostag, S. Köhler, T. Liebert, and T. Heinze, "Pure cellulose nanoparticles from trimethylsilyl cellulose," in *Macromolecular symposia*, 2010, pp. 96-106.
- [107] H.-J. Jeon, Y.-I. Jeong, M.-K. Jang, Y.-H. Park, and J.-W. Nah, "Effect of solvent on the preparation of surfactant-free poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles and norfloxacin release characteristics," *International journal of pharmaceutics*, vol. 207, pp. 99-108, 2000.
- [108] P. York, "Strategies for particle design using supercritical fluid technologies," *Pharmaceutical science & technology today*, vol. 2, pp. 430-440, 1999.
- [109] H. Takeuchi, H. Yamamoto, and Y. Kawashima, "Mucoadhesive nanoparticulate systems for peptide drug delivery," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 47, pp. 39-54, 2001.
- [110] E. Reverchon, "Supercritical antisolvent precipitation of micro- and nanoparticles," *The journal of supercritical fluids*, vol. 15, pp. 1-21, 1999.
- [111] J. Jung and M. Perrut, "Particle design using supercritical fluids: literature and patent survey," *The Journal of Supercritical Fluids*, vol. 20, pp. 179-219, 2001.
- [112] A. Shariati and C. J. Peters, "Recent developments in particle design using supercritical fluids," *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, vol. 7, pp. 371-383, 2003.
- [113] C. Vemavarapu, M. J. Mollan, M. Lodaya, and T. E. Needham, "Design and process aspects of laboratory scale SCF particle formation systems," *International journal of pharmaceutics*, vol. 292, pp. 1-16, 2005.
- [114] K. Mishima, "Biodegradable particle formation for drug and gene delivery using supercritical fluid and dense gas," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 60, pp. 411-432, 2008.
- [115] M. Weber and M. C. Thies, "Understanding the RESS process," *Supercritical Fluid Technology in Materials Science and Engineering: Syntheses, Properties, and Applications*, pp. 387-427, 2002.
- [116] Y. Chernyak, F. Henon, R. B. Harris, R. D. Gould, R. K. Franklin, J. R. Edwards, *et al.*, "Formation of perfluoropolyether coatings by the rapid expansion of supercritical solutions (RESS) process. Part 1: Experimental results," *Industrial & engineering chemistry research*, vol. 40, pp. 6118-6126, 2001.
- [117] Y.-P. Sun, *Supercritical Fluid Technology in Materials Science and Engineering: Syntheses: Properties, and Applications*: CRC Press, 2002.
- [118] K. W. Hutchenson, "Organic chemical reactions and catalysis in supercritical fluid media," *Supercritical Fluid Technology in Materials Science and Engineering*, M. Dekker (ed.), pp. 87-188, 2002.
- [119] S. C. Thickett and R. G. Gilbert, "Emulsion polymerization: state of the art in kinetics and mechanisms," *Polymer*, vol. 48, pp. 6965-6991, 2007.
- [120] J. M. Asua, "Emulsion polymerization: from fundamental mechanisms to process developments," *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, vol. 42, pp. 1025-1041, 2004.
- [121] J. Kreuter, "On the mechanism of termination in heterogeneous polymerization," *Journal of Polymer Science: Polymer Letters Edition*, vol. 20, pp. 543-545, 1982.

- [122] J. Hearn, M. Wilkinson, A. Goodall, and M. Chainey, "Kinetics of the surfactant-free emulsion polymerization of styrene:-The post nucleation stage," *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition*, vol. 23, pp. 1869-1883, 1985.
- [123] Z. Song and G. W. Poehlein, "Kinetics of emulsifier-free emulsion polymerization of styrene," *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, vol. 28, pp. 2359-2392, 1990.
- [124] D. Zou, S. Ma, R. Guan, M. Park, L. Sun, J. Aklonis, *et al.*, "Model filled polymers. V. Synthesis of crosslinked monodisperse polymethacrylate beads," *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, vol. 30, pp. 137-144, 1992.
- [125] G. T. Shouldice, G. A. Vandezande, and A. Rudin, "Practical aspects of the emulsifier-free emulsion polymerization of styrene," *European polymer journal*, vol. 30, pp. 179-183, 1994.
- [126] S. Akgöl, N. Öztürk, and A. Denizli, "New generation polymeric nanospheres for lysozyme adsorption," *Journal of applied polymer science*, vol. 115, pp. 1608-1615, 2010.
- [127] A. Goodall, M. Wilkinson, and J. Hearn, "Mechanism of emulsion polymerization of styrene in soap-free systems," *Journal of polymer science: Polymer chemistry edition*, vol. 15, pp. 2193-2218, 1977.
- [128] K. Landfester, "Polyreactions in miniemulsions," *Macromolecular Rapid Communications*, vol. 22, pp. 896-936, 2001.
- [129] S. W. Kim, H. G. Cho, and C. R. Park, "Fabrication of unagglomerated polypyrrole nanospheres with controlled sizes from a surfactant-free emulsion system," *Langmuir*, vol. 25, pp. 9030-9036, 2009.
- [130] G. Zhang, A. Niu, S. Peng, M. Jiang, Y. Tu, M. Li, *et al.*, "Formation of novel polymeric nanoparticles," *Accounts of chemical research*, vol. 34, pp. 249-256, 2001.
- [131] S. Wang, X. Wang, and Z. Zhang, "Preparation of polystyrene particles with narrow particle size distribution by γ -ray initiated miniemulsion polymerization stabilized by polymeric surfactant," *European polymer journal*, vol. 43, pp. 178-184, 2007.
- [132] G. R. Bardajee, C. Vancaeyzeele, J. C. Haley, A. Y. Li, and M. A. Winnik, "Synthesis, characterization, and energy transfer studies of dye-labeled poly (butyl methacrylate) latex particles prepared by miniemulsion polymerization," *Polymer*, vol. 48, pp. 5839-5849, 2007.
- [133] E. Rotureau, J. Raynaud, B. Choquet, E. Marie, C. Nouvel, J.-L. Six, *et al.*, "Application of amphiphilic polysaccharides as stabilizers in direct and inverse free-radical miniemulsion polymerization," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 331, pp. 84-90, 2008.
- [134] U. Yildiz and K. Landfester, "Miniemulsion polymerization of styrene in the presence of macromonomeric initiators," *Polymer*, vol. 49, pp. 4930-4934, 2008.
- [135] A. Ethirajan, U. Ziener, and K. Landfester, "Surface-functionalized polymeric nanoparticles as templates for biomimetic mineralization of hydroxyapatite," *Chemistry of Materials*, vol. 21, pp. 2218-2225, 2009.
- [136] C.-S. Chern and J.-C. Sheu, "Effects of carboxylic monomers on the styrene miniemulsion polymerizations stabilized by SDS/alkyl methacrylates," *Polymer*, vol. 42, pp. 2349-2357, 2001.

- [137] J. Arias, V. Gallardo, S. Gomez-Lopera, R. Plaza, and A. Delgado, "Synthesis and characterization of poly (ethyl-2-cyanoacrylate) nanoparticles with a magnetic core," *Journal of Controlled Release*, vol. 77, pp. 309-321, 2001.
- [138] H. T. Ham, Y. S. Choi, M. G. Chee, and I. J. Chung, "Singlewall carbon nanotubes covered with polystyrene nanoparticles by in-situ miniemulsion polymerization," *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, vol. 44, pp. 573-584, 2006.
- [139] J. C. Salamone, *Concise polymeric materials encyclopedia* vol. 1: CRC press, 1998.
- [140] J. Qiu, B. Charleux, and K. Matyjaszewski, "Controlled/living radical polymerization in aqueous media: homogeneous and heterogeneous systems," *Progress in Polymer Science*, vol. 26, pp. 2083-2134, 2001.
- [141] M. S. El-Aasser and C. M. Miller, "Preparation of latexes using miniemulsions," in *Polymeric dispersions: Principles and applications*, ed: Springer, 1997, pp. 109-126.
- [142] H. Warson, "Emulsion polymerization, a mechanistic approach. RG Gilbert. Academic Press, London, 1995. pp. xviii+ 362, price£ 55.00. ISBN 0-12-283060-1," *Polymer International*, vol. 41, pp. 352-352, 1996.
- [143] F. L. Dickert, P. Achatz, and K. Halikias, "Double molecular imprinting—a new sensor concept for improving selectivity in the detection of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in water," *Fresenius' journal of analytical chemistry*, vol. 371, pp. 11-15, 2001.
- [144] O. Ramstroem, L. I. Andersson, and K. Mosbach, "Recognition sites incorporating both pyridinyl and carboxy functionalities prepared by molecular imprinting," *The Journal of Organic Chemistry*, vol. 58, pp. 7562-7564, 1993.
- [145] O. Hayden, K. J. Mann, S. Krassnig, and F. L. Dickert, "Biomimetic ABO Blood-Group Typing," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 45, pp. 2626-2629, 2006.
- [146] O. Hayden, P. A. Lieberzeit, D. Blaas, and F. L. Dickert, "Artificial antibodies for bioanalyte detection—Sensing viruses and proteins," *Advanced Functional Materials*, vol. 16, pp. 1269-1278, 2006.
- [147] L. Qian, X. Hu, P. Guan, D. Wang, J. Li, C. Du, *et al.*, "The effectively specific recognition of bovine serum albumin imprinted silica nanoparticles by utilizing a macromolecularly functional monomer to stabilize and imprint template," *Analytica chimica acta*, vol. 884, pp. 97-105, 2015.
- [148] D. Gao, Z. Zhang, M. Wu, C. Xie, G. Guan, and D. Wang, "A surface functional monomer-directing strategy for highly dense imprinting of TNT at surface of silica nanoparticles," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 129, pp. 7859-7866, 2007.
- [149] C. Xie, B. Liu, Z. Wang, D. Gao, G. Guan, and Z. Zhang, "Molecular imprinting at walls of silica nanotubes for TNT recognition," *Analytical chemistry*, vol. 80, pp. 437-443, 2008.
- [150] Y. Li, H.-H. Yang, Q.-H. You, Z.-X. Zhuang, and X.-R. Wang, "Protein recognition via surface molecularly imprinted polymer nanowires," *Analytical chemistry*, vol. 78, pp. 317-320, 2006.
- [151] A. Poma, A. P. Turner, and S. A. Piletsky, "Advances in the manufacture of MIP nanoparticles," *Trends in biotechnology*, vol. 28, pp. 629-637, 2010.

- [152] M. Irshad, N. Iqbal, A. Mujahid, A. Afzal, T. Hussain, A. Sharif, *et al.*, "Molecularly imprinted nanomaterials for sensor applications," *Nanomaterials*, vol. 3, pp. 615-637, 2013.
- [153] Y. Lv, T. Tan, and F. Svec, "Molecular imprinting of proteins in polymers attached to the surface of nanomaterials for selective recognition of biomacromolecules," *Biotechnology advances*, vol. 31, pp. 1172-1186, 2013.
- [154] Y. Li, X. Li, C. Dong, Y. Li, P. Jin, and J. Qi, "Selective recognition and removal of chlorophenols from aqueous solution using molecularly imprinted polymer prepared by reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 25, pp. 306-312, 2009.
- [155] B. Zu, G. Pan, X. Guo, Y. Zhang, and H. Zhang, "Preparation of molecularly imprinted polymer microspheres via atom transfer radical precipitation polymerization," *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, vol. 47, pp. 3257-3270, 2009.
- [156] X. Wei, X. Li, and S. M. Husson, "Surface molecular imprinting by atom transfer radical polymerization," *Biomacromolecules*, vol. 6, pp. 1113-1121, 2005.
- [157] X. Li and S. M. Husson, "Adsorption of dansylated amino acids on molecularly imprinted surfaces: a surface plasmon resonance study," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 22, pp. 336-348, 2006.
- [158] H.-J. Wang, W.-H. Zhou, X.-F. Yin, Z.-X. Zhuang, H.-H. Yang, and X.-R. Wang, "Template synthesized molecularly imprinted polymer nanotube membranes for chemical separations," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 128, pp. 15954-15955, 2006.
- [159] M. Bompert and K. Haupt, "Molecularly imprinted polymers and controlled/living radical polymerization," *Australian journal of chemistry*, vol. 62, pp. 751-761, 2009.
- [160] J. Chiefari, Y. Chong, F. Ercole, J. Krstina, J. Jeffery, T. P. Le, *et al.*, "Living free-radical polymerization by reversible addition-fragmentation chain transfer: the RAFT process," *Macromolecules*, vol. 31, pp. 5559-5562, 1998.
- [161] G. Pan, B. Zu, X. Guo, Y. Zhang, C. Li, and H. Zhang, "Preparation of molecularly imprinted polymer microspheres via reversible addition-fragmentation chain transfer precipitation polymerization," *Polymer*, vol. 50, pp. 2819-2825, 2009.
- [162] H. Zhang, "Controlled/"living" radical precipitation polymerization: A versatile polymerization technique for advanced functional polymers," *European Polymer Journal*, vol. 49, pp. 579-600, 2013.
- [163] B. M. Discher, Y.-Y. Won, D. S. Ege, J. C. Lee, F. S. Bates, D. E. Discher, *et al.*, "Polymersomes: tough vesicles made from diblock copolymers," *Science*, vol. 284, pp. 1143-1146, 1999.
- [164] D. E. Bergbreiter, "Self-Assembled, Sub-Micrometer Diameter Semipermeable Capsules," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 38, pp. 2870-2872, 1999.
- [165] F. Coutinho, V. G. Teixeira, and C. C. Barbosa, "Synthesis and characterization of styrene-divinylbenzene loaded with di (2-ethylhexyl) phosphonic acid. I. Influence of diluent mixture on the porous structure of the copolymer," *Journal of applied polymer science*, vol. 67, pp. 781-787, 1998.

- [166] C. J. McDonald, K. J. Bouck, A. B. Chaput, and C. J. Stevens, "Emulsion polymerization of voided particles by encapsulation of a nonsolvent," *Macromolecules*, vol. 33, pp. 1593-1605, 2000.
- [167] H. C. Kolb, M. Finn, and K. B. Sharpless, "Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 40, pp. 2004-2021, 2001.
- [168] W. H. Binder and R. Sachsenhofer, "'Click' chemistry in polymer and materials science," *Macromolecular Rapid Communications*, vol. 28, pp. 15-54, 2007.
- [169] J. E. Moses and A. D. Moorhouse, "The growing applications of click chemistry," *Chemical Society Reviews*, vol. 36, pp. 1249-1262, 2007.
- [170] L. Chang, Y. Li, J. Chu, J. Qi, and X. Li, "Preparation of core-shell molecularly imprinted polymer via the combination of reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization and click reaction," *Analytica chimica acta*, vol. 680, pp. 65-71, 2010.
- [171] A. Manz, N. Graber, and H. á. Widmer, "Miniaturized total chemical analysis systems: a novel concept for chemical sensing," *Sensors and actuators B: Chemical*, vol. 1, pp. 244-248, 1990.
- [172] T. Wu, Y. Mei, J. T. Cabral, C. Xu, and K. L. Beers, "A new synthetic method for controlled polymerization using a microfluidic system," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 126, pp. 9880-9881, 2004.
- [173] J. Kobayashi, Y. Mori, K. Okamoto, R. Akiyama, M. Ueno, T. Kitamori, *et al.*, "A microfluidic device for conducting gas-liquid-solid hydrogenation reactions," *Science*, vol. 304, pp. 1305-1308, 2004.
- [174] L.-H. Hung and A. P. Lee, "Microfluidic devices for the synthesis of nanoparticles and biomaterials," *Journal of Medical and Biological Engineering*, vol. 27, p. 1, 2007.
- [175] P. M. Valencia, E. M. Pridgen, M. Rhee, R. Langer, O. C. Farokhzad, and R. Karnik, "Microfluidic platform for combinatorial synthesis and optimization of targeted nanoparticles for cancer therapy," *ACS nano*, vol. 7, pp. 10671-10680, 2013.
- [176] S. K. Choi and N. Koo, "Almost periodic solutions of nonlinear discrete Volterra equations with unbounded delay," *Advances in Difference Equations*, vol. 2008, p. 1, 2008.
- [177] A. Poma, A. Guerreiro, M. J. Whitcombe, E. V. Piletska, A. P. Turner, and S. A. Piletsky, "Solid-Phase Synthesis of Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles with a Reusable Template—"Plastic Antibodies"," *Advanced functional materials*, vol. 23, pp. 2821-2827, 2013.
- [178] K. Muzyka, K. Karim, A. Guerreiro, A. Poma, and S. Piletsky, "Optimisation of the synthesis of vancomycin-selective molecularly imprinted polymer nanoparticles using automatic photoreactor," *Nanoscale research letters*, vol. 9, p. 1, 2014.
- [179] A. Venkatesh, N. Chopra, and R. J. Krupadam, "Removal of acutely hazardous pharmaceuticals from water using multi-template imprinted polymer adsorbent," *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 21, pp. 6603-6611, 2014.
- [180] A. C. Meng, J. LeJeune, and D. A. Spivak, "Multi-analyte imprinting capability of OMNiMIPs versus traditional molecularly imprinted polymers," *Journal of Molecular Recognition*, vol. 22, pp. 121-128, 2009.

- [181] U. Athikomrattanakul, N. Gajovic-Eichelmann, and F. W. Scheller, "Thermometric sensing of nitrofurantoin by noncovalently imprinted polymers containing two complementary functional monomers," *Analytical chemistry*, vol. 83, pp. 7704-7711, 2011.
- [182] M. Haruki, Y. Konnai, A. Shimada, and H. Takeuchi, "Molecularly Imprinted Polymer-Assisted Refolding of Lysozyme," *Biotechnology progress*, vol. 23, pp. 1254-1257, 2007.
- [183] N. T. Hoai, D.-K. Yoo, and D. Kim, "Batch and column separation characteristics of copper-imprinted porous polymer micro-beads synthesized by a direct imprinting method," *Journal of hazardous materials*, vol. 173, pp. 462-467, 2010.
- [184] X. Chen, Z. Zhang, X. Yang, Y. Liu, J. Li, M. Peng, *et al.*, "Novel molecularly imprinted polymers based on multiwalled carbon nanotubes with bifunctional monomers for solid-phase extraction of rhein from the root of kiwi fruit," *Journal of separation science*, vol. 35, pp. 2414-2421, 2012.
- [185] X. Cai, J. Li, Z. Zhang, F. Yang, R. Dong, and L. Chen, "Novel Pb²⁺ ion imprinted polymers based on ionic interaction via synergy of dual functional monomers for selective solid-phase extraction of Pb²⁺ in water samples," *ACS applied materials & interfaces*, vol. 6, pp. 305-313, 2013.
- [186] W. Kareuhanon, V. S. Lee, P. Nimmanpipug, C. Tayapiwatana, and M. Pattarawarapan, "Synthesis of molecularly imprinted polymers for nevirapine by dummy template imprinting approach," *Chromatographia*, vol. 70, pp. 1531-1537, 2009.
- [187] L. Andersson, A. Paprica, and T. Arvidsson, "A highly selective solid phase extraction sorbent for pre-concentration of sameridine made by molecular imprinting," *Chromatographia*, vol. 46, pp. 57-62, 1997.
- [188] J. Matsui, K. Fujiwara, and T. Takeuchi, "Atrazine-selective polymers prepared by molecular imprinting of trialkylmelamines as dummy template species of atrazine," *Analytical chemistry*, vol. 72, pp. 1810-1813, 2000.
- [189] Y. Watabe, K. Hosoya, N. Tanaka, T. Kubo, T. Kondo, and M. Morita, "Novel surface modified molecularly imprinted polymer focused on the removal of interference in environmental water samples for chromatographic determination," *Journal of Chromatography A*, vol. 1073, pp. 363-370, 2005.
- [190] S. Xu, H. Lu, J. Li, X. Song, A. Wang, L. Chen, *et al.*, "Dummy molecularly imprinted polymers-capped CdTe quantum dots for the fluorescent sensing of 2, 4, 6-Trinitrotoluene," *ACS applied materials & interfaces*, vol. 5, pp. 8146-8154, 2013.
- [191] M. Quaglia, K. Chenon, A. J. Hall, E. De Lorenzi, and B. Sellergren, "Target analogue imprinted polymers with affinity for folic acid and related compounds," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 123, pp. 2146-2154, 2001.
- [192] A. Rachkov and N. Minoura, "Recognition of oxytocin and oxytocin-related peptides in aqueous media using a molecularly imprinted polymer synthesized by the epitope approach," *Journal of Chromatography A*, vol. 889, pp. 111-118, 2000.
- [193] T. Kubo, K. Hosoya, T. Sano, M. Nomachi, N. Tanaka, and K. Kaya, "Selective separation of brominated bisphenol A homologues using a polymer-based medium prepared by the fragment imprinting technique," *Analytica chimica acta*, vol. 549, pp. 45-50, 2005.

- [194] T. Kubo, H. Matsumoto, F. Shiraishi, M. Nomachi, K. Nemoto, K. Hosoya, *et al.*, "Selective separation of hydroxy polychlorinated biphenyls (HO-PCBs) by the structural recognition on the molecularly imprinted polymers: Direct separation of the thyroid hormone active analogues from mixtures," *Analytica chimica acta*, vol. 589, pp. 180-185, 2007.
- [195] Z. Xu, S. Chen, W. Huang, G. Fang, H. Pingzhu, and S. Wang, "Study on an on-line molecularly imprinted solid-phase extraction coupled to high-performance liquid chromatography for separation and determination of trace estrone in environment," *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 393, pp. 1273-1279, 2009.
- [196] G. Guan, R. Liu, Q. Mei, and Z. Zhang, "Molecularly imprinted shells from polymer and xerogel matrices on polystyrene colloidal spheres," *Chemistry–A European Journal*, vol. 18, pp. 4692-4698, 2012.
- [197] D. Sharabi and Y. Paz, "Preferential photodegradation of contaminants by molecular imprinting on titanium dioxide," *Applied Catalysis B: Environmental*, vol. 95, pp. 169-178, 2010.
- [198] T.-Y. Guo, Y.-Q. Xia, J. Wang, M.-D. Song, and B.-H. Zhang, "Chitosan beads as molecularly imprinted polymer matrix for selective separation of proteins," *Biomaterials*, vol. 26, pp. 5737-5745, 2005.
- [199] R. Ahmad, N. b. w. Griffete, A. Lamouri, N. Felidj, M. M. Chehimi, and C. Mangeney, "Nanocomposites of gold nanoparticles@ molecularly imprinted polymers: chemistry, processing, and applications in sensors," *Chemistry of Materials*, vol. 27, pp. 5464-5478, 2015.
- [200] R. J. Ansell and K. Mosbach, "Magnetic molecularly imprinted polymer beads for drug radioligand binding assay," *Analyst*, vol. 123, pp. 1611-1616, 1998.
- [201] T. Jing, H. Du, Q. Dai, H. Xia, J. Niu, Q. Hao, *et al.*, "Magnetic molecularly imprinted nanoparticles for recognition of lysozyme," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 26, pp. 301-306, 2010.
- [202] S. Wang, Y. Li, M. Ding, X. Wu, J. Xu, R. Wang, *et al.*, "Self-assembly molecularly imprinted polymers of 17 β -estradiol on the surface of magnetic nanoparticles for selective separation and detection of estrogenic hormones in feeds," *Journal of Chromatography B*, vol. 879, pp. 2595-2600, 2011.
- [203] M. Ding, X. Wu, L. Yuan, S. Wang, Y. Li, R. Wang, *et al.*, "Synthesis of core-shell magnetic molecularly imprinted polymers and detection of sildenafil and vardenafil in herbal dietary supplements," *Journal of hazardous materials*, vol. 191, pp. 177-183, 2011.
- [204] X. Y. Liu, Y. Guan, X. B. Ding, Y. X. Peng, X. P. Long, X. C. Wang, *et al.*, "Design of Temperature Sensitive Imprinted Polymer Hydrogels Based on Multiple-Point Hydrogen Bonding," *Macromolecular bioscience*, vol. 4, pp. 680-684, 2004.
- [205] E. Turan, G. Özçetin, and T. Caykara, "Dependence of Protein Recognition of Temperature-Sensitive Imprinted Hydrogels on Preparation Temperature," *Macromolecular bioscience*, vol. 9, pp. 421-428, 2009.
- [206] L. Qin, X.-W. He, W. Zhang, W.-Y. Li, and Y.-K. Zhang, "Macroporous thermosensitive imprinted hydrogel for recognition of protein by metal coordinate interaction," *Analytical chemistry*, vol. 81, pp. 7206-7216, 2009.

- [207] G. Pan, Q. Guo, C. Cao, H. Yang, and B. Li, "Thermo-responsive molecularly imprinted nanogels for specific recognition and controlled release of proteins," *Soft Matter*, vol. 9, pp. 3840-3850, 2013.
- [208] C. Zhang, X. Jia, Y. Wang, M. Zhang, S. Yang, and J. Guo, "Thermosensitive molecularly imprinted hydrogel cross-linked with N-malely chitosan for the recognition and separation of BSA," *Journal of separation science*, vol. 37, pp. 419-426, 2014.
- [209] G. Pan, Q. Guo, Y. Ma, H. Yang, and B. Li, "Thermo-Responsive Hydrogel Layers Imprinted with RGDS Peptide: A System for Harvesting Cell Sheets," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 52, pp. 6907-6911, 2013.
- [210] N. Adrus and M. Ulbricht, "Molecularly imprinted stimuli-responsive hydrogels for protein recognition," *Polymer*, vol. 53, pp. 4359-4366, 2012.
- [211] X. Yan, F. Wang, B. Zheng, and F. Huang, "Stimuli-responsive supramolecular polymeric materials," *Chemical Society Reviews*, vol. 41, pp. 6042-6065, 2012.
- [212] I. Tomatsu, K. Peng, and A. Kros, "Photoresponsive hydrogels for biomedical applications," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 63, pp. 1257-1266, 2011.
- [213] T. Renkecz, G. n. Mislberger, M. Pawlak, V. Horváth, and E. Bakker, "Molecularly imprinted polymer microspheres containing photoswitchable spiropyran-based binding sites," *ACS applied materials & interfaces*, vol. 5, pp. 8537-8545, 2013.
- [214] E. G. Kelley, J. N. Albert, M. O. Sullivan, and T. H. Epps III, "Stimuli-responsive copolymer solution and surface assemblies for biomedical applications," *Chemical Society Reviews*, vol. 42, pp. 7057-7071, 2013.
- [215] Y. Kanekiyo, R. Naganawa, and H. Tao, "pH-Responsive Molecularly Imprinted Polymers," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 42, pp. 3014-3016, 2003.
- [216] J. Pan, B. Wang, J. Dai, X. Dai, H. Hang, H. Ou, *et al.*, "Selective recognition of 2, 4, 5-trichlorophenol by temperature responsive and magnetic molecularly imprinted polymers based on halloysite nanotubes," *Journal of Materials Chemistry*, vol. 22, pp. 3360-3369, 2012.
- [217] E. Helmerhorst, D. J. Chandler, M. Nussio, and C. D. Mamotte, "Real-time and label-free bio-sensing of molecular interactions by surface plasmon resonance: a laboratory medicine perspective," *The Clinical Biochemist Reviews*, vol. 33, p. 161, 2012.
- [218] S. P. Yadav, S. Bergqvist, M. L. Doyle, T. A. Neubert, and A. P. Yamniuk, "MIRG Survey 2011: snapshot of rapidly evolving label-free technologies used for characterizing molecular interactions," *Journal of biomolecular techniques: JBT*, vol. 23, p. 94, 2012.
- [219] A. Olaru, C. Bala, N. Jaffrezic-Renault, and H. Y. Aboul-Enein, "Surface plasmon resonance (SPR) biosensors in pharmaceutical analysis," *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, vol. 45, pp. 97-105, 2015.
- [220] E. Wijaya, C. Lenaerts, S. Maricot, J. Hastanin, S. Habraken, J.-P. Vilcot, *et al.*, "Surface plasmon resonance-based biosensors: From the development of different SPR structures to novel surface functionalization strategies," *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, vol. 15, pp. 208-224, 2011.

- [221] H. Liu, B. Wang, E. S. Leong, P. Yang, Y. Zong, G. Si, *et al.*, "Enhanced surface plasmon resonance on a smooth silver film with a seed growth layer," *ACS nano*, vol. 4, pp. 3139-3146, 2010.
- [222] A. J. Tudos and R. B. Schasfoort, "Introduction to surface plasmon resonance," *Handbook of surface plasmon resonance*, pp. 1-14, 2008.
- [223] E. M. Munoz, J. Correa, R. Riguera, and E. Fernandez-Megia, "Real-time evaluation of binding mechanisms in multivalent interactions: a surface plasmon resonance kinetic approach," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 135, pp. 5966-5969, 2013.
- [224] C. A. Wartchow, F. Podlaski, S. Li, K. Rowan, X. Zhang, D. Mark, *et al.*, "Biosensor-based small molecule fragment screening with biolayer interferometry," *Journal of computer-aided molecular design*, vol. 25, pp. 669-676, 2011.
- [225] C. Ananthanawat, V. P. Hoven, T. Vilaivan, and X. Su, "Surface plasmon resonance study of PNA interactions with double-stranded DNA," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 26, pp. 1918-1923, 2011.
- [226] C. E. Nilsson, S. Abbas, M. Bennemo, A. Larsson, M. Hämäläinen, and Å. Frostell-Karlsson, "A novel assay for influenza virus quantification using surface plasmon resonance," *Vaccine*, vol. 28, pp. 759-766, 2010.
- [227] A. Olaru, M. Gheorghiu, S. David, T. Wohland, and E. Gheorghiu, "Assessment of the multiphase interaction between a membrane disrupting peptide and a lipid membrane," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 113, pp. 14369-14380, 2009.
- [228] E. Suenaga, H. Mizuno, and P. K. Kumar, "Influenza virus surveillance using surface plasmon resonance," *Virulence*, vol. 3, pp. 464-470, 2012.
- [229] P. Viel, J. Walter, S. Bellon, and T. Berthelot, "Versatile and nondestructive photochemical process for biomolecule immobilization," *Langmuir*, vol. 29, pp. 2075-2082, 2013.
- [230] A. E. Wammes, M. J. Fischer, J. Nico, M. B. van Eldijk, F. P. Rutjes, J. C. van Hest, *et al.*, "Site-specific peptide and protein immobilization on surface plasmon resonance chips via strain-promoted cycloaddition," *Lab on a Chip*, vol. 13, pp. 1863-1867, 2013.
- [231] S. Geschwindner, J. F. Carlsson, and W. Knecht, "Application of optical biosensors in small-molecule screening activities," *Sensors*, vol. 12, pp. 4311-4323, 2012.
- [232] J. Mitchell, "Small molecule immunosensing using surface plasmon resonance," *Sensors*, vol. 10, pp. 7323-7346, 2010.
- [233] Ç. Çiçek, F. Yılmaz, E. Özgür, H. Yavuz, and A. Denizli, "Molecularly Imprinted Quartz Crystal Microbalance Sensor (QCM) for Bilirubin Detection," *Chemosensors*, vol. 4, p. 21, 2016.
- [234] E. Yılmaz, D. Majidi, E. Ozgur, and A. Denizli, "Whole cell imprinting based Escherichia coli sensors: A study for SPR and QCM," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 209, pp. 714-721, 2015.
- [235] S. Atay, K. Pişkin, F. Yılmaz, C. Çakır, H. Yavuz, and A. Denizli, "Quartz crystal microbalance based biosensors for detecting highly metastatic breast cancer cells via their transferrin receptors," *Analytical Methods*, vol. 8, pp. 153-161, 2016.

- [236] E. Yılmaz, E. Özgür, N. Bereli, D. Türkmen, and A. Denizli, "Plastic antibody based surface plasmon resonance nanosensors for selective atrazine detection," *Materials Science and Engineering: C*, 2016.
- [237] M. Bakhshpour, E. Özgür, N. Bereli, and A. Denizli, "Microcontact Imprinted Quartz Crystal Microbalance Nanosensor for Protein C Recognition," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2016.
- [238] G. Sener, L. Uzun, R. Say, and A. Denizli, "Use of molecular imprinted nanoparticles as biorecognition element on surface plasmon resonance sensor," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 160, pp. 791-799, 2011.
- [239] G. Sener, E. Ozgur, A. Y. Rad, L. Uzun, R. Say, and A. Denizli, "Rapid real-time detection of procalcitonin using a microcontact imprinted surface plasmon resonance biosensor," *Analyst*, vol. 138, pp. 6422-6428, 2013.
- [240] G. Ertürk, H. Özen, M. A. Tümer, B. Mattiasson, and A. Denizli, "Microcontact imprinting based surface plasmon resonance (SPR) biosensor for real-time and ultrasensitive detection of prostate specific antigen (PSA) from clinical samples," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 224, pp. 823-832, 2016.
- [241] B. Osman, L. Uzun, N. Beşirli, and A. Denizli, "Microcontact imprinted surface plasmon resonance sensor for myoglobin detection," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 33, pp. 3609-3614, 2013.
- [242] M. Kara, L. Uzun, S. Kolayli, and A. Denizli, "Combining molecular imprinted nanoparticles with surface plasmon resonance nanosensor for chloramphenicol detection in honey," *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 129, pp. 2273-2279, 2013.
- [243] A. Gültekin, A. Ersöz, A. Denizli, and R. Say, "Preparation of new molecularly imprinted nanosensor for cholic acid determination," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 162, pp. 153-158, 2012.
- [244] E. Kretschmann and H. Raether, "Notizen: radiative decay of non radiative surface plasmons excited by light," *Zeitschrift für Naturforschung A*, vol. 23, pp. 2135-2136, 1968.
- [245] H. H. Nguyen, J. Park, S. Kang, and M. Kim, "Surface plasmon resonance: a versatile technique for biosensor applications," *Sensors*, vol. 15, pp. 10481-10510, 2015.
- [246] H. Šířová and J. Homola, "Surface plasmon resonance sensing of nucleic acids: a review," *Analytica chimica acta*, vol. 773, pp. 9-23, 2013.
- [247] J. Homola, S. S. Yee, and G. Gauglitz, "Surface plasmon resonance sensors: review," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 54, pp. 3-15, 1999.
- [248] J. De Feijter, d. J. Benjamins, and F. Veer, "Ellipsometry as a tool to study the adsorption behavior of synthetic and biopolymers at the air–water interface," *Biopolymers*, vol. 17, pp. 1759-1772, 1978.
- [249] P. Englebienne, A. V. Hoonacker, and M. Verhas, "Surface plasmon resonance: principles, methods and applications in biomedical sciences," *Journal of Spectroscopy*, vol. 17, pp. 255-273, 2003.
- [250] A. G. Frutos and R. M. Corn, "Peer Reviewed: SPR of Ultrathin Organic Films," *Analytical Chemistry*, vol. 70, pp. 449A-455A, 1998.
- [251] K. Kurihara and K. Suzuki, "Theoretical understanding of an absorption-based surface plasmon resonance sensor based on Kretschmann's theory," *Analytical Chemistry*, vol. 74, pp. 696-701, 2002.

- [252] A.-C. Malmborg, M. Dueñas, M. Ohlin, E. Söderlind, and C. A. Borrebaeck, "Selection of binders from phage displayed antibody libraries using the BIAcore™ biosensor," *Journal of immunological methods*, vol. 198, pp. 51-57, 1996.
- [253] W. D. Wilson, "Analyzing biomolecular interactions," *Science*, vol. 295, pp. 2103-2105, 2002.
- [254] S. Boussaad, J. Pean, and N. Tao, "High-resolution multiwavelength surface plasmon resonance spectroscopy for probing conformational and electronic changes in redox proteins," *Analytical Chemistry*, vol. 72, pp. 222-226, 2000.
- [255] S. Wang, S. Boussaad, S. Wong, and N. Tao, "High-sensitivity stark spectroscopy obtained by surface plasmon resonance measurement," *Analytical chemistry*, vol. 72, pp. 4003-4008, 2000.
- [256] L. S. Jung, C. T. Campbell, T. M. Chinowsky, M. N. Mar, and S. S. Yee, "Quantitative interpretation of the response of surface plasmon resonance sensors to adsorbed films," *Langmuir*, vol. 14, pp. 5636-5648, 1998.
- [257] T. Zacher and E. Wischerhoff, "Real-time two-wavelength surface plasmon resonance as a tool for the vertical resolution of binding processes in biosensing hydrogels," *Langmuir*, vol. 18, pp. 1748-1759, 2002.
- [258] X. Caide and S.-F. Sui, "Numerical simulations of surface plasmon resonance system for monitoring DNA hybridization and detecting protein-lipid film interactions," *European Biophysics Journal*, vol. 28, pp. 151-157, 1999.
- [259] J. C. O'Brien, V. W. Jones, M. D. Porter, C. L. Mosher, and E. Henderson, "Immunosensing platforms using spontaneously adsorbed antibody fragments on gold," *Analytical chemistry*, vol. 72, pp. 703-710, 2000.
- [260] J. Lahiri, L. Isaacs, J. Tien, and G. M. Whitesides, "A strategy for the generation of surfaces presenting ligands for studies of binding based on an active ester as a common reactive intermediate: a surface plasmon resonance study," *Analytical chemistry*, vol. 71, pp. 777-790, 1999.
- [261] T. Yoshida, M. Sato, T. Ozawa, and Y. Umezawa, "An SPR-based screening method for agonist selectivity for insulin signaling pathways based on the binding of phosphotyrosine to its specific binding protein," *Analytical chemistry*, vol. 72, pp. 6-11, 2000.
- [262] A. J. Thiel, A. G. Frutos, C. E. Jordan, R. M. Corn, and L. M. Smith, "In situ surface plasmon resonance imaging detection of DNA hybridization to oligonucleotide arrays on gold surfaces," *Analytical Chemistry*, vol. 69, pp. 4948-4956, 1997.
- [263] C. E. Jordan, A. G. Frutos, A. J. Thiel, and R. M. Corn, "Surface plasmon resonance imaging measurements of DNA hybridization adsorption and streptavidin/DNA multilayer formation at chemically modified gold surfaces," *Analytical Chemistry*, vol. 69, pp. 4939-4947, 1997.
- [264] M. Burgener, M. Sanger, and U. Candrian, "Synthesis of a stable and specific surface plasmon resonance biosensor surface employing covalently immobilized peptide nucleic acids," *Bioconjugate chemistry*, vol. 11, pp. 749-754, 2000.
- [265] M. Morelock, R. Ingraham, R. Betageri, and S. Jakes, "Determination of receptor-ligand kinetic and equilibrium binding constants using surface plasmon

- resonance: application to the Ick SH2 domain and phosphotyrosyl peptides," *Journal of medicinal chemistry*, vol. 38, pp. 1309-1318, 1995.
- [266] M. Adamczyk, P. G. Mattingly, K. Shreder, and Z. Yu, "Surface plasmon resonance (SPR) as a tool for antibody conjugate analysis," *Bioconjugate chemistry*, vol. 10, pp. 1032-1037, 1999.
- [267] D. Czock, F. Keller, F. M. Rasche, and U. Häussler, "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids," *Clinical pharmacokinetics*, vol. 44, pp. 61-98, 2005.
- [268] A. Nobile, W. Charney, P. Perlman, H. Herzog, C. Payne, M. Tully, *et al.*, "Microbiological transformation of steroids. I. Δ^1 , 4-diene-3-ketosteroids," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 77, pp. 4184-4184, 1955.
- [269] M. Fidani, M. C. Gamberini, G. Pompa, F. Mungiguerra, A. Casati, and F. Arioli, "Presence of endogenous prednisolone in human urine," *Steroids*, vol. 78, pp. 121-126, 2013.
- [270] L. L. Brunton, B. Chabner, and B. C. Knollmann, *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics* vol. 12: McGraw-Hill Medical New York, 2011.
- [271] H. Herzog, A. Nobile, S. Tolksdorf, W. Charney, E. Hershberg, P. L. Perlman, *et al.*, "New antiarthritic steroids," *Science*, vol. 121, pp. 176-176, 1955.
- [272] R. N. Goyal and S. P. Singh, "Voltammetric determination of atenolol at C 60-modified glassy carbon electrodes," *Talanta*, vol. 69, pp. 932-937, 2006.
- [273] T. Hasegawa, K. Ishihara, S. Takakura, H. Fujii, T. Nishimura, M. OKAZAKI, *et al.*, "Duration of systemic corticosteroids in the treatment of asthma exacerbation; a randomized study," *Internal medicine*, vol. 39, pp. 794-797, 2000.
- [274] H. Tillis, "Prednisolone-hydroxyzine treatment of rheumatoid arthritis," *The Journal of the Medical Society of New Jersey*, vol. 57, pp. 485-488, 1960.
- [275] A. Nikai, "Treatments for inflammatory bowel disease," *Medicina*, vol. 44, pp. 1700-1702, 2007.
- [276] L. J. Scott and D. P. Figgitt, "Mitoxantrone," *CNS drugs*, vol. 18, pp. 379-396, 2004.
- [277] P. Tfelt-Hansen and R. Jensen, "[Cluster headache (Horton's headache)]," *Ugeskrift for læger*, vol. 168, pp. 4417-4422, 2006.
- [278] B. C. Richardson, "Treatment for systemic lupus erythematosus," ed: Google Patents, 1997.
- [279] B. Malaekheh-Nikouei, F. A. Ghaeni, V. S. Motamedshariaty, and S. A. Mohajeri, "Controlled release of prednisolone acetate from molecularly imprinted hydrogel contact lenses," *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 126, pp. 387-394, 2012.
- [280] B. Peng, Q. Li, D. Luyo, and S. Whitcup, "Treatment of allergic conjunctivitis in murine model," in *EXCERPTA MEDICA INTERNATIONAL CONGRESS SERIES*, 1994, pp. 249-249.
- [281] C. Leong, P. Soo, S. Fadilah, and S. K. Cheong, "Relapsed Hodgkin's disease presenting as a right knee swelling," *The Medical journal of Malaysia*, vol. 58, pp. 131-134, 2003.
- [282] C. Grattan, G. Dawn, S. Gibbs, and D. Francis, "Blood basophil numbers in chronic ordinary urticaria and healthy controls: diurnal variation, influence of

- loratadine and prednisolone and relationship to disease activity," *Clinical & Experimental Allergy*, vol. 33, pp. 337-341, 2003.
- [283] L. Wennberg, H. Genberg, and G. Tydén, "Preapheresis immunosuppressive induction: necessary or harmful?," *Transplantation*, vol. 84, pp. S37-S39, 2007.
- [284] K. Kohda, S. Sakamaki, T. Matsunaga, T. Kuga, A. Fujimi, Y. Konuma, *et al.*, "Long-term survival and late-onset complications of cancer patients treated with high-dose chemotherapy followed by autologous peripheral blood stem cell transplantation," *International journal of hematology*, vol. 73, pp. 251-257, 2001.
- [285] H. J. Yoo, K. M. Choi, O. H. Ryu, S. I. Suh, N. H. Kim, S. H. Baik, *et al.*, "Delayed puberty due to pituitary stalk dysgenesis and ectopic neurohypophysis," *The Korean journal of internal medicine*, vol. 21, p. 68, 2006.
- [286] R. N. Goyal, M. Oyama, N. Bachheti, and S. P. Singh, "Fullerene C 60 modified gold electrode and nanogold modified indium tin oxide electrode for prednisolone determination," *Bioelectrochemistry*, vol. 74, pp. 272-277, 2009.
- [287] E. Pujos, M.-M. Flament-Waton, O. Paisse, and M.-F. Grenier-Loustalot, "Comparison of the analysis of corticosteroids using different techniques," *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 381, pp. 244-254, 2005.
- [288] S. Ahi, S. Dubey, A. K. Upadhyay, R. S. Yadav, R. Priyadarshi, and A. Beotra, "Identification of prednisolone, methylprednisolone and their metabolites in human urine using HPLC (+) ESI-MS/MS and detection of possible adulteration in Indian herbal drug preparations," *Ibnosina Journal of Medicine and Biomedical Sciences*, vol. 4, pp. 44-52, 2012.
- [289] R. N. Goyal, M. Oyama, N. Bachheti, and S. P. Singh, "Fullerene C60 modified gold electrode and nanogold modified indium tin oxide electrode for prednisolone determination," *Bioelectrochemistry*, vol. 74, pp. 272-277, 2009.
- [290] M. Bredehöft, R. Baginski, M.-K. Parr, M. Thevis, and W. Schänzer, "Investigations of the microbial transformation of cortisol to prednisolone in urine samples," *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 129, pp. 54-60, 2012.
- [291] O. H. Hidalgo, M. J. Lopez, E. A. Carazo, M. S. A. Larrea, and T. B. Reuvers, "Determination of dexamethasone in urine by gas chromatography with negative chemical ionization mass spectrometry," *Journal of Chromatography B*, vol. 788, pp. 137-146, 2003.
- [292] K. Yanagibashi, A. Mizuchi, H. Yotsumoto, and Y. Miyachi, "Separation of serum prednisolone and prednisolone-21-hemisuccinate by extraction and their concurrent determination by radioimmunoassay," *Clinical chemistry*, vol. 26, pp. 1301-1303, 1980.
- [293] S. AbuRuz, J. Millership, L. Heaney, and J. McElnay, "Simple liquid chromatography method for the rapid simultaneous determination of prednisolone and cortisol in plasma and urine using hydrophilic lipophilic balanced solid phase extraction cartridges," *Journal of Chromatography B*, vol. 798, pp. 193-201, 2003.
- [294] D. Singh and R. Verma, "Comparison of second derivative-spectrophotometric and reversed-phase HPLC methods for the determination of prednisolone in pharmaceutical formulations," *Analytical sciences*, vol. 23, pp. 1241-1243, 2007.
- [295] L. V. Rao, J. R. Petersen, M. G. Bissell, A. O. Okorodudu, and A. A. Mohammad, "Development of a urinary free cortisol assay using solid-phase extraction–

- capillary electrophoresis," *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, vol. 730, pp. 123-128, 1999.
- [296] A. Leinonen, K. Vuorensola, L.-M. Lepola, T. Kuuranne, T. Kotiaho, R. A. Ketola, *et al.*, "Liquid-phase microextraction for sample preparation in analysis of unconjugated anabolic steroids in urine," *Analytica chimica acta*, vol. 559, pp. 166-172, 2006.
- [297] A. C. Cartwright, *The British pharmacopoeia, 1864 to 2014: medicines, international standards and the state*: Routledge, 2016.
- [298] E. Hosono, S. Fujihara, I. Honma, and H. Zhou, "Superhydrophobic perpendicular nanopin film by the bottom-up process," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 127, pp. 13458-13459, 2005.
- [299] L. Gao and T. J. McCarthy, "The "lotus effect" explained: two reasons why two length scales of topography are important," *Langmuir*, vol. 22, pp. 2966-2967, 2006.
- [300] L. Gao and T. J. McCarthy, "A perfectly hydrophobic surface ($\theta_A/\theta_R = 180/180$)," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 128, pp. 9052-9053, 2006.
- [301] H. Lu, D. Zeysing, M. Kind, A. Terfort, and M. Zharnikov, "Structure of self-assembled monolayers of partially fluorinated alkanethiols with a fluorocarbon part of variable length on gold substrate," *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 117, pp. 18967-18979, 2013.
- [302] E. Zeidan, C. L. Kepley, C. Sayes, and M. G. Sandros, "Surface plasmon resonance: a label-free tool for cellular analysis," *Nanomedicine*, vol. 10, pp. 1833-1846, 2015.
- [303] J. Homola, "Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species," *Chemical reviews*, vol. 108, pp. 462-493, 2008.
- [304] R. F. Soares, A. L. de Araújo, J. d. L. Castro, L. N. L. Gomes, H. M. Pereira, and F. R. d. Aquino Neto, "Quantitative approach to glucocorticosteroids analysis in human urine using LC-MS/MS," *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol. 23, pp. 2065-2074, 2012.
- [305] C.-W. Chang, T.-Y. Huang, Y.-C. Tseng, G.-P. Chang-Chien, S.-F. Lin, and M.-C. Hsu, "Positive doping results caused by the single-dose local injection of triamcinolone acetonide," *Forensic science international*, vol. 244, pp. 1-6, 2014.
- [306] X. Matabosch, O. J. Pozo, C. Pérez-Mañá, E. Papaseit, J. Segura, and R. Ventura, "Detection and characterization of prednisolone metabolites in human urine by LC-MS/MS," *Journal of Mass Spectrometry*, vol. 50, pp. 633-642, 2015.
- [307] S. Lin, A. Shih-Yuan Lee, C.-C. Lin, and C.-K. Lee, "Determination of binding constant and stoichiometry for antibody-antigen interaction with surface plasmon resonance," *Current Proteomics*, vol. 3, pp. 271-282, 2006.
- [308] I. D. Mall, V. C. Srivastava, N. K. Agarwal, and I. M. Mishra, "Removal of congo red from aqueous solution by bagasse fly ash and activated carbon: kinetic study and equilibrium isotherm analyses," *Chemosphere*, vol. 61, pp. 492-501, 2005.
- [309] K. Foo and B. Hameed, "Insights into the modeling of adsorption isotherm systems," *Chemical Engineering Journal*, vol. 156, pp. 2-10, 2010.
- [310] J. H. Boer, "Dynamical character of adsorption," 1968.
- [311] A. Myers and J. M. Prausnitz, "Thermodynamics of mixed-gas adsorption," *AIChE Journal*, vol. 11, pp. 121-127, 1965.

- [312] H. Freundlich, "Over the adsorption in solution," *J. Phys. Chem*, vol. 57, pp. 1100-1107, 1906.
- [313] A. Adamson and A. Gast, "Physical Chemistry of Surfaces, ; Interscience: New York, 1997. Hiemenz, PC Principles of Colloid and Surface Chemistry," ed: Marcel Dekker: New York, 1986.
- [314] F. Haghseresht and G. Lu, "Adsorption characteristics of phenolic compounds onto coal-reject-derived adsorbents," *Energy & Fuels*, vol. 12, pp. 1100-1107, 1998.
- [315] Y. Ho, J. Porter, and G. McKay, "Equilibrium isotherm studies for the sorption of divalent metal ions onto peat: copper, nickel and lead single component systems," *Water, Air, and Soil Pollution*, vol. 141, pp. 1-33, 2002.
- [316] K. Vijayaraghavan, T. Padmesh, K. Palanivelu, and M. Velan, "Biosorption of nickel (II) ions onto *Sargassum wightii*: application of two-parameter and three-parameter isotherm models," *Journal of hazardous materials*, vol. 133, pp. 304-308, 2006.
- [317] A. Pérez-Marín, V. M. Zapata, J. Ortuno, M. Aguilar, J. Sáez, and M. Lloréns, "Removal of cadmium from aqueous solutions by adsorption onto orange waste," *Journal of hazardous materials*, vol. 139, pp. 122-131, 2007.
- [318] S. Allen, G. Mckay, and J. Porter, "Adsorption isotherm models for basic dye adsorption by peat in single and binary component systems," *Journal of colloid and interface science*, vol. 280, pp. 322-333, 2004.
- [319] E. Demirbas, M. Kobya, and A. Konukman, "Error analysis of equilibrium studies for the almond shell activated carbon adsorption of Cr (VI) from aqueous solutions," *Journal of Hazardous Materials*, vol. 154, pp. 787-794, 2008.
- [320] C. H. Bolster and G. M. Hornberger, "On the use of linearized Langmuir equations," *Soil Science Society of America Journal*, vol. 71, pp. 1796-1806, 2007.
- [321] G. T. Rushton, C. L. Karns, and K. D. Shimizu, "A critical examination of the use of the Freundlich isotherm in characterizing molecularly imprinted polymers (MIPs)," *Analytica chimica acta*, vol. 528, pp. 107-113, 2005.
- [322] E. Sari, R. Üzek, M. Duman, and A. Denizli, "Fabrication of surface plasmon resonance nanosensor for the selective determination of erythromycin via molecular imprinted nanoparticles," *Talanta*, vol. 150, pp. 607-614, 2016.
- [323] G. Pompa, F. Arioli, A. Casati, M. Fidani, L. Bertocchi, and G. Dusi, "Investigation of the origin of prednisolone in cow urine," *Steroids*, vol. 76, pp. 104-110, 2011.
- [324] R. N. Goyal and S. Bishnoi, "Simultaneous voltammetric determination of prednisone and prednisolone in human body fluids," *Talanta*, vol. 79, pp. 768-774, 2009.
- [325] Y. Zhang, H.-L. Wu, Y.-J. Ding, A.-L. Xia, H. Cui, and R.-Q. Yu, "Simultaneous determination of cortisol and prednisolone in body fluids by using HPLC–DAD coupled with second-order calibration based on alternating trilinear decomposition," *Journal of chromatography B*, vol. 840, pp. 116-123, 2006.
- [326] V. A. Frerichs and K. M. Tornatore, "Determination of the glucocorticoids prednisone, prednisolone, dexamethasone, and cortisol in human serum using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry," *Journal of Chromatography B*, vol. 802, pp. 329-338, 2004.

- [327] R. DiFrancesco, V. Frerichs, J. Donnelly, C. Hagler, J. Hochreiter, and K. M. Tornatore, "Simultaneous determination of cortisol, dexamethasone, methylprednisolone, prednisone, prednisolone, mycophenolic acid and mycophenolic acid glucuronide in human plasma utilizing liquid chromatography–tandem mass spectrometry," *Journal of Chromatography B*, vol. 859, pp. 42-51, 2007.
- [328] M. N. Gai, E. Pinilla, C. Paulos, J. Chávez, V. Puelles, and A. Arancibia, "Determination of prednisolone and prednisone in plasma, whole blood, urine, and bound-to-plasma proteins by high-performance liquid chromatography," *Journal of chromatographic science*, vol. 43, pp. 201-206, 2005.
- [329] S. N. Razzaq, I. U. Khan, I. Mariam, and S. S. Razzaq, "Stability indicating HPLC method for the simultaneous determination of moxifloxacin and prednisolone in pharmaceutical formulations," *Chemistry central journal*, vol. 6, p. 1, 2012.
- [330] H. Hashem and T. Jira, "Chromatographic applications on monolithic columns: determination of triamcinolone, prednisolone and dexamethasone in pharmaceutical tablet formulations using a solid phase extraction and a monolithic column," *Chromatographia*, vol. 61, pp. 133-136, 2005.
- [331] S. S. Chitlange, K. K. Chaturvedi, and S. B. Wankhede, "Development and validation of spectrophotometric and HPLC method for the simultaneous estimation of salbutamol sulphate and prednisolone in tablet dosage form," *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*, vol. 2011, 2012.
- [332] O. Majid, F. Akhlaghi, T. Lee, D. W. Holt, and A. Trull, "Simultaneous determination of plasma prednisolone, prednisone, and cortisol levels by high-performance liquid chromatography," *Therapeutic drug monitoring*, vol. 23, pp. 163-168, 2001.
- [333] A. L. Coelho and R. Q. Aucélio, "Photochemical induced fluorescence for the determination of prednisolone and triamcinolone," *Analytical letters*, vol. 39, pp. 619-630, 2006.
- [334] C. Y. Cho, B. S. Shin, and S. D. Yoo, "Sensitive analysis of prednisolone and prednisone in human plasma by reverse phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection," *Analytical letters*, vol. 36, pp. 1573-1585, 2003.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı: Esmâ Sari Üzek

Doğum Yeri: Altındağ

Medeni Hali: Evli

E-posta: esma.sari@hotmail.com

Adresi: Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Beytepe, Ankara

Eğitim

Lisans: Karadeniz Teknik Üniversitesi

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi

Doktora: Hacettepe Üniversitesi

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce, ileri seviye

İş Deneyimi

Deneyim Alanları

Biyosensör, enzim saflaştırılması, biyomoleküllerin saflaştırılması ve tayini, kromatografi

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

Tezden Üretilmiş Yayınlar

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar



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

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 12/01/2017

Tez Başlığı : Prednisolon Tayini için Yüzey Tanıma Bölgelerine Sahip Moleküler Baskılanmış Sensörlerin Geliştirilmesi

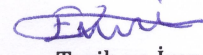
Yukarıda başlığı gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç ve e)Kaynakça kısımlarından oluşan toplam 128 sayfalık kısmına ilişkin, 12/01/2017 tarihinde tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 1 'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

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

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

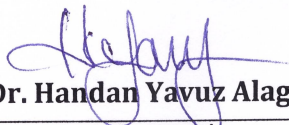
Gereğini saygılarımla arz ederim.


Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Esmâ Sari Üzek
Öğrenci No: N12141381
Anabilim Dalı: Kimya
Programı: Doktora Programı
Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.


Prof. Dr. Handan Yavuz Alagöz
(Unvan, Ad Soyad, İmza)