

**SÜLFAMETOKSAZOL TAYİNİ İÇİN SENSÖR
SİSTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT OF SENSOR SYSTEMS FOR
SULFAMETHOXAZOLE DETERMINATION**

ÖNDER KURÇ

Doç. Dr. DENİZ TÜRKMEN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Kimya Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2021

Desteğini hiç esirgemeyen canım aileme.

ÖZET

Sülfametoksazol Tayini için Sensör Sistemlerinin Geliştirilmesi

Önder KURÇ

Yüksek Lisans, KİMYA Bölümü

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Deniz TÜRKMEN

Temmuz 2021, 118 sayfa

Antibiyotikler bulaşıcı hastalıkların tedavisi için kullanılan kimyasal ajanlardır. Bu ajanlar tıp ve veterinerlikte çeşitli amaçlarla her yıl büyük miktarda tüketilmektedir. Fakat bu ajanların çevreye ve gıdalara karışması birçok probleme sebep olmaktadır. Bu sebepten dolayı bu bileşiklerin gıdalarda ve çevresel kaynaklardaki tayini büyük önem arz etmektedir. Bu tür tayinler genellikle laboratuvarlarda geleneksel tayin yöntemi ile yapılmaktadır ve bu yöntemler eğitilmiş teknik eleman ihtiyacı, pahalı ekipman kullanımı, uzun analiz süresi ve tayinlerin ön işlem gerektirmesi gibi dezavantajlara sahiptir.

Bu çalışma kapsamında bir sülfonamid antibiyotiği olan Sülfametoksazol (SMX) için hızlı yanıt verebilen, yüksek seçiciliğe sahip, ön işlem gerektirmeyen, tekrar kullanılabilen bir yüzey plasmon rezonansı (SPR) çipi üretilmiştir. Üretilen sensör çipi için reseptör Sülfametoksazol baskılı MAA-EDGMA-HEMA polimeridir. Çip üretimi öncesi kalıp (SMX)- monomer etkileşimi B3LYP ve 6-31+g(d,p) temel seti ile incelenmiş ve teorik hesaplamaları yapılmıştır. Ardından polimer nanofilm kaplı SPR altın çipi karakterize edilmiştir. Yapılan adsorpsiyon çalışmaları sonucu LOD ve LOQ değerleri sırası ile 0.0011 µg/L ve 0.0034 µg/L bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Yüzey plasmon rezonansı (SPR), Biyosensör, Moleküler baskılama, Antibiyotik, Sülfametoksazol, Moleküler Modelleme

ABSTRACT

Development of Sensor Systems for Sulfamethoxazole Determination

Önder KURÇ

Master of Science, Department of Chemistry

Supervisor: Doç. Dr. Deniz TÜRKMEN

July 2021, 118 page

Antibiotics are chemical agents used to treat contagious diseases. These agents are consumed in large quantities every year for various purposes in both veterinary and human health. But the mixing of these agents into the environment and food causes many problems. For this reason, it is of great importance to learn the amount of these compounds in foods and environmental sources. Such determinations are usually made in laboratories by the traditional method of analysis, and these methods have disadvantages such as the need for trained personnel, the use of expensive equipment, a long analysis time, and the fact that some analyses require pre-processing which is both labor and time consuming.

In this study, we developed surface plasmon resonance (SPR) sensor chip that fast reacting, highly selective, reusable and requires no pretreatment for detecting sulfamethoxazole. We used sulfamethoxazole imprinted polymer (MAA-HEMA-EGDMA) as a receptor in the SPR chip. Before molecular imprinting we also used B3LYP hybrid theory with 6-31+g(d, p) basis set to examine monomer and template to determine best template-monomer ratio. After developing molecular imprinted nanofilm coated SPR chip we characterized it with SEM and did adsorption studies on both standard sulfamethoxazole solution and commercial milk samples. According to data, for sensor LOD and LOQ values are calculated as 0.0011 µg/L and 0.0034 µg/L respectively.

Keywords: Sulfamethoxazole, Antibiotics, Sensor, Surface Plasmon Resonance (SPR), Molecular Imprinting, Molecular Modelling

TEŞEKKÜR

Eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen aileme, moral ve motivasyon vermiŐ olan arkadaşlarıma. Lisans çalıŐmamda yardımcı olmuş hocam Doç Dr. Bilgen Osman'a, yüksek lisans çalıŐmam boyunca bana desteğini esirgememiŐ olan danıŐman hocam Doç. Dr. Deniz Türkmen'e, Hacettepe Üniversitesi BİOREG ailesine ve Prof. Dr. Adil Denizli'ye, ayrıca çalışmalar sırasında yardımlarından dolayı Dr. Mitra Jalilzade'ye ve Sisem Ektirici'ye teŐekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Antibiyotikler.....	5
2.1.1. Genel Bilgiler	5
2.1.2. Antibiyotiklerin Sınıflandırılması.....	6
2.1.3. Antibiyotik Kullanımının Zararları.....	9
2.1.4. Antibiyotik Direnci	10
2.1.5. Sülfametoksazol	13
2.1.5.1. Sülfametoksazolün Kimyasal Tayini.....	16
2.2. Sensörler.....	17
2.2.1. Biyosensörler.....	19
2.2.1.1. Biyosensörlerin Bileşenleri ve Sınıflandırılması	19
2.2.1.2. Biyoreseptörler.....	20
2.2.1.2.1. Dönüştürücüler	22
2.2.1.2.1.1 Optik Dönüştürücüler	22
2.2.1.2.1.2 Alan Etki Transistörleri (FETs) Temelli Sensörler	25
2.2.1.2.1.3 Metal Nanopartikül Elektrotu Sensörler	25
2.3. Polimerler ve Moleküler Baskılama Yöntemi.....	27
2.3.1. Genel Bilgiler	27
2.3.2. Moleküler Baskılama Yöntemi	28
2.3.2.1. Moleküler Baskılı Polimerlerin Sentezi.....	29

2.3.2.1.1. Fonksiyonel Gruba Sahip Monomerler.....	29
2.3.2.1.2. Kalıp Molekül (Şablon/Hedef)	30
2.3.2.1.3. Çapraz Bağlayıcı.....	30
2.3.2.1.4. Polimerleşme Başlatıcı	30
2.3.2.1.5. Kovalent Olmayan Yaklaşım	31
2.3.2.1.6. İyonik/Metalik Yaklaşım.....	31
2.3.2.1.7. Kovalent Yaklaşım	31
2.3.2.2. Moleküler Baskılama ile Reseptör Üretimi.....	32
2.4. Moleküler Modelleme.....	33
2.4.1. Moleküler Mekanik Yaklaşımı	35
2.4.2. Kuantum Mekaniği Yaklaşımı.....	36
2.4.3. Temel Setler.....	36
2.4.3.1. Yoğunluk Fonksiyon Teorisi (DFT).....	36
2.4.3.2. Hartree-Fock Metodu (HF)	37
2.4.3.3. Hibrid Fonksiyonlar	38
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	39
3.1. Kimyasal Malzemeler.....	39
3.2. Moleküler Modelleme Çalışmaları	39
3.2.1. Monomer Oranları	39
3.2.2. Çözücü Faktörü.....	39
3.3. Sülfametoksazol Baskılı Sensörün Hazırlanışı	40
3.4. Karakterizasyon Çalışmaları.....	40
3.5. Sülfametoksazol Baskılı Nanosensörün Kinetik Çalışmaları.....	41
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	42
4.1. Monomer-Kalıp Oranı ve Çözücü Etkisi.....	42
4.1.1. Monomer Oranları	42
4.1.2. Uygun Çözücü Seçimi.....	44
4.2. Karakterizasyon Çalışmaları.....	46
4.2.1. Temas Açısı	46
4.2.2. AFM Analizi.....	47
4.2.3. Nanobaskılı Sensörlerin SEM Görüntüsü.....	47
4.2.4. FT-IR Karakterizasyonu	49

4.3. pH Etkisi.....	50
4.4. Baskılama Etkisi.....	51
4.5. Adsorpsiyon Çalışmaları	52
4.5.1. İlk Derişimin Etkisi	52
4.5.2. Denge Analizi	55
4.5.3. Termodinamik İzoterm Modelleri	57
4.5.4. SPR Nanosensörünün Seçiciliği	60
4.5.5. Tekrar Kullanılabilirlik	62
4.5.6. Depolanabilirlik	63
4.6. Gerçek Numune Çalışmaları	64
4.7. Literatür Özeti ve Karşılaştırma.....	65
5. YORUM.....	70
6. KAYNAKLAR.....	73
EKLER	88
EK 1 – Tez Çalışması Orjinallik Raporu	88
ÖZGEÇMİŞ	89

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Altın SPR çipinin hazırlanışı.....	3
Şekil 2.1. Antibiyotiklerin doğal kaynaklara karışma yolları.....	9
Şekil 2.2. Yıla bağlı küresel antibiyotik kullanımındaki değişim. Ayrıca 2030'a kadar ulaşması düşünülen tüketim miktarı grafikte bulunmaktadır. (1) Antibiyotik tüketimi tüm ülkelerde anlık kişi başı kullanım miktarı ile alınmaya devam edildiğinde (2) Tüm ülkeler önerilen kullanım oranı kullanımı azaltırsa (3) Anlık yıllık büyüme oranı ile orantılı devam ettiğinde [47].	12
Şekil 2.3. Sülfametoksazolün kimyasal yapısı. Sol; Açık yapısı [51] sağ; üç boyutlu gösterimi.	13
Şekil 2.4. Sülfametoksazolün UV-VIS absorpsiyon spektrum.a: Sülfametoksazol ve Trimethoprimin UV-absorpsiyonunun spektrum b: Sülfametoksazol c: 6 µg/mL derişimi için trimethoprim ve Sülfametoksazolün karışımı [59].	16
Şekil 2.5. (a): Sülfametoksazolün FTIR absorpsiyon spektrum (b): Sülfametoksazolün kütle spektrum [60].	16
Şekil 2.6. Sensörler ve kullanım alanları.	18
Şekil 2.7. Biyosensörlerin sınıflandırılması	20
Şekil 2.8. Yüzey plazmon rezonansı.	23
Şekil 2.9. SPR sensogramı örneği.	24
Şekil 2.10. Metal nanopartikül elektrotlar [128].	26
Şekil 2.11. Polimerlerin sınıflandırılması.	27
Şekil 2.12. Moleküler baskılı polimerlerin sentezi [151].	29
Şekil 2.13. Sensör dönüştürücüsü üstünde moleküler baskılama.	32
Şekil 2.14. Moleküler modelleme.	33
Şekil 2.15. Klasik bir molekül dizayn programı ile çizilmiş SMX-MAA bileşikleri [168].	35
Şekil 4.1. Kalıp molekül (SMX) ve monomer (MAA) arasındaki farklı molar oranlardaki etkileşimler. Üstten alta doğru a 1:1 SMX-MAA, b 1:2 SMX-MAA, c 1:3 SMX-MAA	43
Şekil 4.2. 1:3 Molar oranda, etanol çözücüsündeki [SMX-MAA-MAA-MAA] kompleksinin optimize geometrisi. Kesikli çizgiler hidrojen bağlarını göstermektedir.	45

Şekil 4.3. Temas açısı ölçümü. a: çıplak SPR çipi, b: alil modifiyeli çip, c: SMX baskılı çip.....	46
Şekil 4.4. SPR altın çipinin (a) ve SMX baskılı polimer kaplı PR çipinin() AFM görüntüsü.....	47
Şekil 4.5. Moleküler baskılı nanosensörlerin SEM görüntüleri.....	48
Şekil 4.6. SMX Baskısız (a) ve SMX baskılı (b) çiplerin FT-IR spektrumu.....	49
Şekil 4.7. pH etkisi (C: 0.025 µg/L, T=25°C).....	51
Şekil 4.8. Baskılama faktörü (C: 0.025-253.2 µg/L, T=25°C, pH 7.4).	52
Şekil 4.9. Gerçek zamanlı sülfametoksazol için SPR çipi sensogramı (C: 0.025-253.2 µg/L, T=25°C, pH 7.4).....	53
Şekil 4.10. Sülfametoksazol baskılı SPR biyosensörünün kalibrasyon grafiği a: 0.025- 2.5 µg/L b: 12,6-253.2 µg/L arasındaki sülfametoksazol çözeltisine verdiği yanıtın kalibrasyon eğrisi. (T=25°C, pH 7.4).....	54
Şekil 4.11. Kinetik orantı sabitlerinin hesaplanması: Bağlanma kinetik analizi.	56
Şekil 4.12. Kinetik oran sabitlerinin ölçümü. Denge Analizi.	57
Şekil 4.13. Langmuir adsorpsiyon izotermi modeli.....	58
Şekil 4.14. Freundlich adsorpsiyon izotermi metodu.	59
Şekil 4.15. Langmuir-Freundlich adsorpsiyon izoterm modeli.	59
Şekil 4.16. Sensörün farklı bileşiklere karşı seçiciliği (C= 25.3 µg/L, T=25°C, pH 7.4).	60
Şekil 4.17. Nanosensörün tekrar kullanılabilirliği (C= 25.3 µg/L T=25°C, pH 7.4).....	62
Şekil 4.18. Nanosensörün depolanabilirlik çalışması sonucu elde edilen sensogram (C= 25.3 µg/L T=25°C, pH 7.4).....	63

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Antibiyotik sınıfları, örnek yapı ve genel özellikleri.	7
Çizelge 2.2. Bazı antibiyotikler için MRL miktarları.....	10
Çizelge 2.3. Sülfametoksazolün etki ettiği bazı mikroorganizmalar.....	15
Çizelge 2.4. Klasik tayin yöntemleriyle yapılmış sülfametoksazol tayinlerinin LOD, LOQ değerleri.	17
Çizelge 2.5. Bazı moleküler modelleme programları.....	34
Çizelge 4.1. SMX-MAA komplekslerinin farklı molar oranlarda gaz fazındaki bağlanma enerjileri, ΔE_1	42
Çizelge 4.2. Farklı çözücü ortamındaki çözünme enerjileri.....	44
Çizelge 4.3. 1:3 Molar oranda, etanol çözücüsündeki [SMX-MAA-MAA-MAA] kompleksinin teorik hesaplama sonuçları.....	45
Çizelge 4.4. Denge ve bağlanma kinetik sabitleri.	57
Çizelge 4.5. Adsorpsiyon izoterm modelleri.	60
Çizelge 4.6. Seçicilik Sabitleri.	61
Çizelge 4.7. SPR nanosensör yöneminin UV spektroskopisiyle validasyonu.	64
Çizelge 4.8. SMX için geliştirilmiş diğer biyosensörler.	65

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgele

mL	mililitre
L	Litre
μ L	Mikrolitre
ppm	Milyonda bir
$^{\circ}$ C	Santigrat derece
nm	Nanometre
K_A	Bağlanma Sabiti
K_D	Ayrılma Sabiti
C	Derişim
t	Zaman
g	Gram
mg	Miligram
μ g	Mikrogram

Kısaltmalar

SMX	Sülfametoksazol
MAA	Metakrilik Asit
EGDMA	Etilen Glikol Dimetakrilat
HEMA	2-Hidroksi Etil Metakrilat
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
U.S. FDA	Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi
EMA	Avrupa İlaç Ajansı
DDD	Günlük Kullanım Dozajı
ARG	Antibiyotik Dirençli Genler
DFT	Yoğunluk Fonksiyon Teorisi
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
UV-VIS	Morötesi ve Görünür Bölge
MRL	Maksimum Kalıntı Limiti
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
LC-MS	Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskopi
FET	Alan Etki Transistörleri
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopi
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskopi
SPR	Yüzey Plasmon Rezonansı
LOD	Gözlenebilme Sınırı
LOQ	Tayin Sınırı
MIP	Moleküler Baskılı Polimer
NIP	Moleküler Baskısız Polimer

1. GİRİŞ

Antibiyotikler keşfinden itibaren hastalıklara karşı kullanılmış ve milyonlarca insanın hayatını kurtarmış antimikrobiyal ajanlardır. Bu ajanlar konak canlı ile hedef mikroorganizma arasındaki temel biyolojik farklardan yararlanarak konağa minimum zarar verirken hedef mikroorganizmanın üremesini engelleyerek veya ölümüne sebep olarak konak canlıyı tedavi etmeye yarar. Tıp, veterinerlik ve ziraatta bakteriyel enfeksiyonlara karşı her yıl büyük bir miktarda kullanılır ve bulaşıcı hastalıkları tedavi edip yayılımını önler. Fakat antibiyotiklerin bilinçsiz ve uzun süreli kullanımı yeni sorunlar ortaya çıkarmıştır. Günümüzde ise bu durum antibiyotikleri su kaynakları, toprak ve gıdalarda sıkça karşılaştığımız istenmeyen birleşikler haline getirmiştir ve çevresel bir sorun oluşturmuştur. Bu sorunun önlenmemesinden dolayı doğada antibiyotiklere dirençli mikroorganizma türlerinde artış meydana gelmiştir.

Antibiyotikler ve diğer kirleticiler çevre laboratuvarlarında kromatografik ve spektroskopik yöntemler ile ölçülebilmektedir [1,2]. Fakat bu tür tayinlerin yapılması uzun süreler almakta, pahalı ekipman gerektirmekte ve tayinleri yapabilecek teknik bilgiye sahip teknisyene ihtiyaç duyma gibi bazı dezavantajlara sahiptir. Bu dezavantajlar analizler için klasik yöntemler dışında yeni analiz yöntemleri alternatifini aramayı zorunlu kılmıştır.

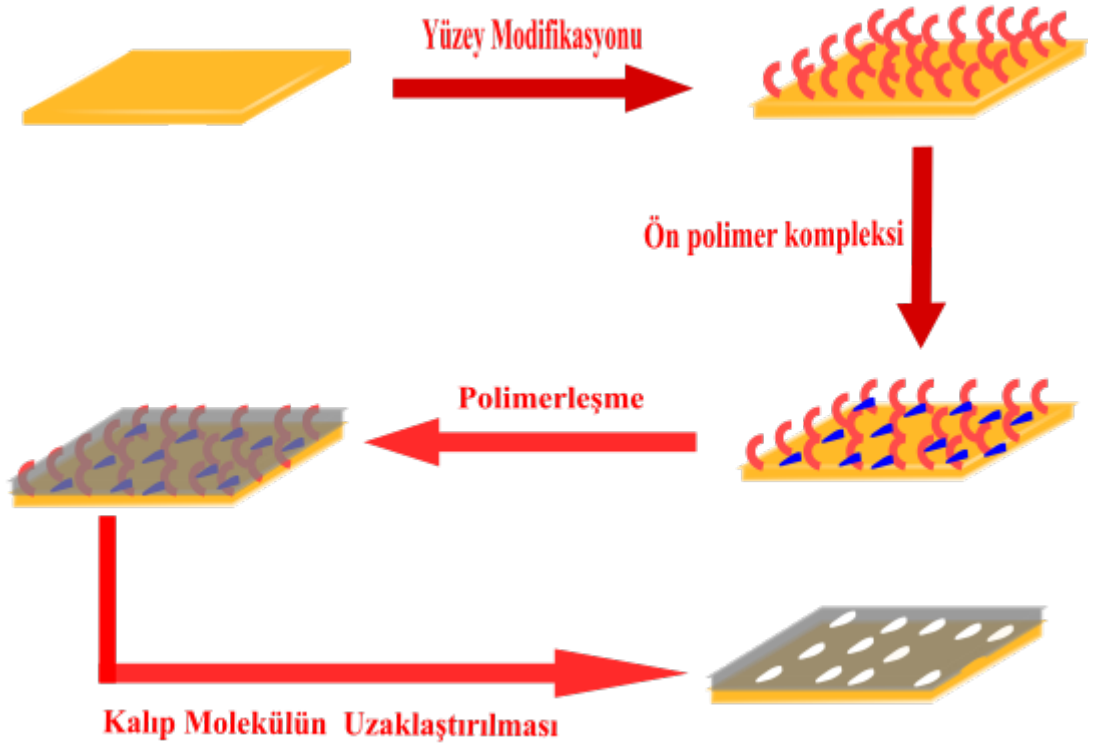
Antibiyotikler gibi bileşikler tayin etmek için kullanılacak bir diğer yöntem de sensör uygulamalarıdır [3,4]. Sensörler, hedef molekülü tanıyabilen bir reseptör, tanıma sonucu olan değişimi sinyale çevirebilen bir dönüştürücü ve bir sinyal okuyucudan yapılmış kalitatif ve kantitatif analiz yapabilen aletlerdir. Sensörlerin hızlı sonuç verebilmesi, kullanımının basit olması, maliyetinin düşük olması ve yüksek hassasiyette tayin yapabilmesi sayesinde antibiyotikler ve benzeri birçok bileşiği izlemek için laboratuvar yöntemleri ile yapılan tayinlere alternatif olabilmektedir.

Fakat belirli bir analite özgün sensör üretimi için bazı kısıtlayıcı faktörler bulunmaktadır. Bu faktörlerden biri istenilen analite duyarlı reseptör varlığıdır. Biyolojik kaynaklardan birçok reseptör elde edilebilse de bu reseptörleri saflaştırmanın getirdiği maliyet ve

zaman kaybının fazla olması ayrıca biyolojik reseptörlerin hassas yapısı sensörlerde kullanılmasını kısıtlar. Bu durumun üstesinden gelmek için biyolojik reseptörler yerine kullanılabilir yapay reseptörler geliştirilmeye ve kullanılmaya başlanmıştır [5]. Yapay reseptörler arasında moleküler baskılı polimerler uzun süredir ilgi konusudur. Moleküler baskılama yöntemi ile istenilen bir kalıp molekül için yüksek seçiciliğe ve hassasiyete sahip bağlanma bölgeleri içeren polimerlerin sentezlenmesi mümkündür. Bu polimerler geniş bir aralıkta fiziksel ve kimya şartlarına uyumlu şekilde üretilebilmesi bu polimerlerin reseptör olarak kullanılmasını avantajlı kılar. Ayrıca moleküler baskılı polimerlerin üretimi doğal reseptörlerin maliyetine kıyasla kısmen daha ucuzdur.

Ayrıca moleküler baskılı polimer sentezi moleküler modelleme programları ile sentez öncesi bilgisayar ortamında incelenmesi mümkündür. Modelleme işlemi atomlar arası bağlardan, büyük biyomoleküllerin birbirleri ile etkileşimine kadar geniş bir spektrumda atom, molekül ve birbirleri ile etkileşimlerini [6] incelememize imkân tanır. Bilgisayar ortamında yapılan teorik hesaplamalar ve simülasyonlar ile üretilecek moleküler baskılı polimer için monomer-kalıp molekül arası etkileşimi inceleyebilir en uygun eşleşmeyi sağlayabiliriz. Bu sayede üretilecek polimer için en uygun monomer türü [7] ve baskılama için en uygun monomer- kalıp molekül oranını belirlenebilir.

Moleküler modelleme için kullanılan metotlardan DFT metodu ve B3YLP hibrid teorisi moleküller arası etkileşimleri incelemek için kullanıma sahiptir [8,9]. Bu metotların kullanılmasının en büyük avantajı büyük moleküllü sistemlerde bile moleküllerin temel hal enerji düzeyindeki etkileşim enerjileri hakkında bilgi vermesi ve bunu kısmen hızlı ve yüksek doğrulukta yapmasıdır.



Şekil 1.1 Altın SPR çipinin hazırlanışı

Bu çalışma kapsamında bir antibiyotik olan Sülfametoksazol için MIP nanofilm kaplı SPR çipi üretilmiştir. Moleküler baskılama; altın çip yüzeyi polimer için modifiye edildikten sonra kalıp molekülle birlikte çip yüzeyi üzerinde yığın polimerizasyon yöntemi ile yapılmış ve ardından kalıp molekül uzaklaştırılmıştır. Bu işlemler sistematik olarak ekil 1.1’de gösterilmiştir.

Ayrıca moleküler baskılı çip üretilmeden önce Moleküler baskılı polimerde kalıp molekül ile polimerin fonksiyonel grupları arasındaki etkileşimler üretilen polimerin bağlanma performansını anlamak için gerekli olduğundan bu etkileşim, anlamak için kompleks oluşumunda molekül konformasyonlarının, çözücü etkilerinin ve monomer oranının incelenmesi önemli bir faktördür. Bu amaç doğrultusunda kalıp molekül (SMX) ile monomer (MAA) arasındaki optimum etkileşimin olduğu monomer oranı ve bu yapının konformasyonu tez kapsamında farklı monomer oranları ve farklı çözücü ortamlarında moleküler modelleme uygulamaları ile belirlenmiştir.

Çalışma için 1:1 [SMX-MAA], 1:2 [SMX-MAA-MAA], 1:3 [SMX-MAA-MAA-MAA] molar oranları seçilmiş; su, etanol ve asetonitril çözücüleri ise, çözücü etkisini incelemek için seçilmiştir. Moleküllerin geometri optimizasyonları için, Gaussian03 paket programı ile B3LYP/6-31+G(d,p) yöntemi kullanılmıştır.

Moleküler baskılı nanosensör çipi üretildikten sonra ise; SEM, AFM ile karakterize edilmiştir. Ölçüm için en uygun pH belirlendikten sonra belirlenen pH değerinde nano sensörün adsorpsiyon çalışmaları yapılmıştır. Adsorpsiyon çalışmaları sonucunda adsorpsiyon izotermi ile yapılan hesaplamalar yardımıyla moleküler baskılı sensör yüzeyindeki moleküler boşluklar ve yüzeyin homojenliği hakkında bilgi sahibi olunmuştur. Ayrıca sensörün seçiciliği ve depolanabilirliği çalışmada incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Antibiyotikler

2.1.1. Genel Bilgiler

Bulaşıcı hastalıklar bakteri, virüs, mantar veya parazitler gibi mikroorganizmaların bir konak canlıya yerleşmesi ve bir konaktan diğerine geçerek yayılması ile meydana gelen hastalıklardır. Bu hastalıkların varlığı konak canlıya geçici veya kalıcı hasar verebilmekle birlikte konağın ölümüne de sebep olma ihtimali bulunmaktadır. Geçmişe kıyasla bulaşıcı hastalıklar hijyen kurallarının yaygınlaşması sonucu önlenebilir ve günümüz tıp ve eczacılığındaki gelişmeler sayesinde tedavi edilebilir olsa da bulaşıcı hastalıklar yine her yıl büyük miktarda ölüme sebep olmaktadır. Bulaşıcı hastalıkların sebep olduğu kayıtlı ölümler düzenli olarak açıklanmaktadır. Dünya sağlık örgütü tarafından açıklanan verilere göre sadece 2019 yılında alt solunum yolu enfeksiyonlarından 2,6 milyon, tüberkülozdan ise yaklaşık 1,4 milyon insan hayatını kaybetmiştir [10]. Alt solunum yolu enfeksiyonları ve tüberkülozun dışında birçok farklı mikroorganizmaların sebep olduğu bulaşıcı hastalıklar direkt veya dolaylı bir şekilde milyonlarca canlının ölümüne sebep olmaktadır.

Bulaşıcı hastalıkların tedavisi bulaşıcı hastalıkların sebebi yani zararlı mikroorganizmaların varlığı keşfedildikten sonra önemli ölçüde hızlanmıştır. Bu mücadelenin ilk örnekleri arsenik, cıva veya bakır gibi bakterilere karşı toksik olan metal iyonlarıyla yapılan dezenfektanlar ve antiseptikler ile bulaşıcı hastalıkların yayılımının azaltılması yönündedir. Fakat bu yöntemlerin genellikle toksik bileşikler kullanılması ve çeşitliğinin az olması dolayısıyla büyük başarılar imza atamamıştır. Daha sonraki gelişme ise bulaşıcı hastalıklara karşı kullanılan penisilin ve antibiyotiklerin keşfi ile devam etmiştir [11].

Antibiyotik kelimesinin kökeni ilk defa Selman Waksman tarafından kullanılmıştır [12]. Waksman mantarlar üstüne yaptığı araştırmalar ile bu mantarların ürettiği antibiyotikleri incelemiştir. Antibiyotik terimini karşı anlamına gelen “anti” ve canlı/yaşam anlamına gelen “bio” kelimelerinin birleştirmiş ve antibiyotik yani “canlı organizmalara karşı” anlamına gelen bu terimi oluşturmuştur. Antibiyotiklerin ilk bilimsel anlamda tanınması

ve etkilerini fark etmesi ise 20. yüzyılın başlarında Alexander Fleming'in çalışmaları ile başlamıştır. 1928 yılında Alexander Fleming *Staphylococcus aureus* türü üstünde yaptığı çalışmalar sırasında hücre kültürüne sızan küf mantarlarının (*Penicillium notatum*) çevresinde bakteri kültürlerinin büyümediğini fark etmesi ve bu olayın sebebini incelemesi penisilini keşfetmesi ile sonuçlanmıştır [13]. Fleming'in çalışması sonucu penisilin, insanoğlunun tanıdığı ilk antibiyotik olarak tarihe geçmiş ve keşfinden bu zamana kadar bakteriyel enfeksiyonlara karşı verilen mücadelede kullanılacak olan ilaçlarının öncüsü olmuştur.

Penisilinin keşfi ve antibiyotik ilaçların tanımından sonra bilim dünyası bu yeni ilaç sınıfını ilgiyle incelemiş ve ilerleyen yıllarda birçok yeni doğal antibiyotik keşfedilmiş ve izole edilmiştir [14-16]. Doğal antibiyotiklerin yanı sıra sentetik ve yarı sentetik yeni antibiyotiklerde üretilmiş ve bulaşıcı hastalıklarla mücadele kapsamında tıbbi ve veterinerlik uygulamalarında yer bulmuşlardır. Antibiyotiklerin keşfi ve yeni antibiyotiklerin üretilmeye devam ettiği dönemlerde insanoğlu bu keşiflerin altın çağını yaşamış, daha öncesinde ölümcül olarak kabul edilen birçok bakteriyel enfeksiyona karşı galip gelmiştir. Sonuçta ise dünya çapında nüfus artışı ve ortalama yaşam süresinde iyileşmeler gözlemlenmiştir [17]. Ayrıca antibiyotikler bulaşıcı hastalıklar dışında hayvancılıkta gıda takviyesi olarak kullanılmaktadır. Hayvancılıkta gıda takviyesi olarak verilen düşük dozajda antibiyotiklerin hayvanları hastalıktan koruduğu ve bu sayede hayvanlar daha az hastalığa yakalandığı gözlemlenmiştir. Hayvanların daha az hastalığa yakalanması ise bu hayvanlardan elde edilen ürün miktarında artışa sebep olmaktadır [18,19].

Antibiyotiklerin kullanımı her ne kadar tıbbi ve ekonomik fayda sağlasa da bu bileşiklerin bilinçsiz ve uzun süreli kullanımı yeni sorunlar ortaya çıkarmıştır. Bu sorunlardan biri antibiyotiklerin su kaynakları [20-23] , toprak [24,26] ve gıdalara [27-31] karışmasıdır.

2.1.2. Antibiyotiklerin Sınıflandırılması

Penisilinin keşfi sonrası birçok farklı türde yeni antibiyotikler doğal kaynaklardan izole edilmiş veya sentetik üretildiği daha önce söylenmişti [17]. Fakat bu bileşiklerin aynı ilaç

sınıfında olmasına rağmen birbirinden farklı kimyasal yapıya sahip olması ve farklı mekanizma ile etki etmeleri sonucu kendi içlerinde sınıflandırma gereksinimi yaratmıştır.

Antibiyotiklerin sınıflandırılması kendi içlerinde farklı özelliklerinden faydalanılarak yapılabilir. Bunlar özellikler; bakteriyostatik (bakterilerin çoğalmasını engelleyen) veya bakterisitik (bakterileri öldüren) etkiye sahip olması, etki ettiği bakteri türü (gram pozitif, gram negatif veya her ikisi (geniş spektrum)), etki ettiği hücre bileşeninin türüne ve etki ettiği mekanizmaya göre ve kimyasal yapısına göre yapılabilir. Antibiyotiklerin kimyasal yapısına göre sınıflandırılması en sık kullanılan sınıflandırma yöntemidir. Bazı antibiyotik sınıfları, bu sınıfa dahil örnek bileşik ve genel özellikleri çizelge 2.1’de verilmiştir.

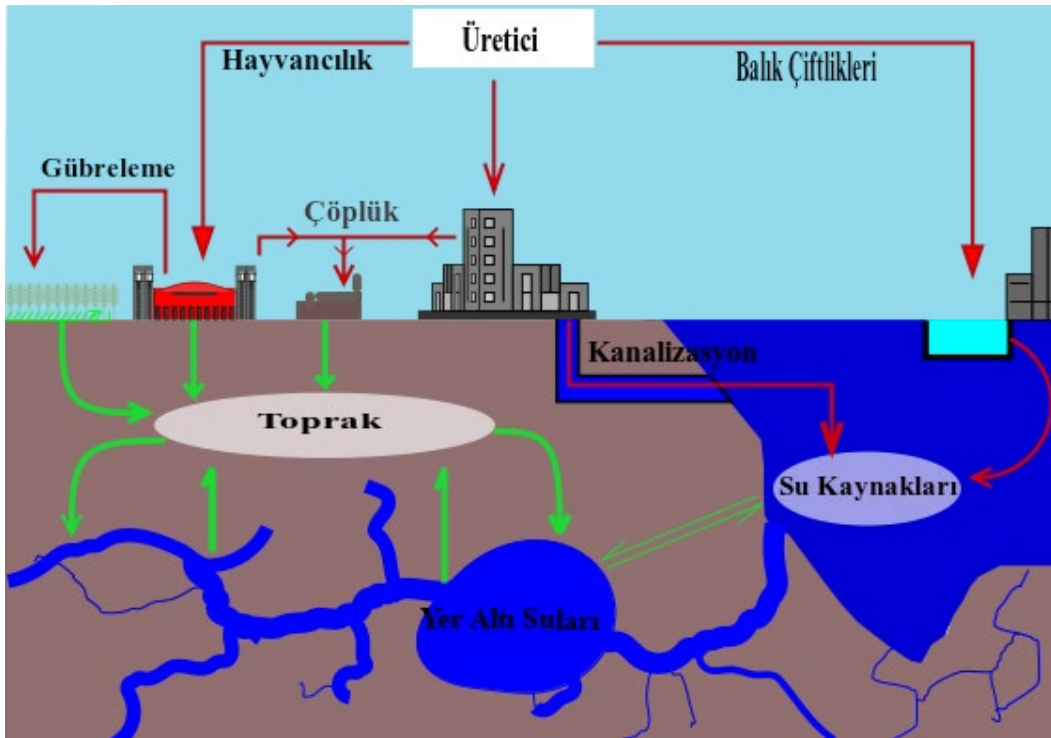
Çizelge 2.1. Antibiyotik sınıfları, örnek yapı ve genel özellikleri.

Sınıf Adı	Örnek Antibiyotik	Genel Bilgiler
β – Laktamlar	Penisilin	Beta laktam antibiyotikleri karakteristik beta-laktam halkasını içerirler. Penisilin bir beta laktam olması sebebiyle bazı yerlerde penisilinler olarak da geçer. B-laktam antibiyotikleri bakterilerin hücre duvarlarını oluşturması için gerekli olan peptidoglikan oluşumunu inhibe eder.
Makrolidler	Eritromisin	Makrolitler, makrosiklik lanton halkasına sahip antibiyotiklerdir. Bakterilerin ribozomlarına bağlanarak bakteriyel protein sentezini inhibe ederler. Geniş spektrumda bakterilere etki ederler.
Sulfonamidler	Sülfadiazin	Sulfonamidler geniş spektrum antibiyotikleridir. Bakterilerin folik asit yolağını p-amino benzoik ile benzerliği

		sonucu inhibe eder ve bakterilerin üremesini durdururlar.
Aminoglikosidler	Amikasin	Kimyasal yapılarında bir şekere bağlı amino grupları içerirler. Daha çok gram negatif bakterilerin sebep olduğu enfeksiyonlar için kullanılırlar fakat bazı durumlarda gram pozitif bakteriler için de kullanılabilir. Aminoglikosidler bakterilerin protein sentezini inhibe ederler ve bakterilerin ölmesine sebep olurlar.
Kinolonlar/ Fluorokinolonlar	Ofloksasin	Kinolonlar bisiklik yapıya sahip geniş spektrum antibiyotikleridir. Bakterilerin DNA sentezinde görev alan DNA giraz enzimine bağlanıp bakterilerin DNA sentezini engellerler.
Ansamisinler	Rifamisin	Aktinobakteriya türü bakteriler tarafından üretilen bir antimikrobiyal ajandır. Bakteriyofajlara ve bazı virüslere karşı da etki gösterirler. Bazı tür gram negatif bakteriler hariç çoğunlukla gram pozitif bakterilere etki eder.
Tekrasiklinler	Tetrasiklin	Geniş spektrum antibiyotiklerdir. Aktinobakteriya cinsi bakteriler tarafından üretilir.

2.1.3. Antibiyotik Kullanımının Zararları

Antibiyotiklerin tıbbi ve veterinerlik uygulamaları sonucunda bu kimyasal ajanlar belirli yollar vasıtası ile çevresel kaynaklara karışmaktadır. veterinerlik uygulamaları sonucu gübreler ile tarımsal gıdalara ve toprağa [32-34], tıbbi kullanımı sonucu yerleşim yerlerinden kanalizasyon [35,36] vasıtası ile su kaynaklarına ve çöplükler ile toprağı kirletmektedir. Ayrıca balık çiftlikleri de antibiyotiklerin balık yemleri ile karıştırılıp verilmesi ve bu bileşiklerin yem kalıntıları ve balık dışkıları ile direkt su kaynaklarına karışmasında rol oynamaktadır. Antibiyotiklerin çevresel kaynaklara karışma yolları aşağıdaki şekil 2.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Antibiyotiklerin doğal kaynaklara karışma yolları.

Su ve topraktaki antibiyotiklerin varlığı içme suyu, tarımsal sulama ve tarımsal kullanımı sonucu gıdalarda karşımıza tekrar çıkmaktadır. Antibiyotik kalıntıları içeren gıda ve suların uzun süreli tüketiminin sonucunda alerji ve bağırsak florasında değişme ve bunlara bağlı birçok problem gözlemlenmektedir. Ayrıca antibiyotiklerin direkt verdiği zarar harici sebep olduğu antibiyotiklere dirençli bakterilerin varlığı da önemli bir tehdittir. Bu sorunlar neticesinde antibiyotik kalıntılarının oluşturduğu sorunları engelleme veya azaltma amaçlı bazı yasal tedbirler alınmıştır. Hayvansal gıdalarda bulunabilecek maksimum antimikrobiyal

miktarı FDA, EMA gibi kurumlar ve organizasyonlar tarafından belirlenmektedir. Çizelge 2.2’de bazı antibiyotiklerin sığır yetiştiriciliğinden elde edilen ürünler için belirlenmiş maksimum kalıntı limitleri verilmiştir.

Çizelge 2.2. Bazı antibiyotikler için MRL miktarları.

Antibiyotik Türü	Kas (µg/kg)	Karaciğer (µg/kg)	Böbrek (µg/kg)	Yağ (µg/kg)	Süt (µg/L)
Amoksisillin	50	50	50	50	4
Seftiofur	1000	2000	6000	2000	100
Tetrasiklin	200	600	1200	-	100
Flumekin	500	500	3000	1000	-
Gentamisin	100	2000	5000	100	200
Pirlimisin	100	1000	400	100	100
Spektinomisin	500	2000	5000	2000	200

*2018 Sığır yetiştiriciliğinde kullanılan antibiyotiklerin MRL değerleri 2018 [37]

2.1.4. Antibiyotik Direnci

Antibiyotikler organizmaların birbirlerine üstünlük kurmak için sentezlediği birleşikler olduğu daha önce ifade edilmişti. Fakat mikroorganizmalar birbirlerine karşı antibiyotikleri kullanırken aynı zamanda diğer mikroorganizmalar tarafından üretilen bu sınıftaki bileşiklerden de kendilerini savunmak için bazı mekanizmalar geliştirmiştir. Bu mekanizmalar ile yabancı antibiyotik bileşiklerine karşı bir direnç geliştirirler ve direncin geliştiği antibiyotikten zarar görmezler. Bir bakterinin antibiyotiğe karşı direnç geliştirmesi sonucu günümüzde sıklıkla duyduğumuz antibiyotik dirençli bakteriler meydana gelir.

Bir bakteri türünün antibiyotiğe direnç geliştirmesi doğal süreçte uzun zaman alır. Fakat antibiyotiklerin keşfi ve sürekli kullanımı sonucu, mikroorganizmalar da bu duruma daha hızlı yanıt vermeye başlamıştır ve direnç gelişimi hızlanmıştır. Penisilinin keşfinden sadece 12 yıl sonra penisiline karşı direnç gösteren ilk bakteri popülasyonlarının varlığı keşfedildi [38]. Antibiyotiklere karşı direnç fark edildikten sonra bu olay incelenmiş ve sebepleri açıklığa kavuşturulmuştur. Araştırmalar sonucu direnç gelişiminin birçok farklı mekanizma ile gerçekleşebileceği fark edilmiştir. Bakteriler, antibiyotiklere karşı genetik düzeyde değişimler ile antibiyotik dirençli genler (ARGs) kazanırlar [39].

Antibiyotiklere karşı geliştirilen direnç geliştirme yolları ise;

I-Bakteri zarının geçirgenliğinin değişmesi ile antibiyotikleri hücre içine almaması

II-Hedef antibiyotiğin aktif şekilde hücre içinden atılması

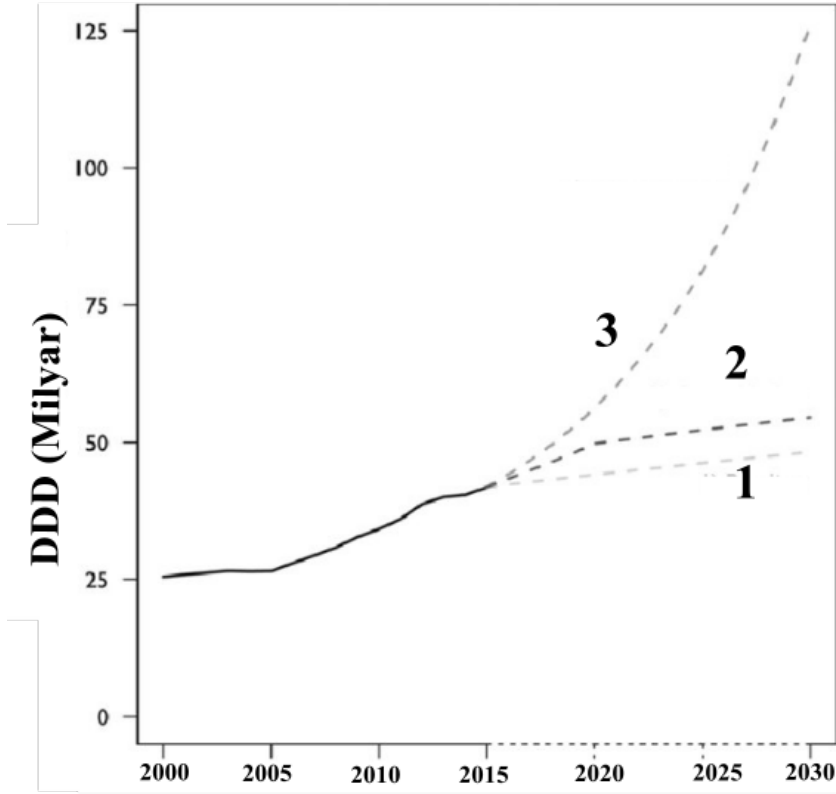
III-Antibiyotiklere karşı enzimlerle saldırı

IV-Antibiyotikler tarafından inhibe edilen yolak için diğer alternatif yolakların gelişmesi

V-Antibiyotik hedeflerinin modifikasyona uğrayıp antibiyotiklerin etkisini kaybettirme

VI-Antibiyotiğin hedeflediği yapının aşırısının sentezi

Bakterilerin üstte verilen metotlarla direnç geliştirmesinin yanı sıra antibiyotiklerin direnç kazanmamış bakterilerin ölümüne sebep olması veya üremesini engellemesi direnç geliştirmiş bakterilerin diğer bakterilerle rekabetinde üstün konuma geçmeyi sağlamakta ve popülasyonunda hızla artışına sebep olmaktadır. Günümüzde bu sorun tehlikeli bir durum almıştır ve antibiyotik dirençli bakteriler sıklıkla duyduğumuz bir terim haline gelmiştir [40-42] ve antibiyotiklere karşı dirençli mikroorganizma sayısı antibiyotik kullanım miktarı ile artmakla birlikte birçok canlı yaşamı için tehdit oluşturmaktadır. Bu dirençli bakterilerin sebep olduğu hastalıklar sahip oldukları direnç dolayısıyla zorlaşmakta ve tedavisinde kullanılan antibiyotiklere yanıt vermemelerini sağlamaktadır [43-46].

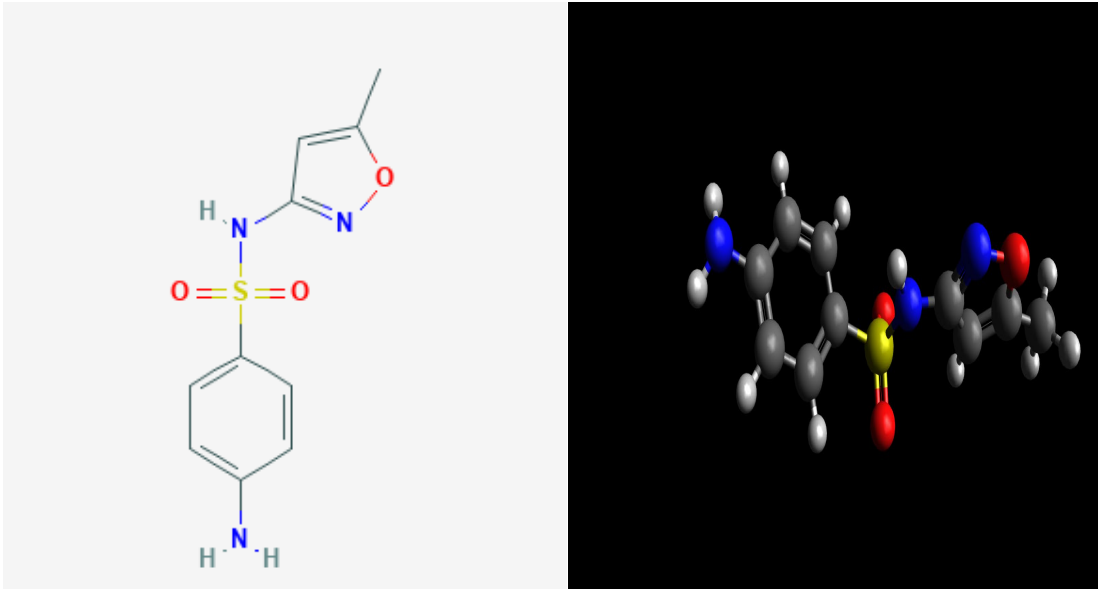


Şekil 2.2. Yıla bağlı küresel antibiyotik kullanımındaki değişim. Ayrıca 2030'a kadar ulaşması düşünülen tüketim miktarı grafikte bulunmaktadır. (1) Antibiyotik tüketimi tüm ülkelerde anlık kişi başı kullanım miktarı ile alınmaya devam edildiğinde (2) Tüm ülkeler önerilen kullanım oranı kullanımı azaltırsa (3) Anlık yıllık büyüme oranı ile orantılı devam ettiğinde [47].

Her ne kadar antibiyotik direnci ve dirençli bakterilerin varlığı uzun süredir bilinip oluşturduğu potansiyel tehdit ifade edilse de antibiyotiklerin sağladığı avantajlar dolayısıyla antibiyotik kullanımı yeterli miktarda azaltılamamakta ve kullanımı insan nüfusu ile orantılı olarak her yıl artmaktadır. Şekil 2.2'de görülebileceği gibi 2000 ile 2015 yılları arasında 76 ülke arasında yapılmış inceleme göstermiştir ki günlük antibiyotik kullanımı (DDD) %65 artmış (21,1 milyar günlük dozdan 34,8 milyar günlük doza) ve antibiyotik kullanım oranı ise %39 artmıştır (1,000 kişi için günlük 11.3'ten 15.7 günlük doza). Antibiyotiklerin kullanımının değişmediği varsayılırsa 2030 yılına kadar kullanımın %300'e kadar artma ihtimali bulunmaktadır [47].

2.1.5. Sülfametoksazol

Sulfonamidler de çevre kirliliğine sebep olan antibiyotikler arasındadır [48,49]. Bir sülfonamid antibiyotiği olan sülfametoksazol (SMX veya SMZ) de klinik olarak kullanıma sahip, önemli bir kimyasal ajandır. SMX Bakteriostatik bir ajan olup bakterilerin çoğalması için gerekli yapıtaşlarının sentezini engellerler [51,52]. Bu ilaç folik asit metabolizmasını inhibe edebilmesinden dolayı hem gram pozitif hem de gram negatif bakterilere etki edebilen geniş spektrum antibiyotikleri arasındadır. Sülfametoksazolün metabolizmadan atımı idrar ve dışkı ile yapılır [50]. Bunun sonucunda sülfametoksazol diğer antibiyotikler gibi kanalizasyona ve doğal kaynaklara karışmaktadır. Ayrıca sülfametoksazolün hayvancılıkta kullanımını sonucu gıdalarda da karşımıza çıkmaktadır [53,54].



Şekil 2.3. Sülfametoksazolün kimyasal yapısı. Sol; Açık yapısı [51] sağ; üç boyutlu gösterimi.

Sülfametoksazolün özellikleri: IUPAC adı 4-amino-N-(5-metil-1,2-oksazol-3-yl) benzen-1-sulfonamid olan C₁₀H₁₁N₃O₃S kapalı formülüne sahip, ortalama molekül ağırlığı 253.279 gr/mol neredeyse beyaz, kokusuz bir bakteriostatik ajandır. Sülfametoksazolün molekül yapısı ve üç boyutlu konformasyonu sırası ile şekil 2.3'te gösterilmiştir [51].

Sülfametoksazol ve diğer sülfonamid antibiyotikleri gibi dihidrofolat sentaz enzimine bağlanır. Sülfametoksazol dihidrofolat sentazın kendi substratı olan p-amino benzoik asit ile benzer yapıya sahiptir ve bu substratın yapısal analogudur. Bu benzerlik sayesinde p-amino benzoik asit gibi dihidrofolat sentaza karşı yüksek ilgiye sahip olup enzimin asıl substratı olan p-amino benzoik asit ile bağlanmada yarışır ve bağlandığında ise enzimi inhibe eder. Bakterilerde dihidrofolat sentazın inhibisyonu folik asit sentezini engeller böylelikle bakterilerin çoğalması için gerekli temel yapıtaşlarının sentezi durdurulmuş olur. İnsanlarda folik asit beslenme ile alındığı için bu bileşik direkt olarak etki etmez.

Sülfametoksazol Amerika'da 1961 yılında patentlenmiş, genellikle piyasada trimethoprim ile satılmaktadır. Sülfametoksazol insanlarda klinik olarak trimethoprim ile birlikte gösterdiği uyumdan dolayı idrar yolu enfeksiyonlarında [52,55] ve gastrointestinal sistemdeki bakteri enfeksiyonlarının tedavisi için, ayrıca HIV hastaları için enfeksiyonlarla mücadele amaçlı önleyici olarak diğer antibiyotikler ile kullanılmaktadır [52,56,57]. Sahip olduğu kullanımdan dolayı sülfametoksazol ve yanında verilen diğer antibiyotikler ile dünya sağlık örgütünün temel ilaçlar listesinde de bulunmaktadır [55].

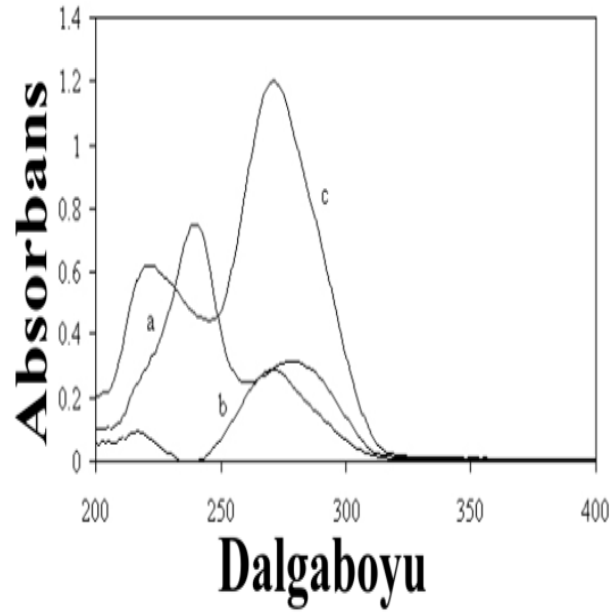
Sülfametoksazolün bazı farmakolojik özellikleri: İlaç tablet olarak oral yolla uygulanmakta olup enjeksiyon veya bölgesel kullanımı mümkündür. Sülfametoksazol vücutta oral yolla alındığında %80-%90 biyoyararlanıma sahip, hızla emilen ve taşınımının %70'ı kan proteinlerinde (başlıca albümin) yapılır [52,56]. Başlıca Arylamin N-Asetil transferaz tarafından N4 pozisyonundan asetillenmesi ile metabolize edilir [58]. Eliminasyonu ise büyük çoğunluğu böbrekler tarafından kan dolaşımından filtrelenmesi ile idrar ile atılır. Oral yolla alınan dozun yaklaşık %84,5'i 72 saat içerisinde idrar ile dışarı atılır. Bu oranın yaklaşık %30'u serbest Sülfametoksazol formunda geri kalanı ise metabolize olmuş ürünleridir. Sülfametoksazolün klinik uygulamasında hedef alınan bazı mikroorganizmalar çizelge 2.3.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. Sülfametoksazolün etki ettiği bazı mikroorganizmalar.

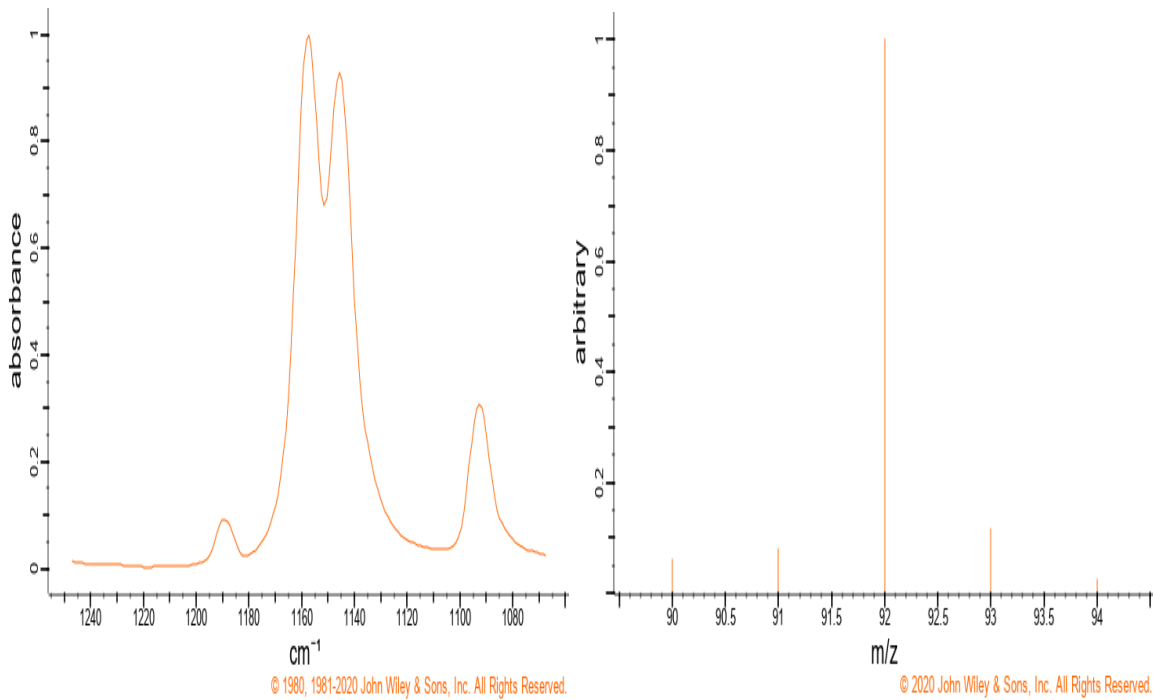
<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>Pneumocystis carinii</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Shigella</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Streptococcus viridans</i>	<i>Morganella morganii</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Klebsiella spp.</i>
<i>Salmonella spp.</i>	<i>Brucella melitensis</i>
<i>Nocardia asteroides</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i>
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	<i>Streptomyces somaliensis</i>

* Sülfametoksazolün etki ettiği mikroorganizmalar pubchem, drugbank [52,56].

2.1.5.1. Sülfametoksazolün Kimyasal Tayini



Şekil 2.4. Sülfametoksazolün UV-VIS absorpsiyon spektrum.a: Sülfametoksazol ve Trimethoprimin UV-absorpsiyonunun spektrum b: Sülfametoksazol c: 6 µg/mL derişimi için trimethoprim ve Sülfametoksazolün karışımı [59].



Şekil 2.5. (a): Sülfametoksazolün FTIR absorpsiyon spektrum (b): Sülfametoksazolün kütle spektrum [60].

Sülfametoksazolün sahip olduğu kullanım ve ticari değerinden dolayı farmakoloji, tıp, gıda veterinerlik ve çevre bilimlerinde birçok amaçla kalitatif ve kantitatif tayininin yapılması gerekmektedir. Bu bileşiğin tayinin absorpsiyon yapan grupları sayesinde UV-VIS spektrofotometresi ile ve FT-IR ile yapılabilmektedir. Fakat bu yöntemler ile ölçülebilmesine rağmen sülfametoksazol ile verilen trimethoprim ile girişim yapabildiği için direkt spektral yöntemler yerine kromatografik yöntemlerin kullanılması önerilmektedir. Spektroskopik tayin için bu tayinlerin öncesi türevlendirme yapılarak ölçüm mümkündür. Sülfametoksazol ve trimethoprimin UV-VIS absorpsiyon spektrumu, sülfametoksazolün FT-IR ve MS spektrumu şekil 2.4 ve şekil 2.5'te verilmiştir. Spektroskopik yöntemler dışında elektrokimyasal yöntemler (amperometrik, voltametrik) ile de ölçümü yapılabilir. Sülfametoksazolün kimyasal tayininin yapıldığı bazı çalışmalar çizelge 2.4.'de verilmiştir.

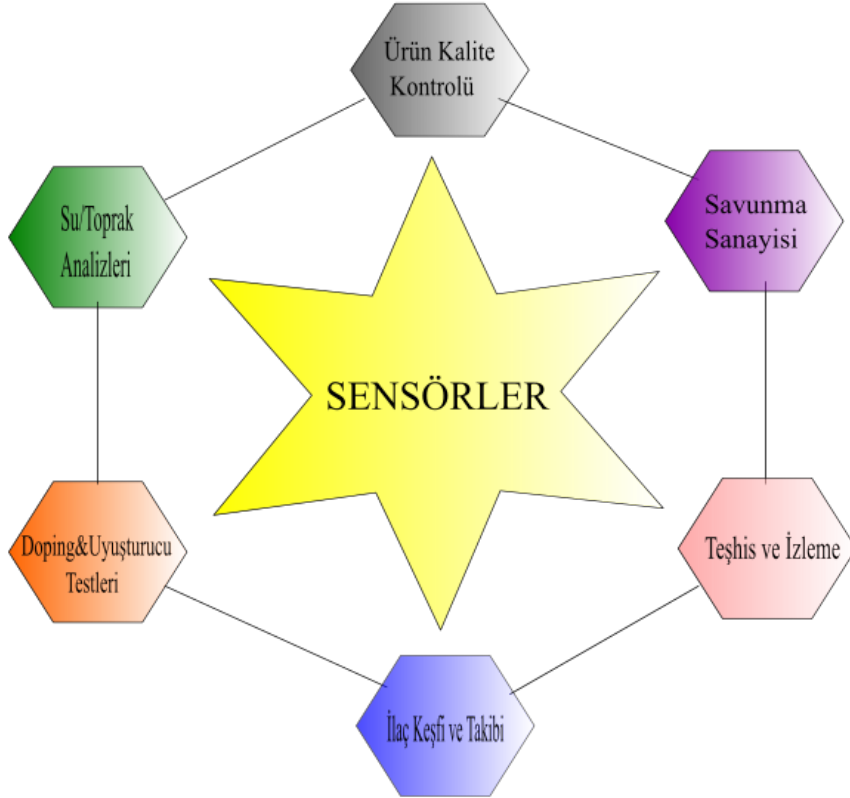
Çizelge 2.4. Klasik tayin yöntemleriyle yapılmış sülfametoksazol tayinlerinin LOD, LOQ değerleri.

Yöntem	LOD	LOQ	Derişim Aralığı	Referans
HPLC	1.21 µg/ml	4.03 µg/ml	10.0-50.0 µg/ml	[61]
UV-VIS Spektrofotometri	1.02µg/ml	3.04 µg/ml	5-300 µg/ml	[62]
HPLC-DAD	2.0 µg/ml	6.0 µg/ml	60-500 ng/ml	[63]
UV-VIS Spektrofotometri	0.589 µg/ml	1.964 µg/ml	2–10 µg/ml	[64]
UV-VIS Spektrofotometri	0.38 µg/ml	1,14 µg/ml	2–20 µg/ml	[65]
HPLC	0.2 µg/ml	0.6 µg/ml	30–2000 ng / L	[66]
HPLC-Tandem	0.9 µg/ml	2.5 µg/ml	30–2000 ng / L	[67]

2.2. Sensörler

Günümüzde üretimin her basamağında düzenli olarak kalite kontrol ve inceleme amaçlı analizlerin yapılması gerekmektedir. Yapılan bu tayinler ve sonuçları doğrudan veya dolaylı olarak hem bizi hem de çevremizi etkilemektedir. Bu analizlerin yapılması olası bir sorunun

engellenmesini sağlamak ve kalite artışına sebep olmaktadır. Bu tayinler genellikle kromatografi ve spektrofotometri gibi klasik tayin yöntemleriyle yapılmaktadır. Fakat bu tayinler bazı dezavantajlara sahiptir. Bu dezavantajlara tayinlerin uzun süre alması, pahalı cihaz ve ekipmana ihtiyaç duyması ve teknik bilgiye sahip analiste gereksinimi örnek olarak verilebilir. Bu dezavantajlardan dolayı klasik yöntemlere alternatif olabilecek yeni metotların geliştirilmesi uzun süredir denenmektedir. Bu alanda kullanılacak bir alternatif yöntem sensör teknolojisi.



Şekil 2.6. Sensörler ve kullanım alanları.

Sensörler etrafındaki değişim sonucu bir sinyal oluşturabilen cihazlardır. Çevresindeki termal, elektriksel, manyetik veya kimyasal bir değişimi algılayıp bunu okunabilecek bir sinyale çevirirler. Sensörler genellikle ufak boyutlarda üretilebilmesi, hızlı ve yüksek duyarlılığa sahip olabilmesi nedeniyle günümüzde birçok alanda yer bulma potansiyeline sahiptir (şekil 2.6). Sensörlerin kullanım bulduğu alanlara örnek vermek gerekirse; Su ve gıdalarda toksik madde analizi [68,69] ve mikroorganizmaların incelenmesi [70,71], toprak analizleri [72,73], tıbbi ve veterinerlikte ise hastalık yapıcı patojenler [74-76] alerjenler [77,79] ve biyobelirteçlerin tespiti [80] ile hastalık teşhisi amaçlı, eczacılıkta yeni ilaçların

analizi [81,82], adli bilimlerde doping ve uyuşturucu testleri [83,84] örnek olarak gösterilebilir.

2.2.1. Biyosensörler

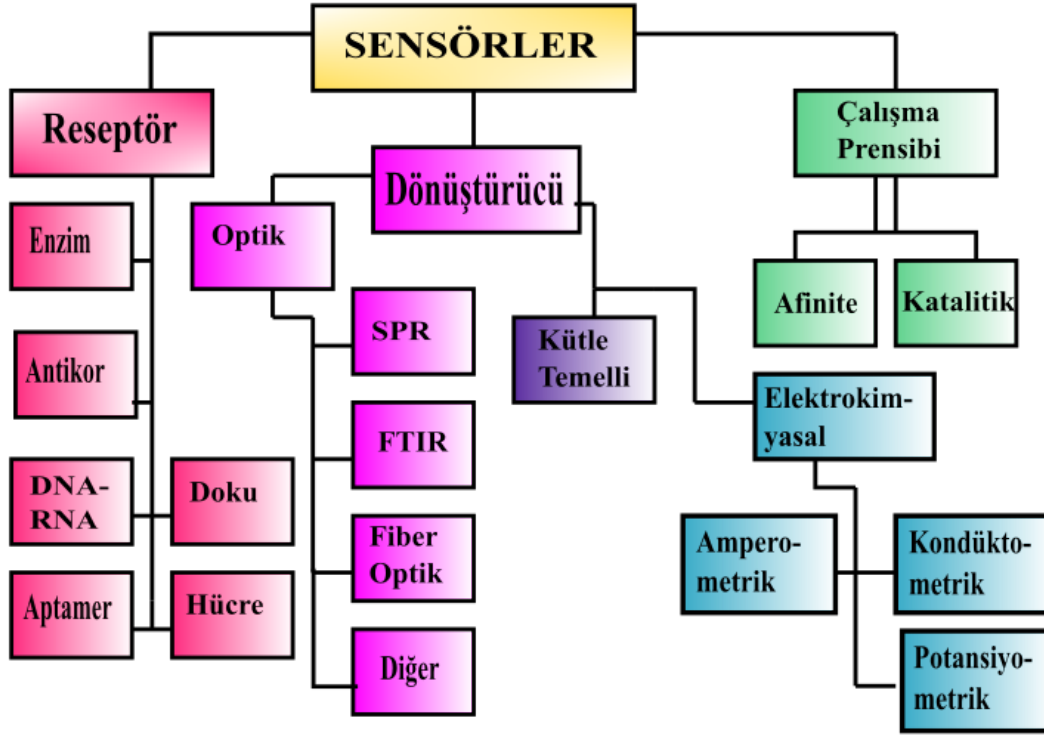
Biyosensörler sensör teknolojisinin biyolojik yapılarla birleştirilmesi ile oluşturulmuş yapılardır. Bu sensörler enzim, antikor, aptamer gibi yüksek özgüllüğe sahip biyolojik bileşenleri reseptör olarak kullanarak belirli bir hedef molekülü yüksek seçicilikle tanıyabilir. Bu yüksek seçicilikte tanıma sayesinde hedef molekül için yüksek duyarlılıkta kalitatif ve kantitatif tayin yapabilen bir biyosensör üretilebilir.

Biyosensörlerin keşfi 1906 yılına kadar dayansa da şu an ki tanıma uyan ilk biyosensör 1953 yılında Leland C. Clark Jr. tarafından oksijen ölçümü için yapılmıştır [85]. Ardından gelen birkaç araştırma sonrası 1975 de ilk defa Yellow Spring Instruments tarafından ilk ticari biyosensör olan ISFET (Ion sensitive field effect transistor) piyasaya sunuldu [86]. Aynı firma tarafından 1975 de ilk ticari kan şekeri (glukoz) ölçücü biyosensör piyasaya sunuldu.

Doğal biyoreseptörlerin ilk kullanıldığı çalışmalardan biri ise yine 1975 yılında etanol ve laktik asit için yapılan dehidrogenaz enzimleri bulunan membran kaplı elektrotlar ile yapılmıştır [87].

2.2.1.1. Biyosensörlerin Bileşenleri ve Sınıflandırılması

Biyosensörler genel olarak 3 temel birleşenden oluşmaktadır. Analiti tanımlayacak bir biyoreseptör, biyoreseptörde meydana gelecek değişimi başka bir sinyal türüne dönüştürebilen bir dönüştürücü ve dönüştürücüden gelen sinyali okuyabileceğimiz veriler haline getiren elektronik kısımlar ve sinyal okuyuculardan oluşur.



Şekil 2.7. Biyosensörlerin sınıflandırılması

Biyosensörler farklı tür ve özellikte üretilebildiği için bunları kendi içlerinde sınıflandırmak mümkündür. Biyoreseptörleri sınıflandırmak için sıkça iki yol kullanılır.

Bu sınıflandırma yöntemleri;

- Biyosensörün sahip olduğu biyoreseptör türü (protein, nükleik asit, karbonhidrat vs)
- Sinyal dönüştürücünün türü (Mekanik, optik, elektrokimyasal)

2.2.1.2. Biyoreseptörler

Sensörün analit yapıyı tanımasının meydana geldiği bileşenidir. Biyosensörlerde farklı yapıda biyoreseptörler kullanılabilir. Bu biyoreseptörler; enzim [88-91], antikor [91-94], nükleik asitler [96], hücre reseptörleri gibi yüksek biyoseçiciliğe sahip makromoleküller olabildiği gibi bir hücre organeli [97-99], hücre [100,101] veya doku kaynaklı yapılar [102-104] da biyoreseptör olarak kullanılabilir. Ayrıca canlı organizmalardan elde edilen doğal biyoreseptörler harici, moleküler baskılı polimerler [105-109] ve membranlar [110,111] da biyosensör uygulamalarına sahiptir. Bu tür reseptörlerin en büyük avantajı doğal

biyoreseptörlerin kullanılmayacağı ortamlara özel olarak üretilebilmesi ve maliyetinin doğal reseptörlere kıyasla daha az olmasıdır. Aşağıda sensörlerde kullanılan reseptörlerin bazı özellikleri verilmiştir;

Enzimler: Enzimler protein yapısındaki, bir tepkimeyi belirli mekanizmalar sayesinde kataliz edebilen biyomoleküllerdir. Bu yapılarda kendi substratları için yüksek özgüllükte bağlanma bölgelerine sahiptir. Fakat enzimlerin saflaştırma maliyeti yüksektir ve diğer protein yapıdaki biyomoleküller gibi sadece ‘ılımlı’ şartlarda çalışabilir. Ayrıca katalitik aktiviteleri bazı bileşikler üzerinde kullanılmasını kısıtlayabilir[88-91].

Antikorlar: Antikorlar kazanılmış bağışıklık sistemi tarafından bir antijene karşı üretilmiş proteinlerdir. Antijen molekülüne karşı çok yüksek ilgi gösterirler. Antikorlar iki ağır iki de hafif zincir olmak üzere 4 subunitten oluşur. Antikorlar istenilirse hibridoma teknolojisi ile yüksek miktarda üretilebilir fakat saflaştırma maliyeti yüksektir [91-94],

Aptamerler: Belirli bir protein veya nükleik asit yapısına yüksek özgüllükte bağlanabilen kısmen ufak, oligomerlerdir. Aptamerler peptit veya nükleotit yapıda olabilir. Kısmen ufak olması ve dayanıklı olması aptamerlerin biyoreseptör olarak kullanılmasında avantaj sağlamaktadır [95].

Nükleik Asitler: DNA, RNA ve polinükleotitler yapısı sebebi ile komplementer zincirlere yüksek ilgiyle bağlanır. Ayrıca belirli nükleotit dizilerini tanıyan proteinler için yüksek seçiciliğe sahiptir. Nükleik asitlerin reseptör olarak kullanılmasının en büyük avantajı yapay olarak sentezinin mümkün olması ve elde edilen zincir ile çoğaltılmasının kolay olmasıdır [96],

Hücreler: Hücreler belirli yöntemlerle hazırlanan yüzeylere sabitlenebilmesi ve çevresindeki değişime duyarlı olması özelliklerinden dolayı bir sensörde biyoreseptör olarak kullanılabilir. Bu reseptörler direkt hücrenin kendisini kullandığından saflaştırma basamağı gerekmez ve daha kolay elde edilir [100,101].

Moleküler Baskılı Polimerler: Moleküler baskılı polimerler üzerinde istenilen bir molekül için spesifik bağlanma bölgeleri içeren polimerlerdir. Bu reseptörlerin üretiminin genellikle kolay ve ucuzdur. Ayrıca protein yapıdaki reseptörlere kıyasla daha farklı fiziksel ve kimyasal şartlara dayanacak şekilde üretimi mümkündür [105-109].

Membranlar: Membranlar seçici geçirgen yapıya sahip iki fazı birbirinden ayıran yapılardır. Bu seçici yapıları sayesinde bir ortamdan sadece istenilen molekülü geçirmesi sağlanabilir. Özellikle bu yapılar saflaştırma işlemlerinde kullanılmaktadırlar [110-111].

2.2.1.2.1. Dönüştürücüler

Dönüştürücü reseptör yapı ile analit arasındaki etkileşim sonucu meydana gelen değişimi ölçebileceğimiz bir sinyal türüne çevirmeye yarayan sensör bileşenleridir. Bu dönüşüm bir reaksiyon tarafından kaynaklanan değişim sonucu çevredeki elektrokimyasal değişim veya analitlerin bağlanması sonucu dönüştürücü yüzeyindeki artan tabaka kalınlığına bağlı meydana gelen değişimler olabilir.

Dönüştürücüler mekanik, optik ve elektrokimyasal olmak üzere birbirinden ayrılır (şekil 2.7.). Biyosensör uygulamalarında yaygın kullanılan dönüştürücüler; Yüzey plasmon rezonansı (SPR), Alan etki transistörleri (FET), Metal nanopartikül elektrotlarıdır.

2.2.1.2.1.1 Optik Dönüştürücüler

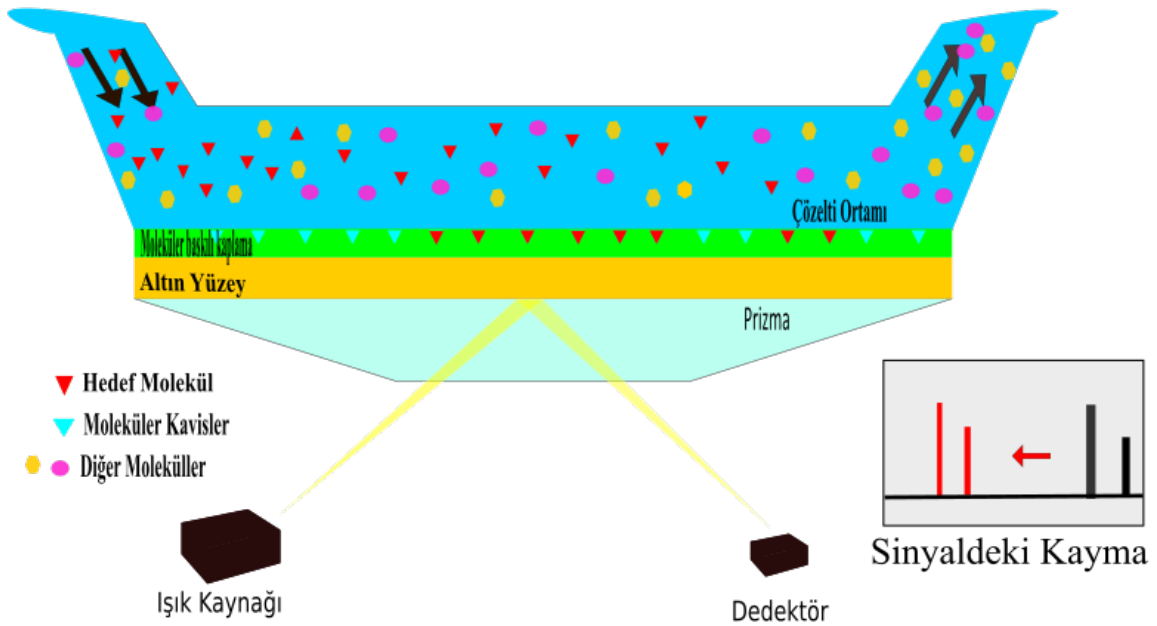
Optik dönüştürücüler biyoreseptör ve hedef molekül arasındaki etkileşim sonucu oluşacak bir optik değişimden faydalanarak ölçüm yapar. Bu belirli bir dalga boyundaki absorpsiyondaki azalma veya artma, ışığı kırma indisindeki değişim gibi değişimler olabilir. Biyosensörlerdeki optik sensörleri iki şekilde ayırmak mümkündür.

Etiketli Ölçüm Yapan Optik Sensörler: Bu tür optik sensörler bağlanma sonucunda bir etiketin ayrılması veya bağlanmasına bağlı olarak ölçüm yapar. Genellikle bağlanma sonucu etiket molekülün absorpsiyonu ölçülür. Etiket miktarı bağlanmaya bağlı olarak

değişeceğiinden absorpsiyonda bağlanma miktarına orantılı olacak şekilde değişecektir. ELISA bağışıklık testi (immunoassay) etiketli optik ölçümler için en bilindik örneklerdir.

Etiketsiz Ölçüm Yapan Sensörler: Etiketsiz ölçümler bir etiket moleküle ihtiyaç duymadan ölçüm yapabilir. Etiketli yöntemlerle kıyaslandığında daha hızlı ve ön işlem gerektirmezler. Yüze plazmon rezonansı dönüştürücüleri etiketsiz dönüştürücülere örnek olarak verilebilir.

Yüze plazmon rezonansı biyosensörlerde kullanılan bir optik dönüştürücü olup sıkça bağlanma ve ayrılma biyokimyasal olaylarını incelemek için kullanılır. Ölçüm için herhangi bir etiket molekül gerektirmemesi, ufak moleküllerden büyük hücrelere kadar geniş bir aralıkta ölçüm yapabilmesi, yüksek duyarlılığa sahip olabilmesi ve gerçek zamanlı ölçüm yapabilmesinden dolayı bu dönüştürücüler biyokimya, moleküler biyoloji ve biyolojide yaygın kullanıma sahiptir [112-114].

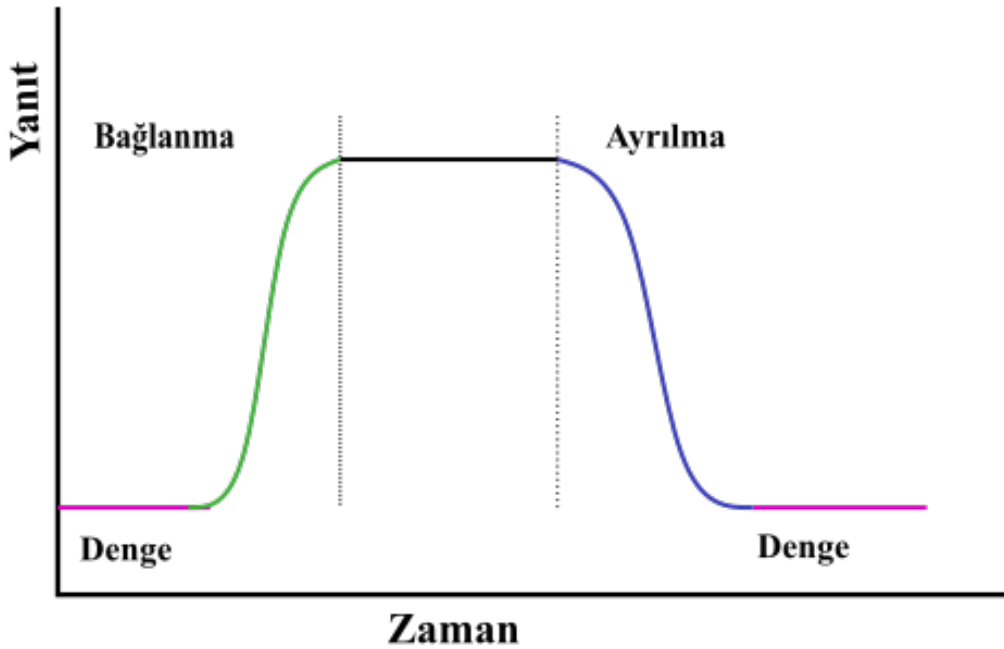


Şekil 2.8. Yüze plazmon rezonansı.

Yüze plazmon rezonansının tarihçesine bakarsak: Metal yüzeye yansıyan polarize ışıktaki kırılmanın gözlemlenmesi 1902 yılında R.W. Wood'un gözlemleri ile başlamıştır [115]. Daha sonraki yıllarda gözlemlenen bu olay açıklanmış ve böylelikle yüze plazmon

rezonansı aydınlığa kavuşmuştur. Yüzey plazmon rezonansı kullanan biyosensörün geliştirilmesi ise 1980'li yıllara dayanmaktadır [116,117].

Bu tür biyosensörlerin çalışma prensibi: Soy bir metalle kaplı (genellikle altın) bir prizma üstündeki biyoreseptörün hedef moleküle bağlanması sonucunda çip üzerinde elektriksel geçirgenlikte bir değişimi meydana gelir. Bu geçirgenlikteki değişim sonucu bir başka yüzeyden altın çipe gelen polarize ışık yansırken kırma indisinde değişim olur. Şekil 2.8'de moleküler baskılı bir altın SPR çipi üstünde gerçekleşen bu olay resmedilmiştir. Zamana bağlı, SPR çipinden alınan sinyalin (yanıt) değişimi grafiksel olarak ifade edilimi sonucu sensogram adı verilen grafikler elde edilir. SPR çipinden gelen yanıt miktarı çip yüzeyindeki bağlanma ve ayrılma olayları ile ilişkili olduğundan, elde edilen sensogramlar ile bağlanma ve ayrılma olayları incelenebilir. Şekil 2.9'da bir SPR sensörünün sensogram örneği verilmiştir. Şekilde görüldüğü üzere sensör yüzeyinde bağlanma miktarı arttıkça verilen sinyal artmakta iken sensör yüzeyindeki bağlanma azaldıkça verilen sinyal miktarı azalmaktadır.



Şekil 2.9. SPR sensogramı örneği.

SPR uygulamalarının avantajları olduğu gibi bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Lingandın çözelti içerisinde doğal konfigürasyonunu koruyamaması sonucu bağlanma ve

ölçüm etkilenir, çipin ve reseptörün yönelimi bağlanmayı sterik olarak engelleyebilir, SPR sensörü çip üstündeki yığılmayı ölçtüğü için spesifik olmayan bağlanmalar ve çip yüzeyindeki reseptörün yüzeydeki homojen olmayan dağılımı sensörleri geliştirirken ve kullanırken dikkat edilmesi gereken bir durumdur [118,119]. Ayrıca bu sensörler için kullanılan altın çiplerin maliyeti de göz önünde bulundurulmalıdır.

2.2.1.2.1.2 Alan Etki Transistörleri (FETs) Temelli Sensörler

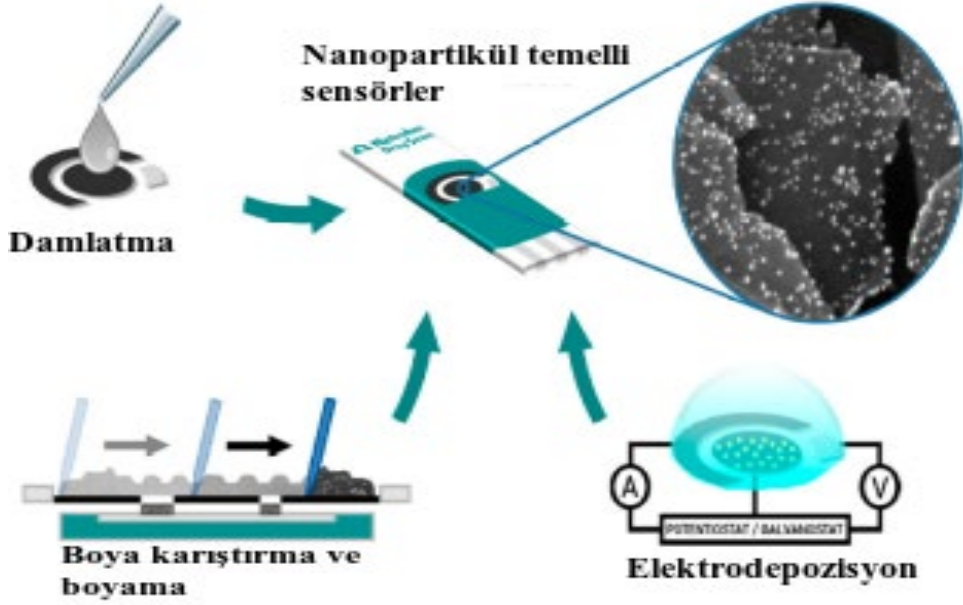
Alan etki transistörleri bir biyolojik bileşen ile birleştirilerek bir biyosensör olarak kullanılabilir. Biyolojik duyarlı alan etki transistör biyosensörleri (BioFET), bir alan etki transistöründeki akım değişiminden faydalanarak ölçüm yapar. Alan etki transistörleri bir yarıiletken yapılmış bir giriş bir çıkış bir de kontrol ucu olan çok ufak boyutlarda üretilen elektronik parçalardır. Bu transistörler giriş, çıkış ve kontrol olmak üzere üç uca sahiptirler. Sahip oldukları kontrol ucundan geçen akım miktarına bağlı olarak giriş ucundan çıkışa giden akım miktarı değişir [120].

Birçok BioFET sensörünün çalışma prensibi ise biyoreseptöre bağlı transistörün kontrol ucundaki birikime bağlı ölçüm yapar. Biyoreseptör ile analit etkileştiğinde (bağlanma veya ayrılma) transistörün kontrol ucundaki yüzey yükü yoğunluğunun değişir. Kontrol ucundaki yüzey yükü değişimi ise kontrol ucundaki elektriksel akım miktarını değiştirir bu da giriş ve çıkış uçları arasındaki akımdaki değişimle sonuçlanır [121,122]. Değişen akım miktarı gerekli matematiksel işlemlerle çözümlenir ve biyoreseptörde meydana gelen etkileşim bu sayede ölçülebilir. Fakat FET biyosensörleri debye boyu kadar alandaki yükü de ölçer. Bu sebepten dolayı ölçüm yüklerden dolayı perdelenebilir [123].

2.2.1.2.1.3 Metal Nanopartikül Elektrotu Sensörler

Nanoteknolojinin gelişmesi birçok alanda olduğu gibi biyosensör teknolojisinde de yeniliklere sebep olmuştur. Özellikle altın nanopartiküller sahip olduğu özelliklerden dolayı sensör uygulamalarına konu olmaktadır [124,125]. Bu partiküllerin sunduğu yüzey alanı, üretiminin kolaylığı ve kolayca modifiye edilebilen yüzey kimyasına sahip olması bu tür nanopartikülleri sensör uygulamalarına sıkça dahil eder [126] Ayrıca altın ve diğer soy

metal nanopartiküller biyouyumluluğu sebebiyle birçok in vivo uygulamada teşhis amaçlı kullanıma sahiptir [126,127].



Şekil 2.10. Metal nanopartikül elektrotlar [128].

Metal nanopartikül elektrotlu sensörlerde metal nanopartiküller ile genellikle bir elektrot modifiye edilir ve daha önce bahsedilen metal nanopartiküllerin avantajlarından dolayı çeşitli ölçümler için kullanılır.

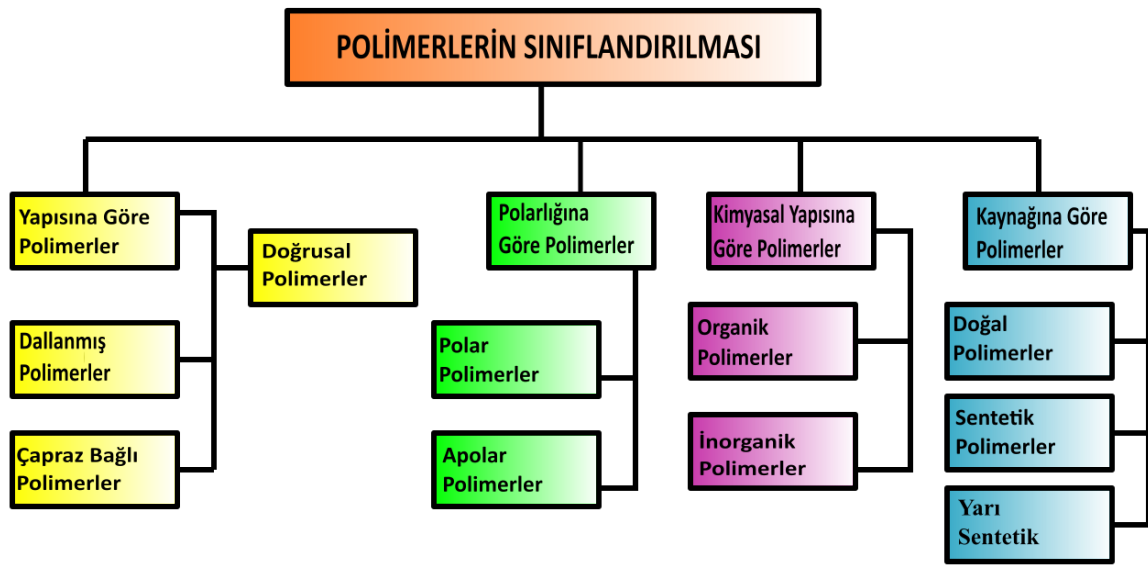
Bu yöntem ile elektrot hazırlamak için genellikle şekil 2.10'da gösterilen üç yöntemden biri kullanılır. Bunlardan ilki damla dökümü metodu direkt hazırlanmış nanopartikülleri elektrot yüzeyine bırakmaktır. İkinci yöntem olan elektrodepozisyon yönteminde nanopartiküller elektrot yüzeyine elektrodepozisyon ile yerleştirilir. Üçüncü yöntem olan boya karışımı metodu ise genellikle karbon tarzı iletken partiküller ile çözücü ve metal nanopartiküllerin karıştırılmasıyla yapılır ve diğer yöntemlere kıyasla üretimi daha farklıdır [128].

Bu tür sensörlerin kullanımını başlıca sağlık, gıda ve kozmetikte metal nanopartikül elektrotlu sensörlerin kullanımı artmaktadır [129,130].

2.3. Polimerler ve Moleküler Baskılama Yötemi

2.3.1. Genel Bilgiler

Polimerler birçok ufak molekülün (monomer) bir araya gelmesiyle oluşan büyük yapılardır [131]. Polimerler, polimeri oluşturan monomerin fiziksel ve kimyasal özellikleri, birden fazla monomer cinsi içeriyorsa bu monomerlerin sıralanma şekli, sırası ve polimerleşme yöntemine göre çok geniş bir aralıkta farklı özellikler gösterebilirler [131]. İstenilen özelliğe sahip polimerlerin elde edilebilmesi sayesinde bu malzemeler birçok alanda kullanıma sahip olmuştur.



Şekil 2.11. Polimerlerin sınıflandırılması.

Polimerlerin sınıflandırılması ise farklı özelliklere sahip olabilmesinden dolayı birçok yöntem ile sınıflandırılabilir, Şekil 2.11’de sınıflandırma yöntemlerinden bazıları verilmiştir. Sınıflandırmayı polimerin kaynağına (doğal, sentetik ve yarı sentetik), polimerin yapısına (doğrusal, dallanmış, matriks), polimerin polarlığına göre (polar, apolar) veya kimyasal yapısına göre (organik veya inorganik) yapmak mümkündür.

2.3.2. Moleküler Baskılama Yöntemi

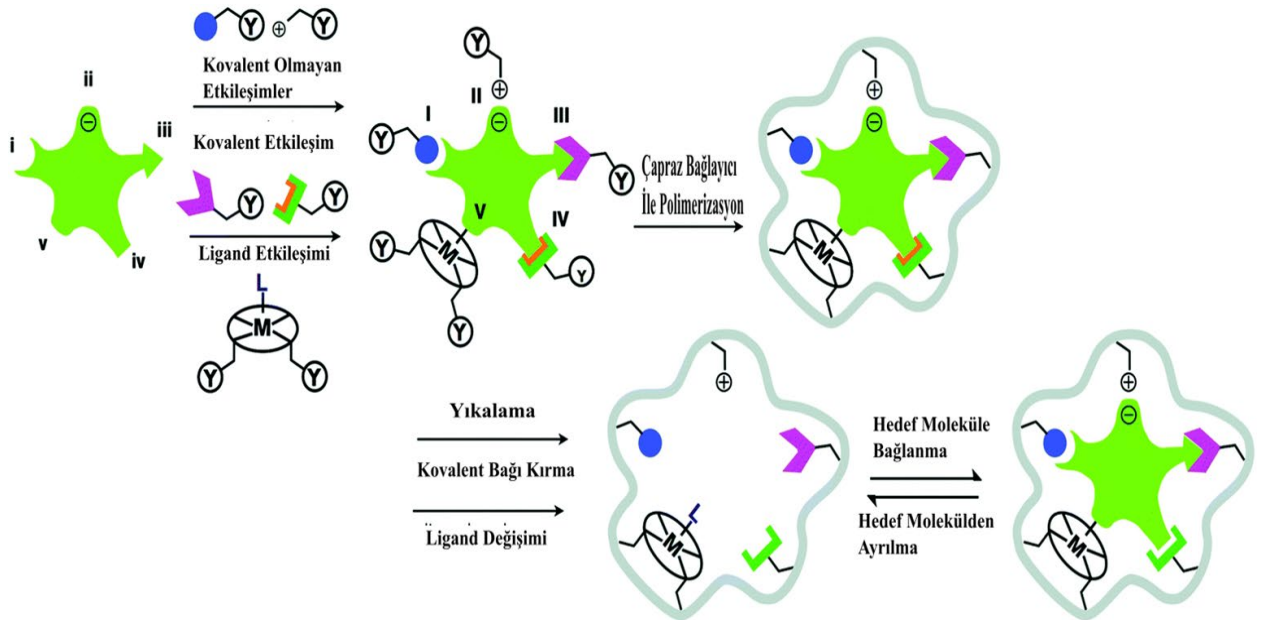
Moleküler baskılama yöntemi polimer teknolojisi kullanılarak istenilen bir molekül için (kalıp molekül) uyumlu moleküler kavite oluşturabilmemizi sağlar [132,133]. Moleküler baskılama sonucu oluşturulan polimerlerde kalıp molekül ile hem geometrik hemde kimyasal uyumluluğa sahip moleküler kavisler oluşur ve bu kavisler kalıp molekül için yüksek ilgiye ve seçiciliğe sahiptirler [134,135] Bu kavislerin bağlanma yapısı enzim, aptamer ve antikör gibi biyomoleküllere benzer biçimde kendi hedefi ile etkileşime girecek şekilde üç boyutlu dizilmiş fonksiyonel gruplardan oluşmaktadır. Fakat bu yapılardan farklı olarak moleküler baskılı polimerlerin kavis-kalıp molekül etkileşimi indüklenmiş etkileşimden ziyade anahtar-kilit modeline daha çok uymaktadır [132]. Polimerin sahip olduğu fonksiyonel gruplar ile hedef molekül arasındaki etkileşim genellikle moleküller arası etkileşimlerle olmaktadır.

Moleküler baskılama tekniğinin bilinen ilk örneği polimerler üstüne yapılan çalışmalar sırasında M. V. Polyakov tarafından 1931 yılında silikatlar ile polimerleşme yapıldığı sırada ortamda benzen varsa bu polimerlerin benzeni daha fazla absorbladığını gözlemlemesi ile başladı [136]. Daha sonrasında Dickey tarafından farklı boyalar ile aynı ortamda ürettiği polimerlerin aynı davranışta bulunduğunu göstermesi ile tamamlandı [137]. Devam eden yıllarda benzer çalışmalar yapılmaya devam edildi, ilk silikat olmayan moleküler baskılı polimer Günter Wulff ve araştırma ekibi tarafından 1970-1980 yılları arasında sentezlendi [138].

Keşfinden bugüne kadar moleküler baskılama yöntemi üzerine birçok araştırma yapılmış ve kullanım bulmuştur. Moleküler baskılı polimerler günümüzde saflaştırma [139-141], tıp ve veterinerlikte biyoışaretçileri tanımak ve hastalık teşhisi amaçlı [143-145] sensör çalışmalarında reseptör olarak [146-148] kullanıma sahiptir. Ayrıca moleküler baskılı polimerler katalitik kullanıma da sahiptir [149,150].

2.3.2.1. Moleküler Baskılı Polimerlerin Sentezi

Moleküler baskılı polimer üretimi için kalıp molekül, kalıp molekülle etkileşecek fonksiyonel gruplara sahip monomerler, bir çapraz bağlayıcı ve polimerleşmeyi başlatmak gerekli olan başlatıcı bileşikler kullanılır. Moleküler baskılı polimerin oluşumu ise teoride basittir; İşlevsel gruba sahip monomerlerin fonksiyonel grupları kalıp molekül ile etkileşecek şekilde organize olur. Bu işlemde çapraz bağlayıcının görevi monomer zincirleri arasında bağ yapıp polimer matriksini oluşturmaktır. Ardından bir polimer başlatıcı eklenip polimerleşme başlatılır. Polimer sentezlendikten sonra polimerden kalıp molekül uzaklaştırılır, böylelikle polimerde kalıp molekül için yüksek özgül bağlanma bölgeleri içeren moleküler kavisler serbest kalmış olur ve bu kavisler tekrar bir kalıp molekülü bağlamaya hazır hale gelir. Bu işlem şekil 2.12’de ifade edilmiştir [151].



Şekil 2.12. Moleküler baskılı polimerlerin sentezi [151].

2.3.2.1.1. Fonksiyonel Gruba Sahip Monomerler

Polimeri üretmek için gerekli yapı taşlarıdır. Hedef molekül ile etkileşime girebilecek fonksiyonel gruplara sahip olması istenir. Polimerin fiziksel ve kimyasal özellikleri monomere bağlı olduğundan moleküler baskılı polimerin kullanılacağı ortamın fiziksel ve kimyasal şartlarına uygun olarak monomer tercihi yapılır. Ayrıca hedef moleküler kavislerde

hedef molekül tanıma işlemi monomerlerin fonksiyonel grupları tarafından yapılacağından, hedef molekül ile bağlanmanın kuvveti de bu monomerlerin türüne bağlı olmaktadır.

2.3.2.1.2. Kalıp Molekül (Şablon/Hedef)

Baskılanmak istenen moleküldür. Hedef molekül ile moleküler baskılı polimer arasındaki etkileşimin tekrar kullanılabilmesi ve birbirinden kolay ayırabilmek için geri dönüşebilir olması istenir. Hedef molekülün kararlılığı, fonksiyonel gruplarının sayısı ve türü moleküler baskılama için önemli özelliklerdir.

2.3.2.1.3. Çapraz Bağlayıcı

Sadece monomerler ile yapılan polimerleşme genellikle düz zincir halinde olur ve yeterli bir polimer matriksi oluşmaz. Bu da moleküler baskılı polimer etkinliğini doğrudan etkiler. Çapraz bağlayıcılar bu sorunu gidermek için ortama eklenir ve polimer yapıda zincirler arası çapraz bağlar oluşumunu sağlayarak polimer matriksinin oluşumunu sağlar. Polimer matriksin oluşumu ise elde edilen moleküler baskılı polimerin mekanik özelliklerini belirler. Eklenen çapraz bağlayıcı oranına göre polimerin mekanik özellikleri değişiklik gösterir.

2.3.2.1.4. Polimerleşme Başlatıcı

Monomerlerin kendiliğinden polimerleşmeye başlaması genellikle çok yavaş bir işlemdir. Bu yüzden ortama düşük miktarda başlatıcı ajanlar eklenir. Daha sonra bu başlatıcı ajanlar UV ışık veya ısı gibi bir dış uyarıcı yardımı ile polimerleşmeyi hızlandırır.

Moleküler baskılanmış polimerlerin sentezi yapılırken monomerler ile liganda arasındaki etkileşime göre moleküler baskılanmış polimeri üretim yöntemi seçilir (şekil 2.12). Monomer ile kalıp arasındaki etkileşime göre kovalent, kovalent olmayan veya metalik/elektrostatik olmak üzere farklı baskılama metodları vardır. Hepsi temelde fonksiyonel grupların etkileşimine/tepkimesine dayansa da baskı türüne göre moleküler baskılı polimerin üretilme, kalıp molekülü ayırma işlemleri değişiklik gösterir.

2.3.2.1.5. Kovalent Olmayan Yaklaşım

Bu yöntemde kalıp molekül ile monomerler arasındaki etkileşim moleküller arası kuvvetlerle sağlanır. Kalıp molekül ile monomerler çözelti içerisinde fonksiyonel grupları birbirleri ile etkileşecek şekilde düzenlenir. Ortama eklenen çapraz bağlayıcı ve bir başlatıcı ile reaksiyon başlatılır ve polimer matriksi oluşturulur. Kovalent olmayan yaklaşım ile moleküler baskılı polimer üretiminin en büyük avantajı kalıp molekülün rahatça polimerden uzaklaştırılabilmesidir. Ortama eklenen uygun çözücüler ile polimer- kalıp molekül etkileşimleri bozulur ve kalıp molekül çözeltiliye geçip kullanıma hazır baskılı polimer elde edilir [151].

2.3.2.1.6. İyonik/Metalik Yaklaşım

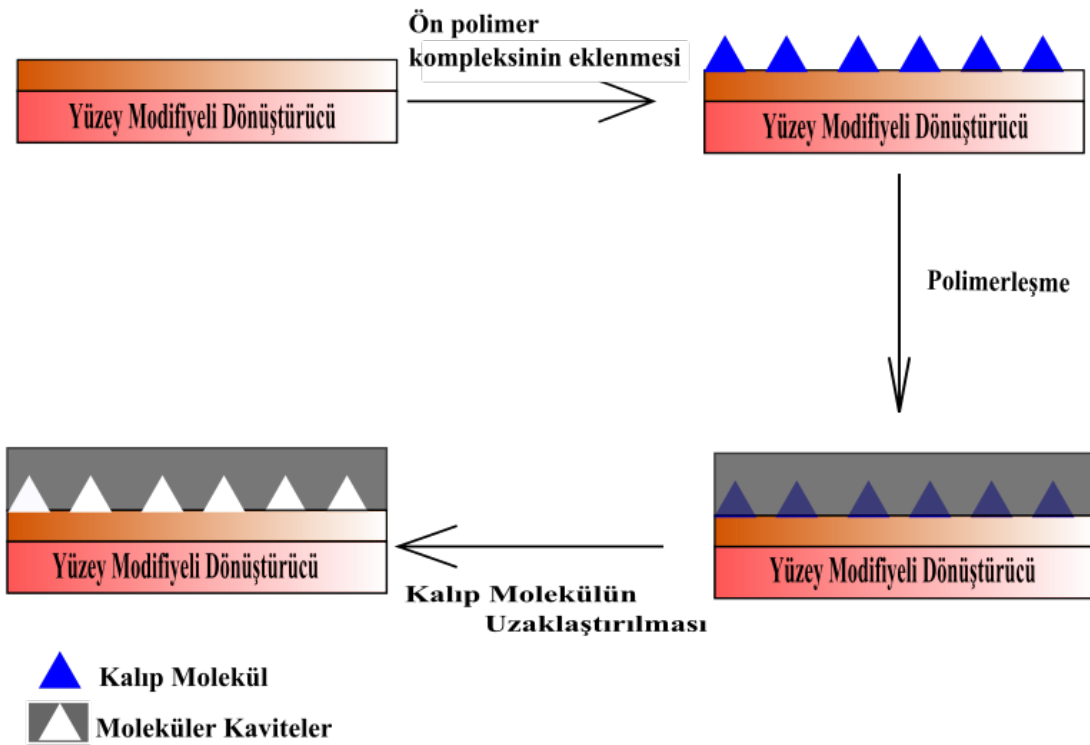
Bu yöntem kovalent olmayan yaklaşıma benzer fakat burada metal/şelat etkileşimi kullanılır. Bu etkileşimleri kırmak kovalent bağa kıyasla daha kolay, kovalent olmayanlara kıyasla daha zordur. Metallerin birden fazla değerlikte kararlı şekilde bulunabilmesi, sahip olduğu yük sayesinde monomerlerin fonksiyonel grupları ile (ligand) kolay şekilde güçlü bağ kurabilmesi bu yaklaşımın avantajlarından [151].

2.3.2.1.7. Kovalent Yaklaşım

Bu tür yaklaşımda monomer ile kalıp molekül arasındaki etkileşim bir kovalent bağdır. Monomer ile kalıp molekül kimyasal bağ yaptıktan sonra polimerleşme gerçekleştirilir ve polimer matriksi oluşturulur. Polimer oluşturulduktan sonra monomer-kalıp arasındaki bağın kırılması sağlanır ve kalıp molekül uzaklaştırılır böylelikle moleküler kavis oluşmuş olur. Fakat bu yöntemin diğer yaklaşımlara kıyasla bazı önemli dezavantajları vardır. İlki moleküler baskılı polimerin sentezi için monomer ile kalıp molekül arasında tersinir bir kimyasal bağ yapabilecek gruplara olan ihtiyaçtır. İkincisi ise moleküler baskılı polimer oluşturulduktan sonra bu kalıp molekülün tekrar geri sökülmesi gerekmesidir. Polimer- kalıp molekül etkileşimi kovalent bağ ile olduğundan bunları kırmak moleküller arası bağlara kıyasla daha zor olmaktadır [151,152].

2.3.2.2. Moleküler Baskılama ile Reseptör Üretimi

Enzim, antikor, reseptör gibi doğal biyoreseptörlerin sadece belirli kısımları ılımlı denebilecek koşullarda çalışabilmesi, biyolojik kaynaklardan elde edilen biyoreseptörlerin pahalı ve izolasyonunun zor olması, kontaminasyona, ısı ve ışığa dayanamaması ve kullanım ömrünün kısa olması biyosensör teknolojisini kısıtlamaktadır. Biyosensör teknolojisini gelişimi için, yüksek veya düşük pH, basınç, sıcaklık, tuz derişimi gibi doğal biyoreseptörlerin kullanılmayacağı ortamlarda biyosensörleri kullanmak için moleküler baskılı polimerler gelecek vaat etmektedir. Moleküler baskılı polimerler ile kalıp bir molekül için yapay tanıma bölgeleri oluşturulabilir bu sayede de bu tür polimerler biyoreseptör olarak biyosensörlerde kullanılabilir. Günümüzde bu moleküler baskılı polimerlerin kullanıldığı birçok biyosensör çalışması var olmakta ve bu çalışmalardan bazıları tıp, çevre, adli bilimler, kimya, fizik ve biyoloji gibi alanlarda kullanılmaktadır.



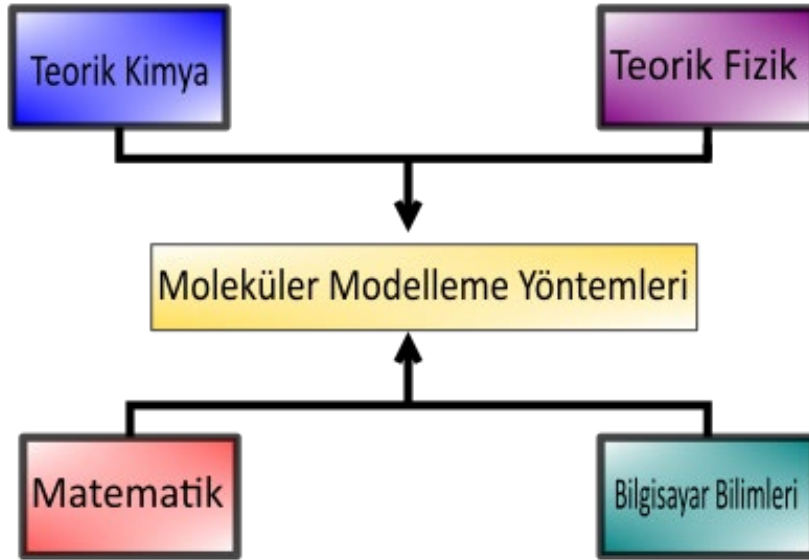
Şekil 2.13. Sensör dönüştürücüsü üstünde moleküler baskılama.

Moleküler baskılı polimer içeren biyosensörler şekil 2.13'de gösterildiği gibi bir dönüştürücü üstünde farklı yöntemlerle MIP polimerleri üretilebildiği gibi [153-155] önceden sentezlenmiş bir moleküler baskılı polimer içeren bir yapının yerleştirilmesi

(immobilizasyonu) ve kaplaması ile de üretilebilir [156-158]. Sonuç olarak MIP sensörlerin üretimi için birçok farklı metot olması, kolaylığı ve ucuzluğu sayesinde moleküler baskılama yöntemi ile sensör teknolojisinin birleşmesi, sensör teknolojilerinde biyolojik yapıların sunduğu dezavantajlara karşı kullanılacak bir alternatif oluşturmakta ve gelecek vaat etmektedir.

2.4. Moleküler Modelleme

Günümüzde elektronik işlemciler fiziksel ve kimyasal teorik bilgiler ile matematiksel hesaplamaları kolay bir şekilde yapmamızı mümkün kılmaktadır. Bu imkanlar sayesinde eskiden gerekli işlemlerin fazlalığı nedeniyle mümkün olmayan teorik hesaplamalar ve moleküller gibi gözle görülemeyecek kadar ufak yapıların davranışı bilgisayar teknikleri ile simülasyonlar oluşturularak incelemeyi mümkün kılmaktadır (şekil 2.14.). Tüm bu simülasyonlara kolektif olarak bilimsel modelleme yöntemleri denilmektedir [159]. Bilimsel modellemenin moleküller üstünde uygulaması yani moleküler modelleme yöntemleri ile en ufak atomlardan en büyük biyomoleküllere kadar geniş bir skalada maddelerin yapısını, özelliklerini ve etkileşimlerini incelememiz mümkündür.



Şekil 2.14. Moleküler modelleme.

Bu özellik sayesinde moleküler modelleme yöntemleri günümüzde materyal biliminde [160-162] ve eczacılıkta [163] kullanıma sahiptir. Eczacılıkta bilgisayar tabanlı (in silico) ilaç

tasarımları ve potansiyel ilaçlar ile ilaç hedefleri arasındaki etkileşimler incelenebilmektedir [165-167]. Bilgisayar tabanlı simülasyonlar ve modellemelerin kullanımı deneyler için gerekli zaman ve maliyet düşüşüne neden olmaktadır bu da bilgisayar tabanlı simülasyonları kullanımının artmasına neden olmaktadır.

Simülasyonların modelleme yapabilmesi için atomlar, atomların etkileşimleri ve her bir atomun enerjileri hakkında matematiksel veriye gereksinimi vardır. Her ne kadar kuantum mekaniği gibi teoriler ile gerekli veriler elde edilmeye çalışılsa da bu işlem büyük moleküller için artan atom sayısı ve etkileşim miktarındaki artış yüzünden uzun süreler almaktadır. Bu simülasyon süresi doğrudan işlem yapan bilgisayarların yetisine ve kullanılan modelleme programının kalitesine bağlıdır. Çizelge 5’de bazı moleküler modelleme programları verilmiştir.

Çizelge 2.5. Bazı moleküler modelleme programları.

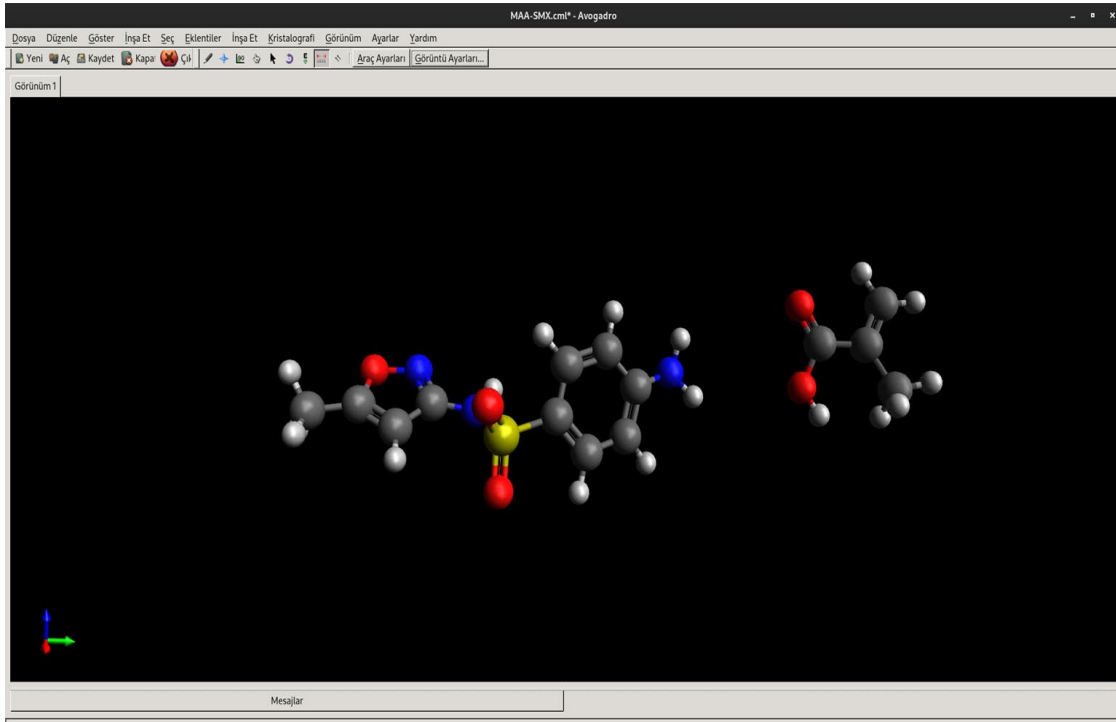
Programlar		
CP2K	Abalone	CPMD
FoldX	Amber	YASARA
GROMOS	TINKER	SAMSON
GROMACS	LAMMPS	ABINIT
ORCA	AMPAC	MAPS
COLUMBUS	BigDFT	GAUSSView

Moleküler modelleme programları genel olarak iki farklı şekilde moleküllere yaklaşımda bulunur. Biri her bir atomun en küçük birim olarak kabul edildiği moleküler mekanik metodu, diğeri ise kuantum teoreminin kullanıldığı ve atom altı parçacıkların da incelendiği kuantum mekaniği yaklaşımıdır.

2.4.1. Moleküler Mekanik Yaklaşımı

Moleküler mekanik metodunda atomlara en küçük birimler olarak davranılır. Bu birimler bir çekirdek çevresinde elektronlar ile gösterilip kütle ve yüke sahip olup birbirlerine bağlarla bağlıdır. Bu bağların kendi rotasyonu ve açısı vardır. Moleküler orbital veya uyarılmış forma sahip değildir hepsi temel enerji seviyesinde kabul edilir. Moleküler mekanik yaklaşımında klasik fiziksel eşitlikler kullanılır. Atom altı parçacıklar dikkate alınmaz.

Moleküler mekanik metodu daha çok biyomoleküller gibi yüksek miktarda atomun hesaplanması gerektiği durumlarda avantajlıdır. Kuantum mekaniğine kıyasla bu metot ile büyük sistemlerdeki hesaplamalar hızla yapılabilir. Bu özelliklerinden dolayı sıklıkla moleküler mekanik yaklaşımı büyük yapıları biyomoleküller ve bunların etkileşiminin incelendiği farmakoloji, genetik ve biyokimya gibi alanlarda kullanım bulmaktadır. Fakat bu metodun bazı dezavantajları vardır. Kuantum mekaniği yaklaşımına göre daha düşük doğruluğa sahiptir ve maddelerin elektriksel özellikleri hakkında bilgi vermez.



Şekil 2.15. Klasik bir molekül dizayn programı ile çizilmiş SMX-MAA bileşikleri [168].

Üstteki şekil 2.15'te klasik bir moleküler modelleme programı ile çizilmiş SMX-MAA molekülleri gösterilmiştir. Bu işlemleri gerçekleştiren birçok program dijital ortamda ücretli veya ücretsiz olarak kullanıma sunulmuştur.

2.4.2. Kuantum Mekanik Yaklaşımı

Kuantum mekaniği ile atomdan daha küçük parçaların özellikleri ve davranışları da hesaplanır ve dikkate alınır. Bu yaklaşımın her ne kadar büyük sistemlerde gerekli hesaplama miktarındaki artıştan dolayı uzun süreler alabilse de moleküler mekanik yaklaşımına göre daha doğru sonuçlar verir.

Kuantum mekaniği yaklaşımı termodinamiksel eşitlikler ve bazı yapısal özelliklerin bilinmesi ile atom ve moleküllerin elektriksel ve spektral özellikleri hakkında bilgi almamızı da sağlayabilir. Bu yöntem ile elektron yoğunluk dağılımı ve moleküler orbital teorisi gibi birçok hesaplama yapabilir, ayrıca konformasyonlar arasındaki yaklaşık enerji farkı, temel hal ve uyarılmış hal geçişleri hakkında bilgi toplayabiliriz.

2.4.3. Temel Setler

Temel set kimya, materyal bilimi ve fizikte kullanılan dalga fonksiyonlarını HF veya DFT modeli ile ifade etmeyi amaçlayan teorik ve bilgisayarlı kimya uygulama bulan fonksiyonlardır. Temel setlerde atomlar atomik orbitaller Gauss tipi, Slater tipi veya Sayısal atomik orbital olarak ifade edilebilir [169].

2.4.3.1. Yoğunluk Fonksiyon Teorisi (DFT)

Normal kuantum mekaniği yaklaşımı ile büyük sistemlerin elektronik yapısını açıklamak için Schödinger dalga fonksiyonu ile etkileşimde bulunan N tane parçacığı incelemek gerekir fakat bu gerekli matematiksel hesap sayısı ve karmaşıklığından dolayı zor ve kısıtlıdır. Fakat klasik yaklaşımla her parçacığın dalga fonksiyonu yerine tek bir değişken olan elektron yoğunluğu dikkate alınan yoğunluk fonksiyon teorisi (DFT) ile atomlar ve moleküllerin özelliklerini incelenebilir [170]. Dalga fonksiyonunun sahip olacağı N parçacık için 3N koordinat sayısına kıyasla DFT teorisinde tek elektron yoğunluğu $n(r)$ sadece üç düzlemin

fonksiyonunsa sahip olacağından bu yöntem ile atomlar ve molekülleri büyük sistemlerde bile incelemek mümkündür.

DFT teorisinin temelleri 1927-1928 yılında Thomas ve Fermi modelleri ile atılmış olup [171,172] teorik açıklamaları Hohenberg-Kohn tarafından daha ileriki yıllarda yapılmıştır [173]. DFT teorisinin temeli Hohenberg–Kohn ve Kohn–Sham teoremleridir. Hohenberg-Kohn teoreminde bir dış etki ile hareket eden elektronun bulunduğu sistemi açıklar. Aşağıda Hohenberg-Kohn teorileri hakkında kısa bilgiler verilmiştir:

1-Bu teori temel haldeki atomlarının elektron yoğunluğunun $n(r)$ sistemin dış potansiyelinin $v(r)$ ve dış potansiyelin elektronların hareketini belirlediğini ifade eder. Elektronların hareketi de sistemin Hamiltonian (toplam enerji) ve fiziksel özelliklerini belirler.

2- $v_0(r)$ tarafından karakterize edilebilen temel hal enerjisi (E_0) ve temel hal yoğunluğu $n_0(r)$ potansiyel ve bununda sadece yoğunluk kullanılarak çözümlenebileceği. Bundan dolayı temel hal enerjisinin, yoğunluk fonksiyonu olarak yazılabileceğini ve bununla da sadece temel hal yoğunluğu (n_0) hesaplanabileceğini savunur. Buna teoriye göre en düşük temel enerji hali en düşük temel enerji yoğunluğunda bulunur.

$$E_0 = E_{v_0}(n_0) < E_{v_0}[n_0]$$

Hohenberg-Kohn teoremi daha sonra öne sürülen Kohn-Sham teorisi için temel oluşturmaktadır.

2.4.3.2. Hartree-Fock Metodu (HF)

Hartree-Fock Metodu, DFT teoremi gibi moleküller gibi çoklu parçacık içeren sistemler için kullanılır. DFT'den farklı olarak HF metodu N-tane parçacığın dalga fonksiyonunu Slater determinantı adı verilen bir ifade ile açıklar.

Bu metodun teorik dayanağı 1928 yılında Hartree tarafından ifade edilmiştir [174]. Ardından 1930 yılında Fock ve Slater tarafından birbirinden bağımsız olarak Hartree eşitliğinin dalga fonksiyonundaki asimetri prensibine uymadığını fark etmişlerdir ve bunu Slater determinantı adı verilen ifade ile çözmüşlerdir [175-177].

2.4.3.3. Hibrid Fonksiyonlar

Bilgisayar kimyası ve teorik bilimlerde daha önce kullanılan DFT modeli ve HF modeli bağlanma olaylarında yetersiz kalmıştır. Bu iki yöntem ilk defa 1993 yılında Beck tarafından birleştirilerek her iki yönteminde avantajlarına sahip ve bağlanma olaylarını inceleyebilecek hibrid model geliştirilmiştir [178]. Bu modellere: B3LYP [179], PBE0 [180], HSE [181] hibrid modelleri örnek verilebilir.

B3LYP (Becke, 3-parameter, Lee–Yang–Parr) ilk başta titreşim absorpsiyonu ve dairesel dikroizmi incelemek için geliştirilmiş bir hibrid fonksiyonudur. Lee C, Yang W, Parr RG tarafından 1988'de temeli atılmıştır [179]. Günümüzde B3LYP en sık kullanılan fonksiyonlar arasındadır.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kimyasal Malzemeler

Altın SPR çipleri GWC Tech'den satın alındı (Madison, USA). Kullanılan kimyasallar; Sülfametoksazol, amoksisillin, sefaleksim, 2-propen-1-tiyol, 2-Hidroksietilmetakrilat (HEMA), etilen glikol dimetakrilat (EGDMA), Azobisisobutironitril, sodyum klorür (NaCl) ve Metakrilik asit (MAA) SIGMA-ALDRICH'den tedarik edildi. Kullanılan çözücüler Merck KgaA, Darmstadt tarafından tedarik edildi. De-iyonize su Barnstead, Deionizer Nanopure Diamond Analitik Su Sistemi ile saflaştırıldı.

3.2. Moleküler Modelleme Çalışmaları

3.2.1. Monomer Oranları

MIP'ta kalıp molekül ile fonksiyonel monomerler üzerinde bulunan fonksiyonel grupların etkileşimleri doğrudan spesifik adsorpsiyonu ve seçiciliği etkilediğinden, SMX baskılı MIP sentezinde MAA oranındaki artış, polimerizasyon sırasındaki hidrojen bağı oluşumunu artırır ve buna bağlı olarak da afinite ve seçicilik de artar [182]. Fakat monomer oranının belirlenen düzeyden fazla olması da sterik etkiyi artırıp, seçiciliği düşürmektedir. SMX ile MAA molekülleri arasındaki molar oranı hazırlanacak moleküler baskılı polimerin performansı açısından önem taşır. Bu sebeple tez çalışması kapsamında SMX-MAA kompleksleri gaz fazında 1:1 [SMX-MAA], 1:2 [SMX-MAA-MAA], 1:3 [SMA-MAA-MAA-MAA] molar oranlarında, B3LYP yöntemi/6-31+G(d,p) baz seti ile incelenmiştir.

3.2.2. Çözücü Faktörü

Kovalent olmayan baskılama uygulamalarında, kompleks oluşumu için fonksiyonel monomerler ve baskılanmış moleküller arasındaki kovalent olmayan etkileşimler için uygun çözücünün seçilmesi kompleks kararlılığı açısından oldukça önemlidir. Baskılanmış polimerlerin en yüksek verimi gösterecek en uygun çözücünün seçimi için su, etanol ve asetonitril çözücülerinde 1:1 molar oranında SMX-MAA komplekslerinin enerjileri B3LYP/6-31+G(d,p) yöntemi ile hesaplanmıştır.

3.3. Sülfametoksazol Baskılı Sensörün Hazırlanışı

Sülfametoksazol nano-baskılı altın SPR çiplerini hazırlamadan önce çiplerin yüzeyi asidik piranha çözeltisi (3:1, H₂SO₄: H₂O₂, v/v) ile 30 saniye boyunca temizlendi, temizlenme sonrası su-etanol çözeltisi ile yıkandı ve 40°C vakumlu fırında 2 saat kurutuldu. Temizleme sonrasında altın yüzey üzerinde alil grupları oluşması için altın çiplerin yüzeyine 3mL 2.0mM 2-propen-1-tiyol solüsyonu damlatıldı ve 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası su-alkol çözeltisi ile yıkayıp vakum fırınında kurutuldu.

Çiplerin üstünde sülfametoksazol baskılı nanofilm hazırlamak için; 2-hidroksietilmetakrilat (HEMA), etilen glikol dimetakrilat (EGDMA), 1:2 oranda sülfametoksazol-metakrilik asit kompleksi içeren polimerizasyon çözeltisi ve azobisisobutironitril başlatıcı olarak hazırlandı. Ardından solüsyonun bir kısmı alil modifiyeli SPR çiplerinin altın yüzeyine damlatıldı. Polimerizasyonu başlatmak için 25°C'de UV ışık kullanıldı (100W, 365nm) ve 1 saat boyunca devam edildi. Aynı zamanda baskılı yüzey kaplamasına sahip olmayan sensör çipleri sülfametoksazol-metakrilik asit kompleksi yerine sadece metakrilik asit içeren polimerizasyon solüsyon ile aynı prosedür izlenerek hazırlandı. Son olarak sülfametoksazol baskılı ve baskısız nanofilm ile modifiye edilmiş çipler sulu etanol ile yıkandı ve vakum fırınında kurutulduktan sonra vakumlu kurutucuda muhafaza edildi.

Baskılı çiplerden sülfametoksazolu uzaklaştırmak için 0.5 M NaCl çözeltisi kullanıldı.

3.4. Karakterizasyon Çalışmaları

Sülfametoksazol baskılı ve baskısız nanofilm kaplı çipler FTIR, atomik kuvvet mikroskopisi (AFM), taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ve temas açısı ölçümü ile karakterize edildi.

FTIR karakterizasyon çalışmaları FTIR-ATR spektrometresi (Thermo Fisher Scientific, Nicolet is10, Waltham USA) ile 400-4000 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında 2 cm⁻¹ çözünürlüğünde yapıldı.

Çiplerin SEM analizi Odaklanmış iyon demeti- taramalı elektron mikroskopi sistemi (FIB-SEM) (GAIA-3 Tescan) ile yapılmıştır.

Çiplerin AFM incelemeleri temas modu çevre AFM'si ile (Nanomagnetic, Oxford, UK) yapıldı. Tarama prosedürü 2 µm/s tarama hızı ile 256 × 256 piksel çözünürlüğünde tamamlandı.

SMX-MAA baskılı ve baskısız nanofilm kaplı çiplerin temas açısı ölçümü KRUSS DSA100 (Hamburg, Germany) kullanılarak yapıldı.

3.5. Sülfametoksazol Baskılı Nanosensörün Kinetik Çalışmaları

Sülfametoksazol baskılı ve baskısız nanosensörlerin kinetik çalışmaları 150 µL/dk akış hızında ve 800 nm dalga boyunda SPR imager II (GWC, Madison, USA) kullanılarak gerçekleştirildi. Gerçek zamanlı sülfametoksazol tayini sulu çözeltide ve ticari süt örneklerinde sülfametoksazol baskılı SPR nanosensörler ile yapıldı. Öncelikle sulu çözeltide sülfametoksazolün ölçümü farklı pH değerlerinde (5, 6, 7.4, 9) yapılarak en etkili ortam pH'ı kontrol edildi. Sülfametoksazolün sulu çözeltideki ölçümü 0.025-253.2 µg/L aralığında yapıldı. Ölçüm prosedürü 20 dakika içerisinde gerçekleştirildi. Bu prosedürün ilk basamağı sensörün 0.5 M fosfat tamponu ile dengelenmesi, ardından nanosensör tarafından sülfametoksazolün adsorpsiyonu ve en son olarak nanosensörden 0.5 M NaCl çözeltisi ile sülfametoksazolün desorpsiyonudur. Meydana gelen değişimler frekans rezonansı şeklinde sensogramda anlık olarak izlendi ve 15 dakika içerisinde sabit bir miktara ulaştı. Sülfametoksazol baskılı nanosensörün seçiciliği ise amoksisilin ve sefaleksin antibiyotiklerinin çözeltisi kullanılarak incelendi.

Sülfametoksazol baskılı nanosensörün tekrar kullanılabilirliği ise 25.3 µg/L sülfametoksazol çözeltisi ile denge-adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsünü beş kere tekrar edilmesi ile kontrol edildi.

Tespit deneyleri, hazırlanan SPR nano sensörün güvenilirliğini incelemek için gerçek bir numune olarak ticari sütlerde de gerçekleştirilmiştir. Ticari süt numuneleri, 4°C'de 25 dakika boyunca 25000 rpm'de santrifüj edildi, ardından sütteki yağ tabakasını çıkarmak için tripsin ve Clara-diazaz ilave edildi ve 40°C'de 30 dakika hidrolize edildi. Son olarak, çözelti soğuduktan sonra 25000 rpm'de 25 dakika santrifüj ardından kullanıldı.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Monomer-Kalıp Oranı ve Çözücü Etkisi

4.1.1. Monomer Oranları

SMX ve MAA monomerinin oluşturduğu komplekslerinin kararlılıkları, oluşan yapıların bağlanma enerjilerinin bir ölçütüdür. Kompleksin bağlanma enerjisini ne kadar azsa, kompleks kararlılığı da SMX ile MAA arasındaki etkileşim kuvvetleri de o kadar fazladır. Bu sebeple 1:1 [SMX-MAA], 1:2 [SMX-MAA-MAA], 1:3 [SMX-MAA-MAA-MAA] molar oranlarındaki komplekslerin gaz fazında bağlanma enerjileri ΔE_1 hesaplanmıştır.

SMX ve fonksiyonel monomer MAA'dan oluşan kompleksin bağlanma enerjisi Eşitlik 1'deki denklemle hesaplanmıştır:

$$\Delta E_1 = E_{Kompleks} - E_{Kalıp\ molekül} - \Sigma E_{Monomer} \quad \text{Eşitlik (1)}$$

$E_{Kompleks}$, SMX-MAA kompleksinin enerjisi, $E_{KalıpMolekül}$ SMX molekülünün enerjisi, $\Sigma E_{Monomer}$ ise kullanılan monomer oranıyla değişen MAA molekülünün enerjisidir.

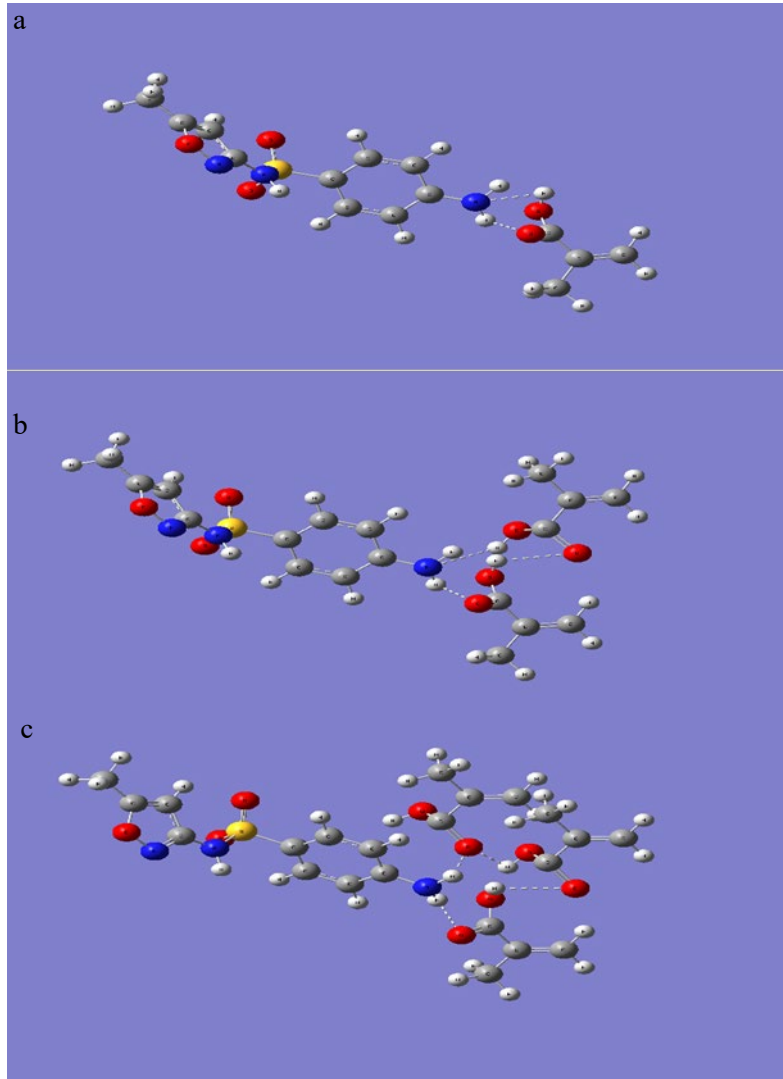
Yapılan çalışmalar sonucu 1:1 [SMX-MAA], 1:2 [SMX-MAA-MAA], 1:3 [SMX-MAA-MAA-MAA] molar oranlarındaki komplekslerin bağlanma enerjileri ΔE_1 , çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. SMX-MAA komplekslerinin farklı molar oranlarda gaz fazındaki bağlanma enerjileri, ΔE_1 .

Molar Oran	Bağlanma Enerjisi (ΔE_1 (kJ/mol))
1:1 [SMA-MAA]	-4,52
1:2 [SMX-MAA]	-25,82
1:3 [SMX-MAA]	-40,89

Molar oran arttıkça, SMX-MAA kararlı kompleksinin bağlanma enerjisi sürekli olarak azalmıştır. En düşük bağlanma enerjisi en yüksek kararlılıkta kompleksi oluşturup, en fazla

hidrojen bağına sahiptir. SMX-MAA kompleksi için bağlanma enerjisi 1:1 mol oranında -4,52 olarak hesaplanmıştır. 1:1 molar oranda bu kadar düşük bağlanma enerjisinin hesaplanması, MAA fonksiyonel monomerinden 1 tane olması sebebiyle monomerler arası hidrojen bağlarının bu komplekste olmamasından kaynaklanmaktadır. Molar oran 1:3 olduğunda ise bağlanma enerjisi minimuma ulaşmış ve -40,89 kJ/mol olarak hesaplanmıştır. SMX baskılı moleküllerin MAA fonksiyonel monomerlerinde molar oran arttıkça, SMX-MAA kararlı komplekslerindeki hidrojen bağlarının sayısı da artmıştır. Elde edilen sonuçlara göre kalıp molekül SMX ile fonksiyonel monomer MAA arasında en kararlı kompleks oluşumu için gerekli molar oran 1:3'tür.



Şekil 4.1. Kalıp molekül (SMX) ve monomer (MAA) arasındaki farklı molar oranlardaki etkileşimler. Üstten alta doğru a 1:1 SMX-MAA, b 1:2 SMX-MAA, c 1:3 SMX-MAA

Şekil 4.1’de kompleksler içerisindeki hidrojen bağlarını kesik çizgilerle göstermektedir. Şekilde görüldüğü üzere, SMX baskılı molekülün MAA fonksiyonel monomerine molar oranları 1:1, 1:2 ve 1:3 olduğunda, hidrojen bağlarının miktarı sırasıyla 2, 3 ve 4’tür. Tüm etkileşim oranlarında, moleküller arası bağ uzunluğu 0,1663 ila 0,2441 nm arasında değişmektedir, bu da tümü hidrojen bağ uzunluğu ile uyumludur [183]

4.1.2. Uygun Çözücü Seçimi

Kovalent olmayan baskılamada, fonksiyonel monomerler ve baskılanmış moleküller arasında kovalent olmayan etkileşimlerle kararlı kompleksleri oluşturmak için çözücülerin tanınmaları son derece önemlidir. Uygun bir çözücü hazırlanan yapıların verimliliğini arttırabilir. Moleküler baskılı polimerin hazırlanma sürecinde çözücü sadece reaksiyondaki tüm bileşen reaktiflerini çözme yeteneğine sahip olmak dışında SMX ve MAA arasındaki etkileşime de etki etmemelidir

Bu sebeple SMX ile MAA kompleksindeki molar oranı 1:1 olduğunda farklı çözücülerdeki kararlı komplekslerin çözünme enerjisi ΔE_2 , Eşitlik 2’deki formül ile hesaplanmıştır:

$$\Delta E_2 = E_c - E_v \quad \text{Eşitlik (2)}$$

E_c , SMX- MAA kompleksinin çözücü ortamındaki etkileşim enerjisi, E_v ise SMX-MAA kompleksinin vakum ortamındaki etkileşim enerjisidir. Çizelge 4.2’de hesaplamalar sonucunda su, etanol ve asetonyitril çözücü ortamları için hesaplanan ΔE_2 değerlerini göstermektedir.

Çizelge 4.2. Farklı çözücü ortamındaki çözünme enerjileri.

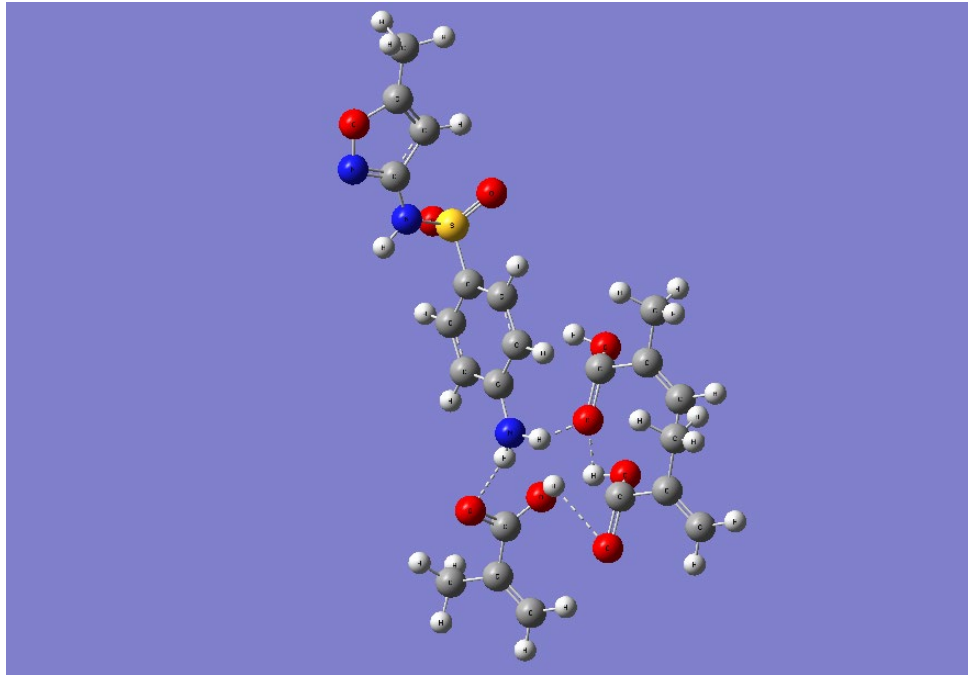
Çözücü	Çözünme Enerjisi ΔE_2 (kJ/mol)
SU	-4,75
ETANOL	-4,02
ASETONİTRİL	-4,63

Bağ uzunluğu ne kadar kısa olursa, çözünme enerjisi o kadar büyük olur, bu nedenle çözücünün baskılanmış molekül ve fonksiyonel monomer arasındaki etkileşim üzerindeki etkisi de azalır. Çizelge 4.2.'de gösterildiği gibi oluşan komplekslerin sırası; **Etanol** > **Asetonitril** > **Su** şeklindedir.

Yapılan teorik çalışmalar sonucunda en yüksek verime sahip baskılanmış polimer 1:3 oranında, etanol fazındadır. Elde edilen bilgiler doğrultusunda en uygun hidrojen bağı etkileşimleri, en düşük bağlanma enerjisi sonucunu vermiştir. Fonksiyonel monomerlerin kendi aralarında oluşturdukları hidrojen bağları etanol fazında şekil 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. 1:3 Molar oranda, etanol çözücüsündeki [SMX-MAA-MAA-MAA] kompleksinin teorik hesaplama sonuçları

Hesaplama Yöntemi	RB3LYP
Baz Seti	6-31+G(d,p)
Yük	0
Spin	Tekli
E (RB3LYP)	-37,93 kJ/mol
Dipol Moment	6.4864 Debye
Simetri Nokta Grubu	C1



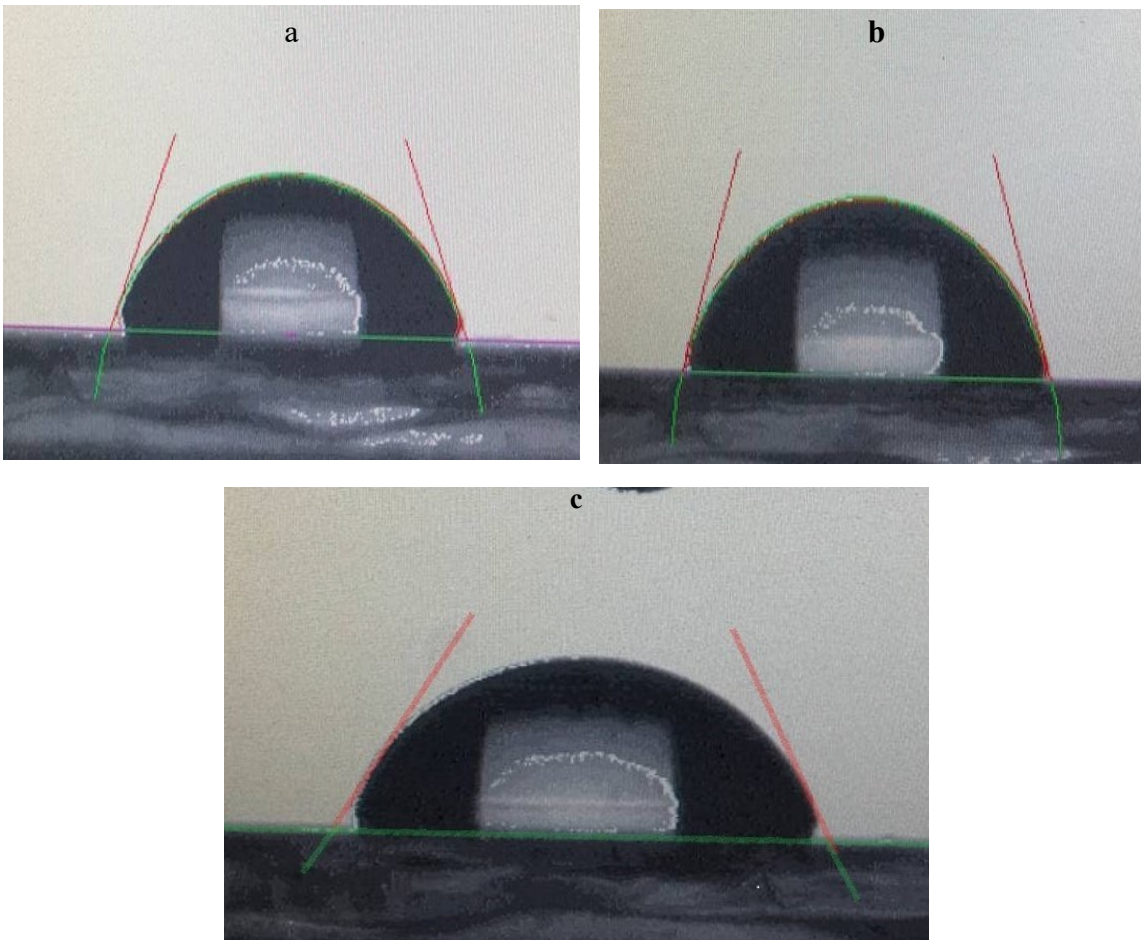
Şekil 4.2. 1:3 Molar oranda, etanol çözücüsündeki [SMX-MAA-MAA-MAA] kompleksinin optimize geometrisi. Kesikli çizgiler hidrojen bağlarını göstermektedir.

4.2. Karakterizasyon Çalışmaları

4.2.1. Temas Açısı

Alil merkaptan modifiyeli çipin temas açısı değeri hidrofilik karaktere bağlıdır. Bu sebepten dolayı hidrofilik karaktere

ri arttıran MAA-EGDMA-HEMA polimeri içeren çiplerin temas açısı ölçüm değerleri hidrofilik karakterin artması sebebiyle polimer içermeyen çiplere kıyasla daha azdır. Çıplak SPR çip, alil merkaptan modifiyeli çip ve SMX baskılı polimer kaplı SPR çipleri için temas açısı değeri sırası ile; 71.01 ± 0.78 , 69.0 ± 1.09 , $66.0 \pm .97$, olarak ölçülmüştür (şekil 4.3).

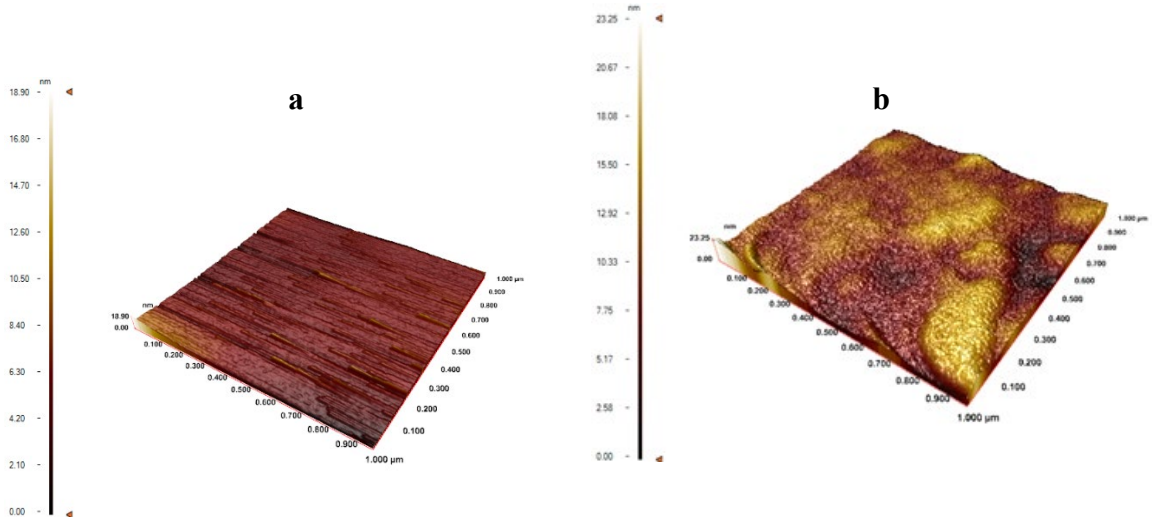


Şekil 4.3. Temas açısı ölçümü. a: çıplak SPR çipi, b: alil modifiyeli çip, c: SMX baskılı çip.

4.2.2. AFM Analizi

Geliştirilmiş SPR nanosensörlerin yüzey morfolojisi AFM ile incelenmiştir (şekil 4.4). Elde edilen görüntüler yüzeyde sentezlenen polimer baskılamamanın varlığını doğrulamaktadır.

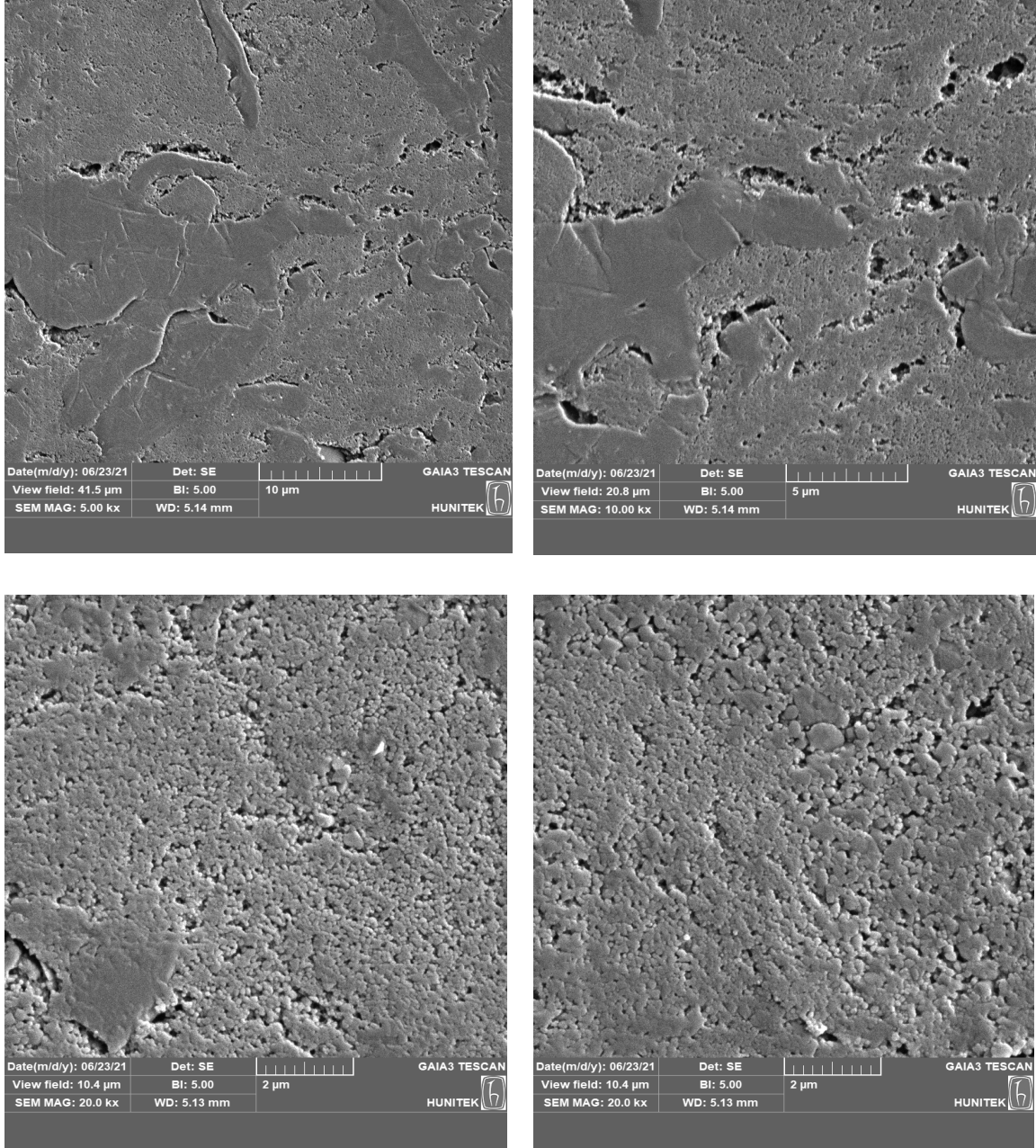
Ölçüm sonucu baskılı sensör ve çıplak sensörlerin yüzey derinliği sırası ile 20,67 nm ve 8,5 nm olarak bulunmuştur.



Şekil 4.4. SPR altın çipinin (a) ve SMX baskılı polimer kaplı PR çipinin() AFM görüntüsü.

4.2.3. Nanobaskılı Sensörlerin SEM Görüntüsü

Taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ile geliştirilmiş SPR altın çip sensörleri üzerindeki SMX baskılı MAA-EGDMA-HEMA polimerik nanofilmin ve baskı içermeyen MAA-EGDMA-HEMA polimerik nanofilmin yüzey morfolojisini karakterize etmek amaçlı görüntüleri alınmıştır. Aşağıdaki şekil 4.5'te baskılı yüzeylerin görüntüsü verilmektedir;

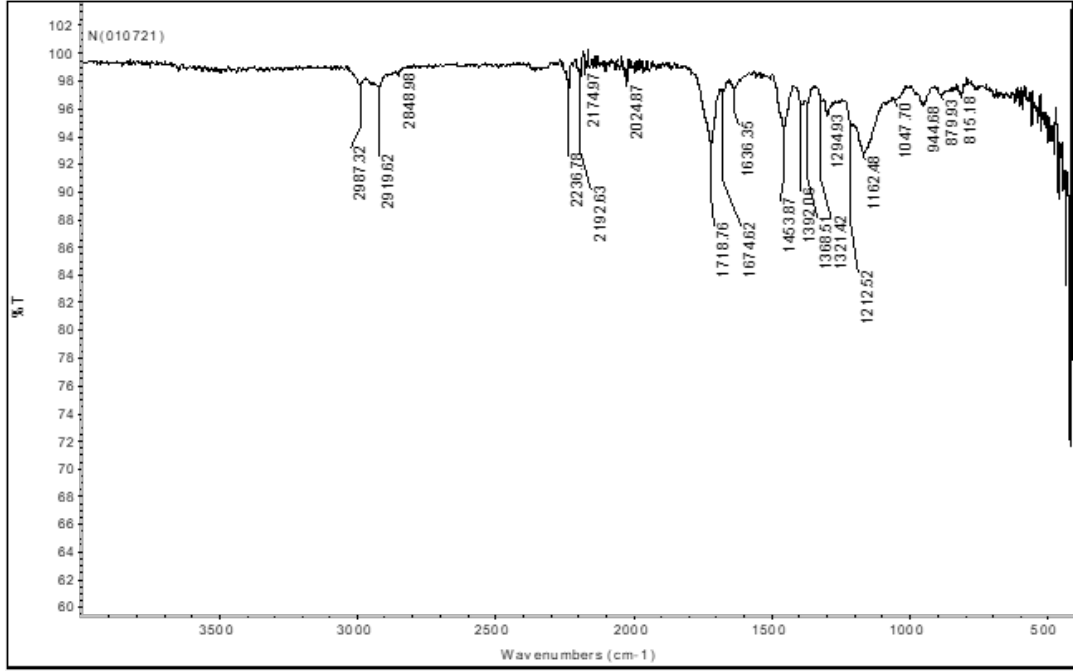


Şekil 4.5. Moleküler baskılı nanosensörlerin SEM görüntüleri.

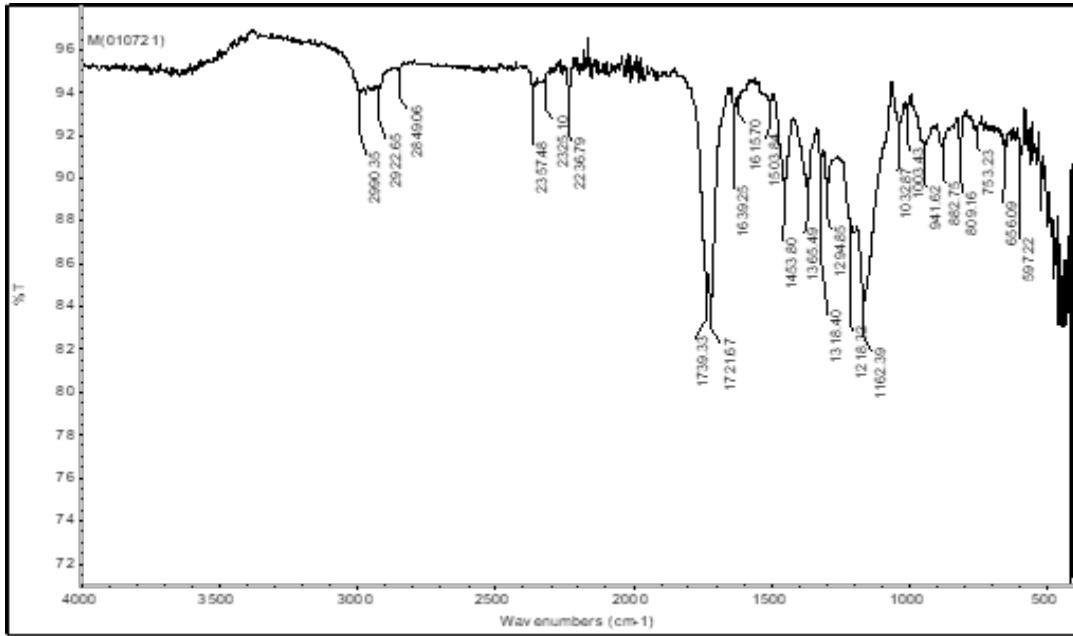
Yapılan karakterizasyon çalışması sonucu SPR sensör çipi yüzeyinde polimerik film kaplamanın başarılı olduğu ve yüzeyin morfolofisi görülmektedir. Çalışma sonucu geliştirilen sensörün yapılacak uygulamaya uygun yüzey özelliklerine sahip olduğuna kanaat getirilmiştir.

4.2.4. FT-IR Karakterizasyonu

SMX baskılı polimer film kaplı SPR çipinin ve SMX baskısı içermeyen polimer film kaplı SPR çipinin FT-IR analizi yapılmıştır. Yapılan analiz sonucu elde edilen spektrumlar şekil 4.6'da verilmiştir.



a



b

Şekil 4.6. SMX Baskısız (a) ve SMX baskılı (b) çiplerin FT-IR spektrumu.

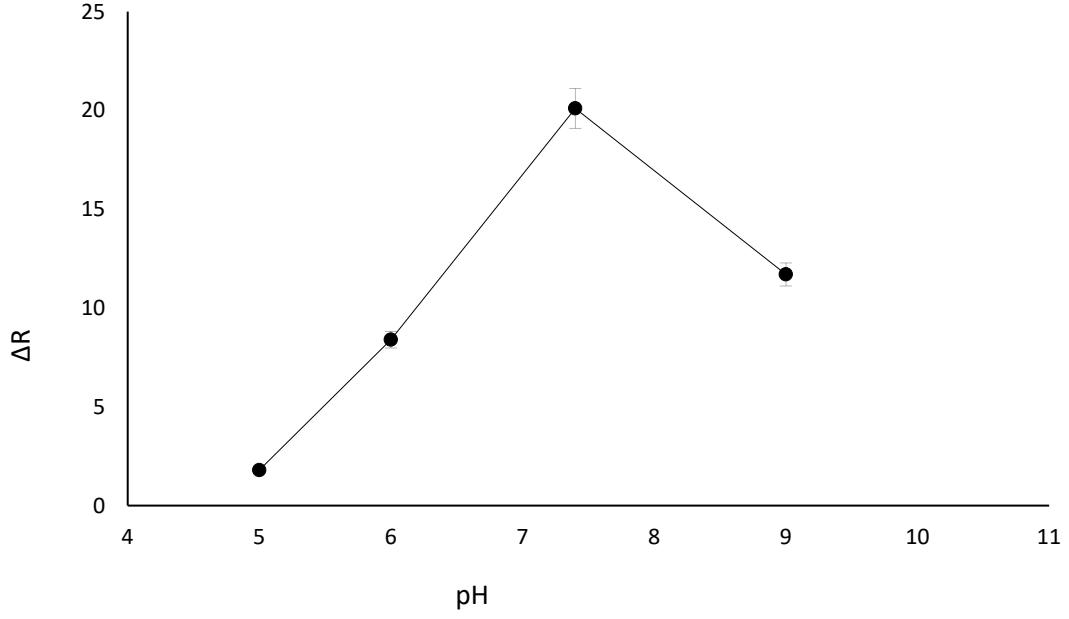
Elde edilen spektrumlara bakarsak;

SMX Baskısı içeren ve içermeyen polimer film kaplı çiplerin spektrumunda polimerik filmden kaynaklı $1210-1160\text{ cm}^{-1}$ 'de ester bağlarından kaynaklı (C-O) piki, 1718 cm^{-1} de karboksilik asit ve esterden gruplarından kaynaklanan (C=O) piki, $2980-2920\text{ cm}^{-1}$ 'de hidroksil(O-H) pikleri görülmektedir.

SMX Baskısı içeren çiplerin FT-IR spektrasında polimerden kaynaklı pikler ve kalıp molekülden kaynaklı; 1365 cm^{-1} 'de sulfonamid grubundan gelen bir piki (S=O), 1503 cm^{-1} 'de nitro grubundan kaynaklı (N-O) piki, 1218 cm^{-1} 'de karbon, azot bağı (C-N) kaynaklı pik görülmektedir. FT-IR karakterizasyonu sonucunda çiplerin yüzeyindeki kaplamaların çalışma kapsamında sentezlenen polimere ait olduğunu görülmektedir.

4.3. pH Etkisi

Ortamın pH'ının etkisi en iyi ortam pH'ını bulmak için $25.3\text{ }\mu\text{g/L}$ sülfametoksazol ile incelenmiştir. Fonksiyonel monomer ve kalıp molekülü protonlaması ve deprotonlamasından dolayı ortam pH'ı adsorpsiyon kapasitesini etkilemektedir. Şekilde 4.7'da görülebildiği gibi pH artışıyla birlikte sülfametoksazolün adsorpsiyon kapasitesi artmaktadır, bunun nedeni pH artışı ile Sülfametoksazolün amin gruplarının protonlanmasındaki azalmadır. pH azaldıkça da amin grupları daha fazla protonlanacağından fonksiyonel monomer metakrilik asit ile etkileşim yapacak grup sayısı azalacaktır. Optimum pH yapılan çalışmalarla 7,4 olarak bulunmuştur. Adsorpsiyon kapasitesinin bazik ortamda azalmasının sebebi ise metakrilik asitin deprotonlanmasıdır. Bunun sonucunda fonksiyonel grup ile etkileşim azalacaktır ve fonksiyonel monomerler ile kalıp arasındaki itme kuvvetleri artacaktır.



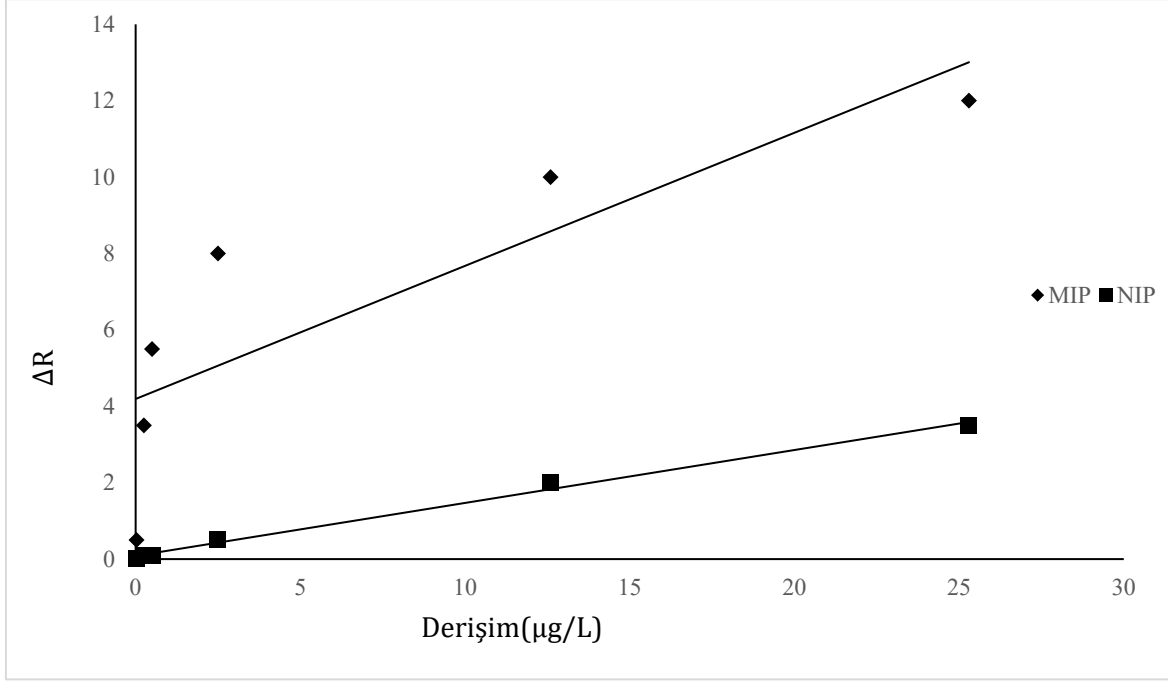
Şekil 4.7. pH etkisi (C: 0.025 µg/L, T=25°C).

4.4. Baskılama Etkisi

Sülfametoksazolün farklı mol oranlarındaki baskılama etkisi şekil 4.7’de gösterilmiştir. Şekil 4.8’den elde edilen adsorpsiyon değerleri sülfametoksazol baskılı poli MAA-EGDMA-HEMA nanofilmlerinde baskılı olmayanlara kıyasla daha yüksek olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar baskılı nanofilmlerde sülfametoksazol spesifik bağlanma bölgelerinin varlığını belirtmektedir.

Baskılı sensörlerin sülfametoksazolün baskılanma faktörü aşağıdaki eşitlikle hesaplanmıştır;

$$\text{Baskılanma Faktörü (IF): } \Delta R(\text{MIP}) / \Delta R(\text{NIP}) = 12 / 3.5 = 3.4$$



Şekil 4.8. Baskılama faktörü (C: 0.025-253.2 µg/L, T=25°C, pH 7.4).

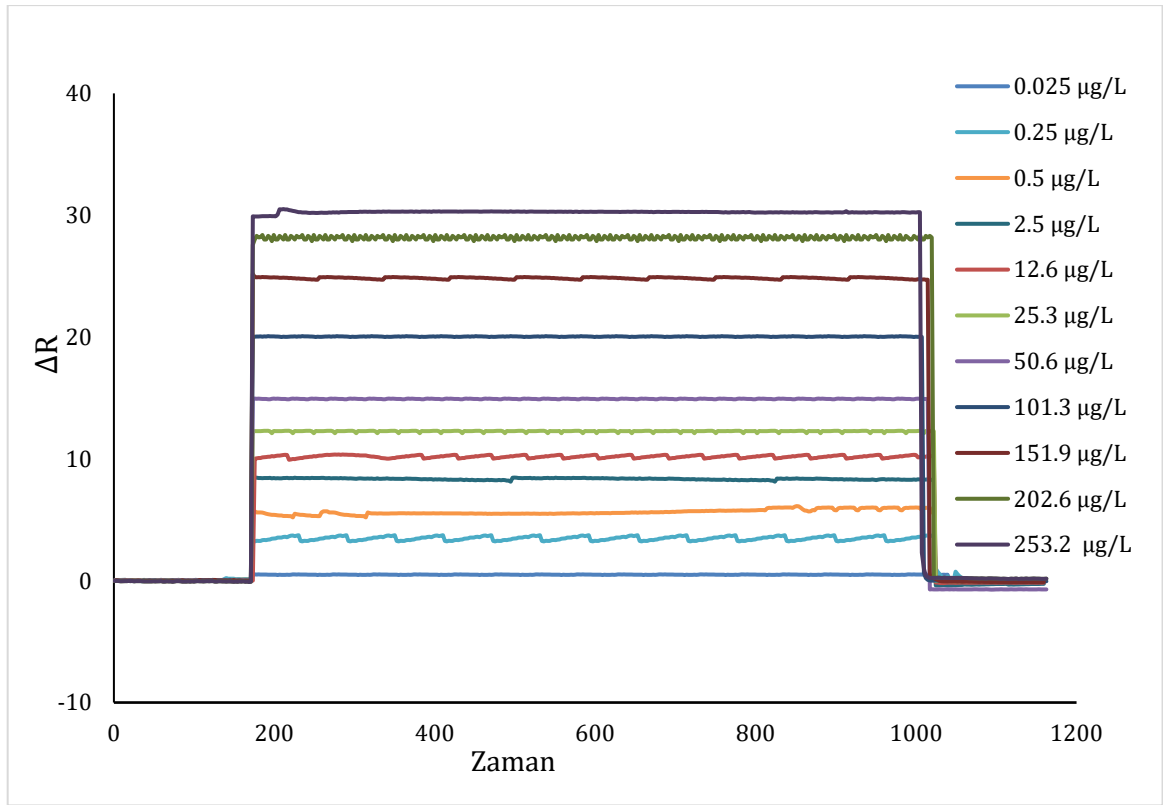
4.5. Adsorpsiyon Çalışmaları

4.5.1. İlk Derişimin Etkisi

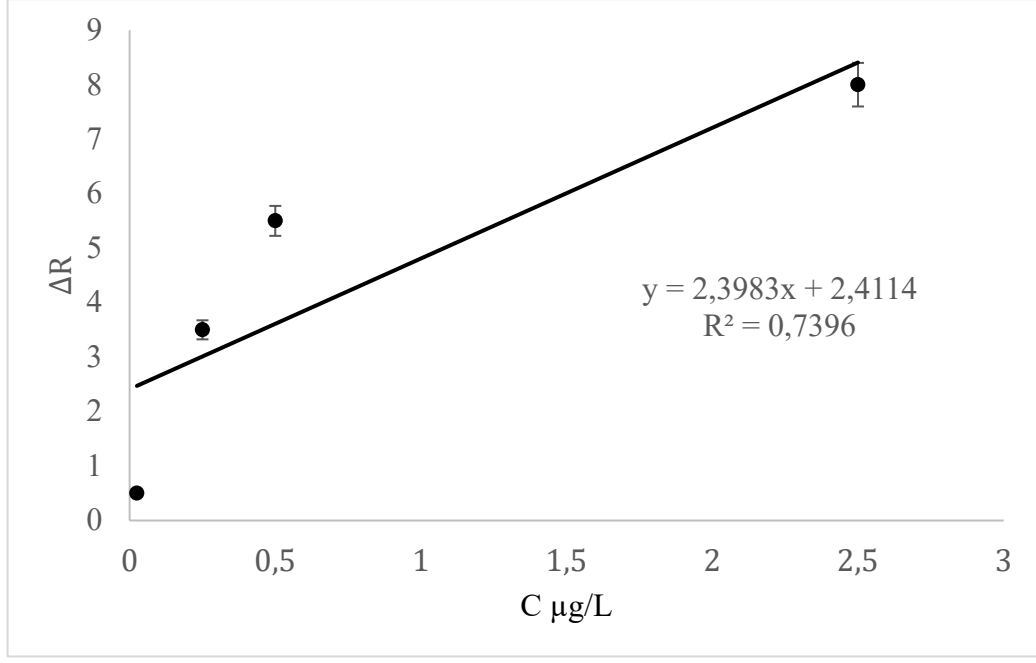
Sülfametoksazolün gerçek zamanlı ölçümü sülfametoksazol baskılı SPR nanosensörü tarafından yapılmıştır. SPR sinyali ile sülfametoksazol derişimi arasındaki oranı değerlendirmek için farklı derişimde sulfamethoksazol çözeltileri (0.025-253.2 µg/L) hazırlanmıştır. Daha sonra sulfamethoksazol baskılı nanosensör 25 nM fosfat tamponu ile pH 7.4 de 150 mL/dk akış hızıyla dengeye getirilmiştir. Ardından farklı derişimdeki sulfamethoksazol çözeltileri SPR sistemine uygulanmış ve elde edilen kinetik veriler SPRview programı ile hesaplanmıştır (derişime karşılık gelen yanıt şekilde gösterilmiştir). Tüm bu adsorpsiyon, desorpsiyon ve rejenerasyon döngüsü 20 dakika içinde tamamlanmıştır. Şekil 4.9'de farklı derişimde sülfametoksazol çözeltilisinin nanosensöre uygulanması sonucu elde edilen %kırma indisine karşılık zamanı grafiksel olarak göstermektedir. Şekilde 4.10'da %kırma indisinin nanosensör yüzeyine uygulanan sulfamethoksazol derişiminin artmasıyla arttığını göstermektedir. Derişimin artması aynı zamanda sulfamethoksazol çözeltilisi ile sulfamethoksazol baskılı SPR biyosensör arasındaki itici gücü artırır. SMX derişimi 0.025 µg/L dan 253.2 µg/L'e arttığında %ΔR değeri de sırası ile 0.5 den 30'a artmaktadır. 0.025 - 253.2 µg/L arasında yapılan çalışmalar sonucu elde

edilen $\% \Delta R$ değerleri ile yapılan hesaplamalarla eğrinin denklemini incelediğimizde; bu sülfametoksazol baskılı SPR biyosensörün sülfametoksazolü 0.025 - 2.5 $\mu\text{g/L}$ ve 12,6 - 253.2 $\mu\text{g/L}$ derişim aralığında sırası ile %74 ve %97 kesinlikle ölçebileceğini göstermiştir.

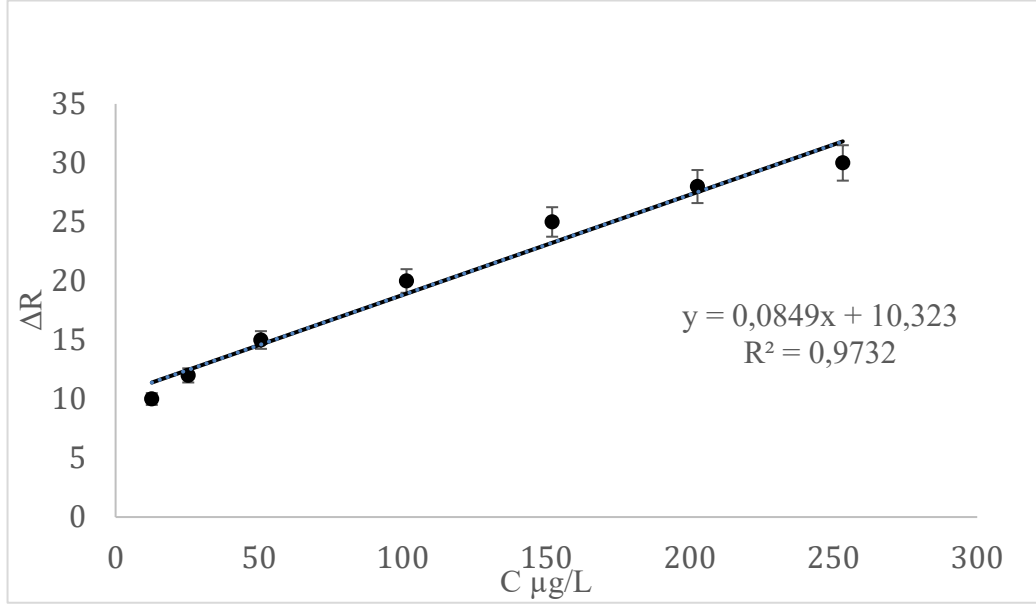
Sonuçlara istinaden LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır. 3s/m ve 10s/m eşitlikleri sırasıyla LOD ve LOQ değerlerini hesaplamak için kullanılmıştır. Bu eşitlikte (s), (ΔR) ve (m) değerleri sırasıyla denge çözeltisi nanosensör yüzeyinden geçerken alınan sinyal değeri, ölçümün standart sapma değeri ve kalibrasyon eğrisinin eğimidir. Deney sonunda LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.0011 $\mu\text{g/L}$ ve 0.0034 $\mu\text{g/L}$ olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.9. Gerçek zamanlı sülfametoksazol için SPR çipi sensogramı (C: 0.025-253.2 $\mu\text{g/L}$, T=25°C, pH 7.4).



a



b

Şekil 4.10. Sülfametoksazol baskılı SPR biyosensörünün kalibrasyon grafiği a: 0.025- 2.5 µg/L b: 12,6-253.2 µg/L arasındaki sülfametoksazol çözeltisine verdiği yanıtın kalibrasyon eğrisi. (T=25°C, pH 7.4).

4.5.2. Denge Analizi

Bazı kabuller (serbest analit derişiminin akış hücrelerinde sabit kaldığı kabul edildi) ile adsorpsiyon aşağıdaki eşitlikte açıklandı.

Eşitlik (1):

$$d\Delta R/dt = k_a C \Delta R_{max} - (k_a C + k_d) \Delta R \quad 1$$

Bu denklemde, $d\Delta R / dt$, SPR biyosensörünün sinyalindeki değişim oranıdır, ΔR ve ΔR_{max} değerleri sırası ile ölçülen ve maksimum cevap sinyalleridir, C sülfametoksazol çözeltisinin derişimidir, k_a ile k_d (s^{-1}) sırasıyla bağlanma ve ayrışma sabitidir.

Bağlanma sabiti $K_A = k_a/k_d$ olarak bulunabilir. Genel olarak dengede $d\Delta R/dt = 0$ 'dır.

Denge eşitlik olarak;

$$\Delta R_{eq}/C = K_A \Delta R_{max} - K_A \Delta R_{eq} \quad 2$$

K_A değeri $\Delta R_{eq}/C$ 'e karşılık ΔR_{eq} grafiğinin eğiminden elde edilebilir ve ayrılma sabiti K_D ise $1/K_A$ olarak bulunur.

Eşitlik 1 Eşitlik 3 için revize edilirse:

$$d\Delta R/dt = k_a C \Delta R_{max} - (k_a C + k_d) \Delta R \quad 3$$

$d\Delta R/dt$ 'a karşılık ΔR grafiği eğrisi düz bir çizgi ve eğim $-(k_a C + k_d)$ olacaktır. Başlangıç bağlama oranı ise sülfametoksazol derişimi ile kıyaslanabilir. Eğer ΔR_{max} tanımlanmış ise hem k_a hemde k_d değeri bağlanma sensogramından ifade edilebilir. Tercih edilen metot ise bağlanma sensogramını farklı derişimlerde sülfametoksazol ile tanımlamaktır. İleri ve geri oranları, Eşitlik 4'teki gibi ileri ve geri hızları ilişkilendiren eğim olarak bir s değeri sağlar ve ΔR 'ye karşı bir $d\Delta R / dt$ grafiğinden elde edilir:

$$s = k_a C + k_d \quad 4$$

S 'ye karşı C grafiğindeki doğrusal çizgi k_a (şekil 4.11) değerini verir. Teoride $k_d C$ değeri sıfıra eşitse ölçülebilir fakat bu şekilde ayrılma sabiti ölçümü eğer $k_a C \geq k_d$ ise güvenilir olmaz.

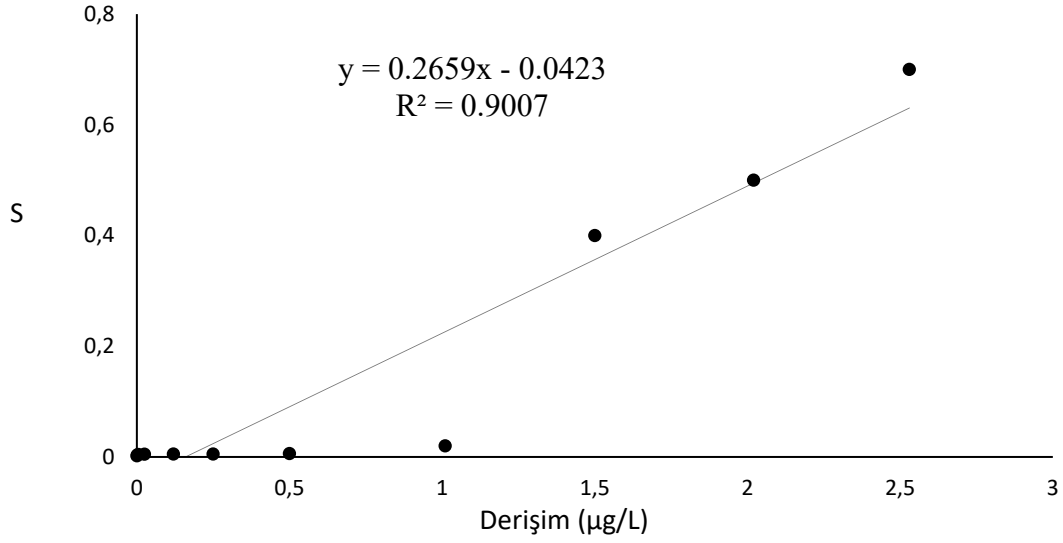
$$k_a C \geq k_d$$

S 'ye karşı C grafiği, bağlanma oranı parametrelerinin değerlerini verir, bu parametreler çizelge 4.4'te gösterilmiştir.

Ayrılma Eşitlik 5'te Ölçülmüştür:

$$\ln(\Delta R_0/\Delta R_t) = k_d(t - t_0) \quad 5$$

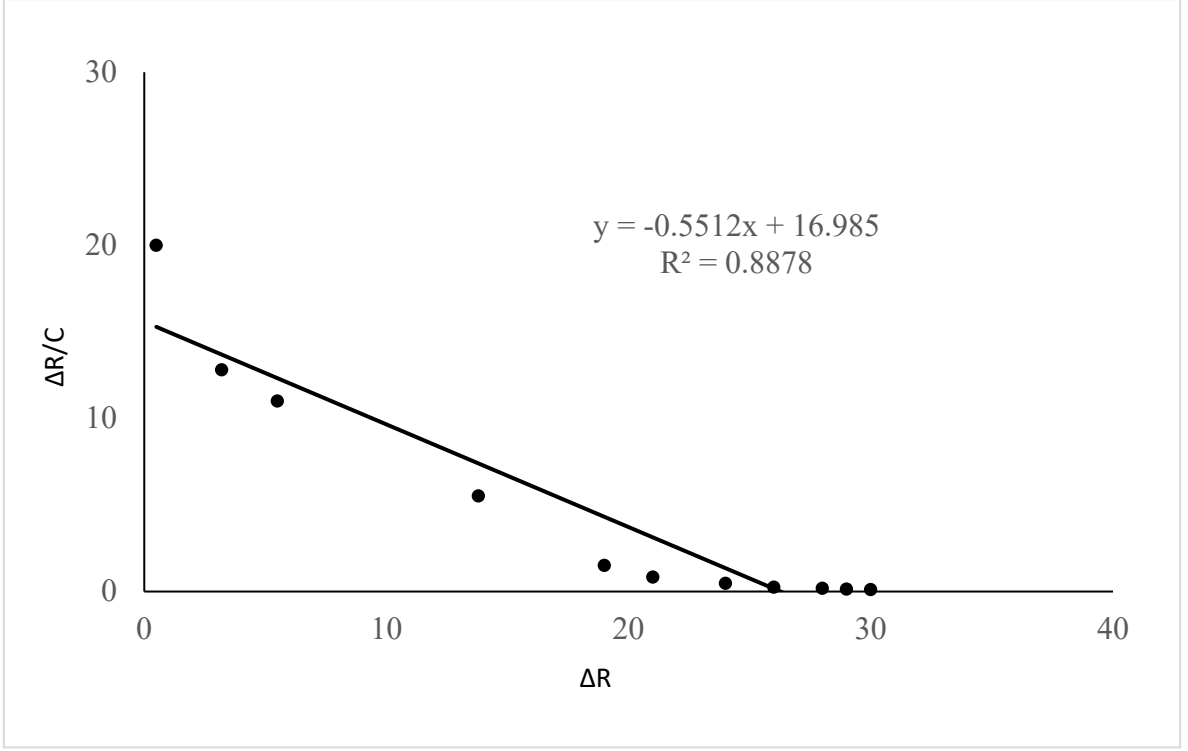
ΔR_0 değeri t_0 ; ΔR anındaki başlangıç yanıtıdır. ΔR ve t ayrılma eğrisinden elde edilir. Bağlanma kinetik grafiği şekil 4.11'da gösterilmiştir.



Şekil 4.11. Kinetik orantı sabitlerinin hesaplanması: Bağlanma kinetik analizi.

Denge durumunda geri dönüşümlü etkileşimi inceleyip toplam bağlanma bölgesini bulmak için Scatchard denge analizi uygulanmıştır.

$$\Delta R_{ex}/C = K_A(\Delta R_{max} - \Delta R_{eq})$$



Şekil 4.12. Kinetik oran sabitlerinin ölçümü. Denge Analizi.

Çizelge 4.4. Denge ve bağlanma kinetik sabitleri.

Bağlanma Kinetik Analizi		Denge Analizi	
k_a ($\mu\text{g/Ls}$)	0.27	ΔR_{max} ($\mu\text{g/cm}^2$)	30.6
k_d (1/s)	0.04	K_A ($\mu\text{g/L}$)	0.55
K_A ($\mu\text{g/L}$)	6.75	K_D (L/ μg)	1.8
K_D (L/ μg)	0.15	R^2	0.89
R^2	0.9		

4.5.3. Termodinamik İzoterm Modelleri

Üç farklı izoterm modeli, Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich, adsorpsiyon davranışını ve nanofilm ile sülfametoksazol arasındaki etkileşimi ifade etmek için uygulanmıştır:

Langmuir ve Freundlich modelleri, SPR çipinin yüzeyinde sülfametoksazol baskılı polimerik nanofilmin homojenliğini veya heterojenliğini tanımlamak için kullanılmıştır. Langmuir modeli, bağlanma bölgelerinin eşit enerji ile homojen bir şekilde bağlanan ve her

bağlanma bölgesi yalnızca bir analit yakalayabildiğini açıklamaktadır (şekil 4.13). Freundlich modeli, bir yüzeye heterojen bağlanmayı anlatmaktadır (şekil 4.14). Langmuir-Freundlich modeli, her iki sisteme de ayrı ayrı tam olarak uymayan bir sistem için uygundur ve geniş bir konsantrasyon aralığı için heterojen yüzeyin davranışını açıklar (şekil 4.15).

Langmuir:

$$\Delta R = (\Delta R_{max} C / K_D + C)$$

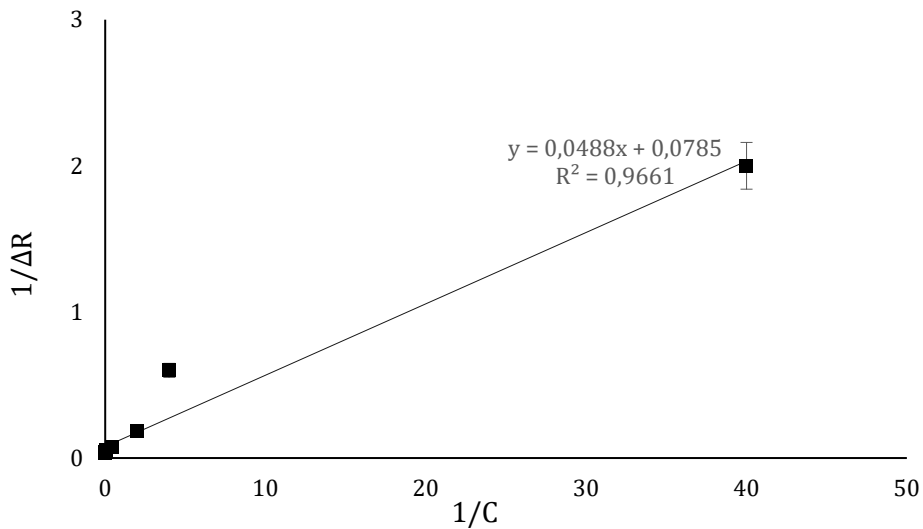
Freundlich:

$$\Delta R = \Delta R_{max} C^{1/n}$$

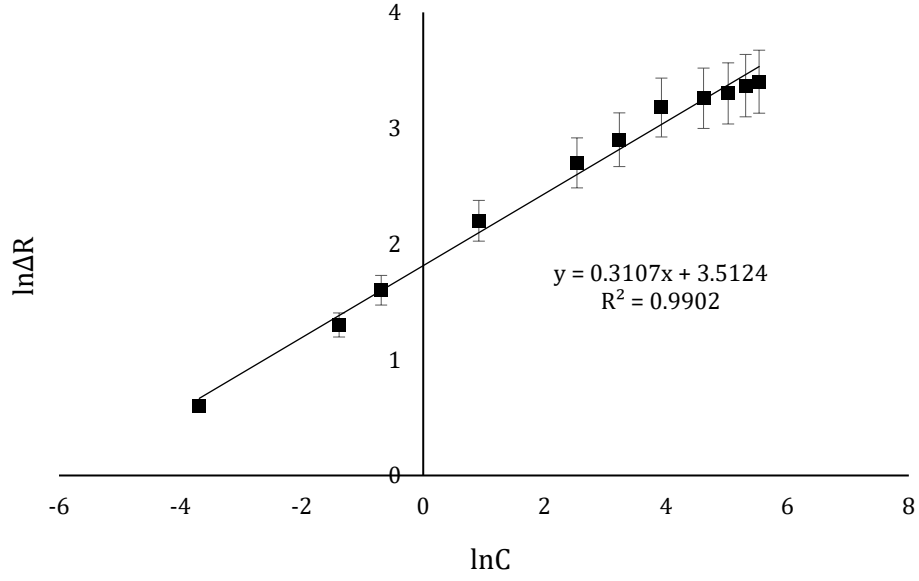
Langmuir-Freundlich:

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

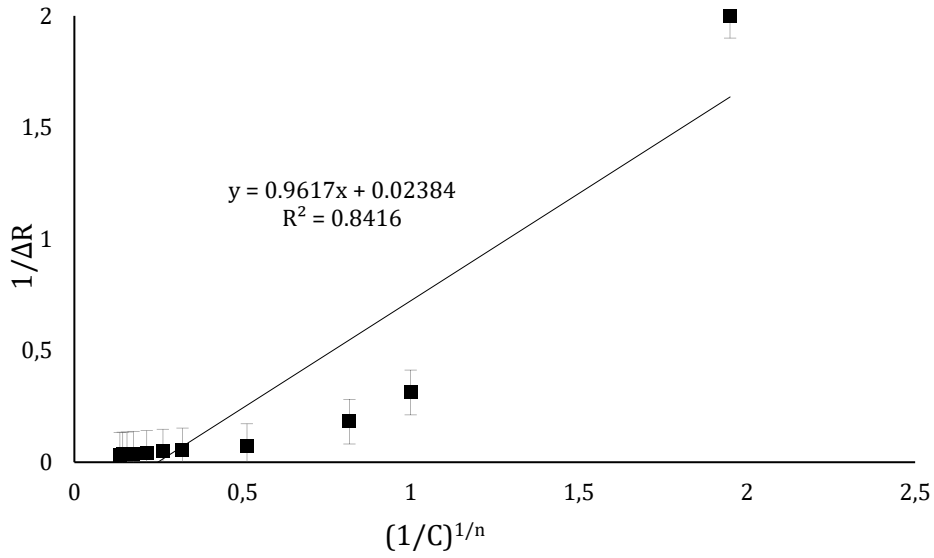
1/n değeri Freundlich izoterminin heterojenlik indeksidir, bu değerin 0-1 aralığında olduğunda, adsorpsiyon uygun ve olumludur, 1/n = 1 olduğunda, adsorpsiyon tersinmezdir, ayrıca 1/n > 1 olduğunda, adsorpsiyon olumsuz. Bu değer sıfıra yaklaştıkça adsorpsiyon daha heterojen hale gelir.



Şekil 4.13. Langmuir adsorpsiyon izotermi modeli.



Şekil 4.14. Freundlich adsorpsiyon izotermi metodu.



Şekil 4.15. Langmuir-Freundlich adsorpsiyon izoterm modeli.

Çizelge 4.5'te görülebildiği gibi proses Freundlich izotermi korelasyon katsayısı (R^2) ile tam uyumludur ve bu adsorpsiyonun sensör üstüne heterojen olarak gerçekleştiğini belirtmektedir. Ayrıca, Freundlich izoterminden hesaplanan $1/n$ değerleri de bu sonuçları desteklemektedir, bu değer sıfır 'a' yakındır, yani heterojen ve çok tabakalı bağlanma meydana gelmiştir. Sonuç olarak, Freundlich izotermi, sülfametoksazol baskılı SPR

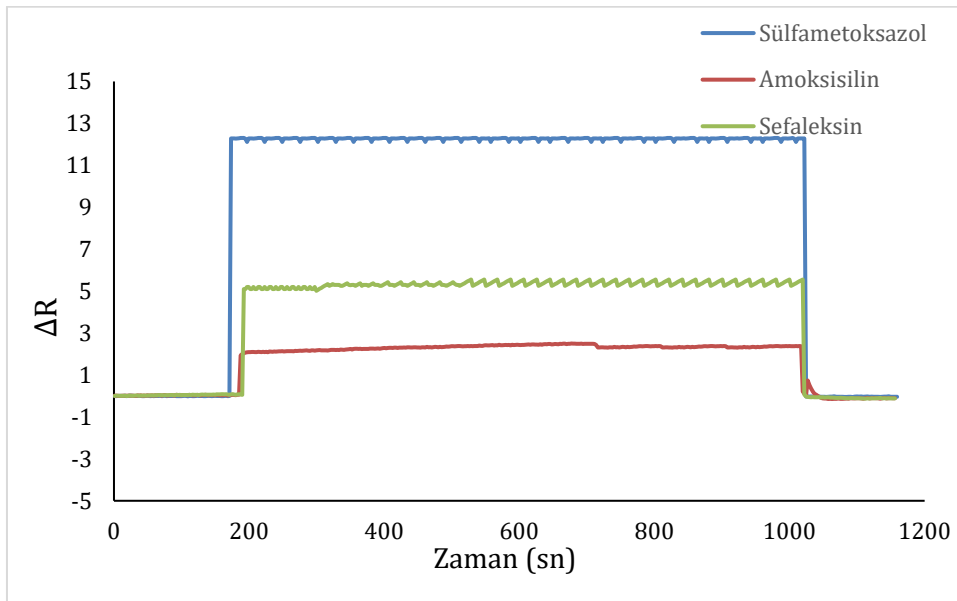
biyosensörünün üzerine sülfametoksazol adsorpsiyonunu açıklamak için Langmuir izoterminden daha uygundur.

Çizelge 4.5. Adsorpsiyon izoterm modelleri.

Langmuir		Freundlich		Langmuir-Freundlich	
ΔR_{max} :	14.2	ΔR_{max} :	33.3	ΔR_{max} :	43.4
K_D	0.003	$1/n$	0.31	$1/n$	0.31
K_A	294	R^2	0.99	K_D	0.022
R^2	0.97			K_A	45.5
				R^2	0.84

4.5.4. SPR Nanosensörünün Seçiciliği

Sülfametoksazol baskılı nanofilm kaplı sensör çipi ile sülfametoksazol baskısı içermeyen çipin seçiciliği amoksisilin, sefalekssin ve sülfametoksazol için incelenmiştir. Elde edilen sensogram şekil 4.16’te verilmiştir.



Şekil 4.16. Sensörün farklı bileşiklere karşı seçiciliği (C= 25.3 µg/L, T=25°C, pH 7.4).

Seçicilik çalışması için baskılı ve baskısız polimer film kaplı çiplerin seçicilik katsayısı ve bağıl seçicilik katsayısı aşağıdaki eşitliklerle hesaplanmıştır;

Seçicilik katsayısı;

$$k = \Delta R_{SMX} / \Delta R_{yarışmacı}$$

Bağıl seçicilik katsayısı;

$$k' = k_{MIP} / k_{NIP}$$

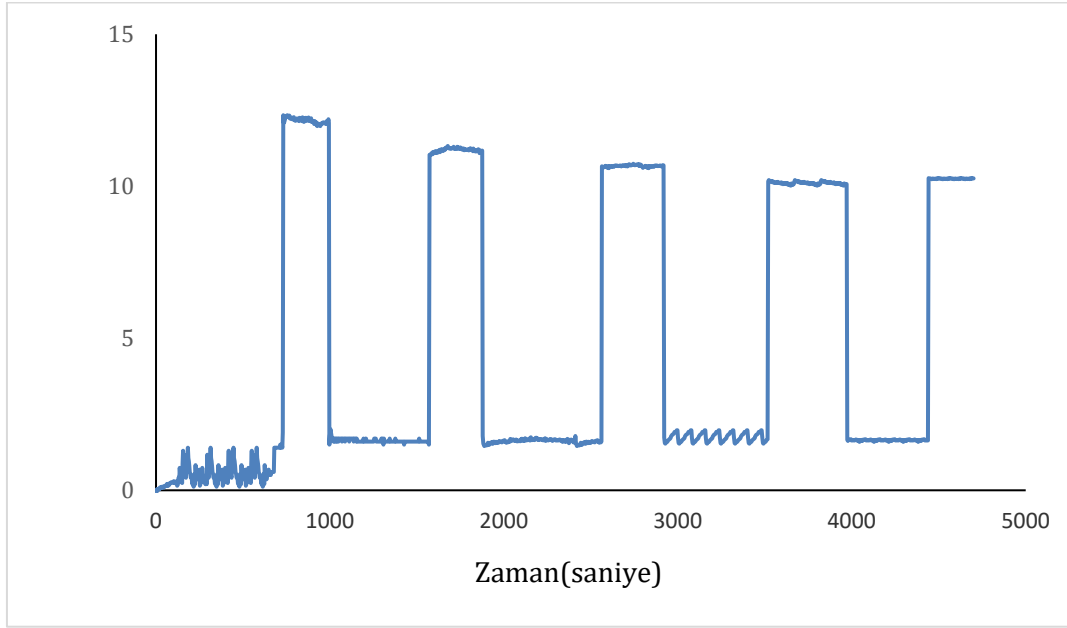
Analiz sonucu her iki çipin kullanılan analitlere karşı seçicilik katsayısı ve bağıl seçicilik katsayısı çizelge 4.6'de verilmiştir

Çizelge 4.6. Seçicilik Sabitleri.

	MIP		NIP		
	ΔR	k	ΔR	k	k'
Sülfametoksazol	12,3		2,3		
Amoksisilin	2,1	5,7	5,1	0,45	12,7
Sefaleksine	5,3	2,3	3,5	0,66	3,4

4.5.5. Tekrar Kullanılabilirlik

Sülfametoksazol baskılı nanofilm kaplı sensörün tekrar kullanılabilirliği 25.3 µg/L sülfametoksazol çözeltisi ile incelenmiştir. Beş kez art arda yapılan denge-adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü sonucu elde edilen değerlerden elde edilen sensogram şekil 4.17.'de verilmiştir.

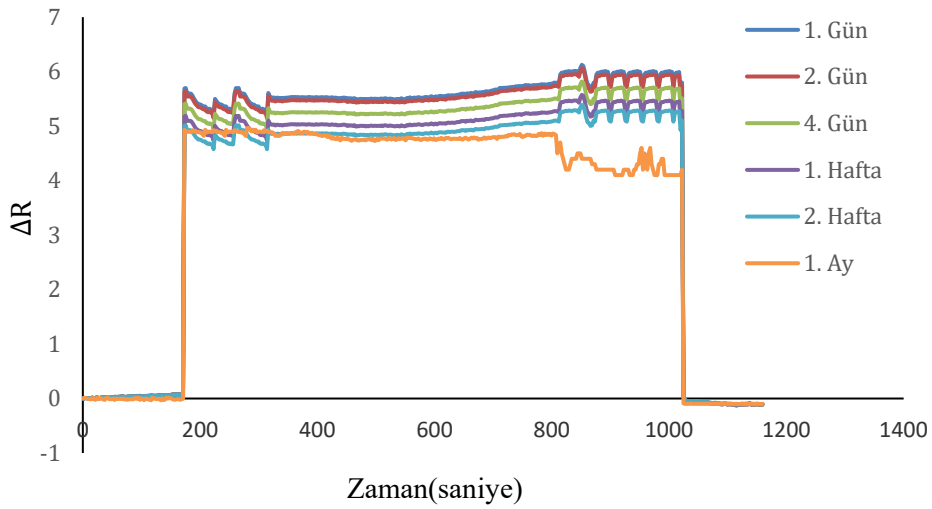


Şekil 4.17. Nanosensörün tekrar kullanılabilirliği (C= 25.3 µg/L T=25°C, pH 7.4).

Sonuçlar hazırlanan SPR çipinin arka arkaya beş kullanımında sensör kapasitesinde bir azalmaya sebep olmadığını göstermiştir. Bu sonuç bize sensörün tekrar kullanımının mümkün olduğunu göstermektedir.

4.5.6. Depolanabilirlik

Sülfametoksazol baskılı nanosensörün depolama sonrasındaki kullanımı incelenmiştir. Sensör çipi üretildikten sonra çipin üretildiği gün, üretildikten bir gün sonrası, dördüncü günü, birinci haftası, ikinci haftası ve birinci ayındaki çipin sülfametoksazol için ölçüm kabiliyeti 25.3 µg/L sülfametoksazol çözeltisi ile yapılan analizlerle incelenmiştir.



Şekil 4.18. Nanosensörün depolanabilirlik çalışması sonucu elde edilen sensogram (C= 25.3 µg/L T=25°C, pH 7.4).

Yapılan çalışma sonucu elde edilen sensogram şekil 4.18'de verilmiştir. Sonuç olarak hazırlanan SPR çipinin uygun depolama koşullarında özelliklerini koruduğu bulunmuştur.

4.6. Gerçek Numune Çalışmaları

Gıda güvenliğini artırmak için, antibiyotik tayini gıdalarda önemlidir. Sülfametoksazol tayini için geliştirdiğimiz sülfametoksazol baskılanmış SPR nanosensör yöntemin gerçekliğini doğrulamak için süt numuneleri ile analizler yapılmıştır.

Sülfametoksazol baskılanmış SPR nanosensörleri ile gerçek numunelerden sülfametoksazol tayini için iki farklı ticari süt numunesinden, sülfametoksazol çözülmüş süt özü hazırlanmıştır.

Sülfametoksazol tayini ilk olarak SPR yapılmış ve daha sonrasında sonra UV spektroskopi yöntemiyle tekrar tayin edilmiştir. Sülfametoksazol çözülmüş süt özlerini hazırlanması ve seyretme işlemi bölüm 3.5'te anlattığımız gibi yapılmıştır. SPR yöntemi için ilk olarak 7.4 pH fosfat tamponu sistemi dengelemek için sisteme verilmiştir, daha sonra süt özleri dört farklı derişimde (2.5, 25.3, 202.6, 253.2 µg/ L) sisteme verilmiştir ve son olarak kalıp molekülü çipin yüzeyinden ayırmak için 0.5 M NaCl desorpsiyon çözeltisi sisteme verilmiştir. Sülfametoksazol tayini UV spektroskopisinde de dört farklı derişimde (2.5, 25.3, 202.6, 253.2 µg/ L) yapılmıştır. İki yöntemi karşılaştırmak için iki yöntem için ayrı ayrı geri kazanım miktarı hesaplanmış ve karşılaştırmıştır (çizelge 4.6). Çizelgede görüldüğü gibi geliştirdiğimiz SPR nanosensör yöntemiyle elde ettiğimiz geri kazanım miktarları UV spektroskopi yöntemine göre daha yüksek, bu sonuç geliştirdiğimiz yöntemin daha elverişli olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.7. SPR nanosensör yönteminin UV spektroskopisiyle validasyonu.

Eklenen (µM)	Bulunan (µM)				Geri Kazanım (%)	
	SPR		UV		SPR	UV
	Örnek 1	Örnek 2	Örnek 1	Örnek 2		
2.5	2.44	2.42	1.8	1.9	97.2	74
25.3	24.8	25	20.6	22	98.4	84.2
202.6	201.5	201.8	191	190	99.5	94.0
253.2	249.1	251.5	238	234.2	98.8	93.2

4.7. Literatür Özeti ve Karşılaştırma

Aşağıdaki çizelgede SMX için yapılmış literatürdeki sensör çalışmaları verilmiştir. Çizelge dahilinde sensörün SMX’i tayini için kullandığı reseptör ve türü, sensörün türü, örnek ortamı ve LOD&LOQ değerleri verilmiştir.

Çizelge 4.8. SMX için geliştirilmiş diğer biyosensörler.

Sensör Türü	Tanma Yöntemi	Örnek	LOD	LOQ	Referans
Elektrokimyasal-DVP	MWCNT-Pbnc/SPE*	İdrar	38 nm/L	-	184
Elektrokimyasal	HT-BDD Elektrot*	Su	3.65 µg/L	12.2 µg/L	185
Elektrokimyasal	GR-ZnO/GCE*	Su ve biyolojik sıvılar*	0.4 µg/L	-	186
Elektrokimyasal	MWCNT-SbNPs-Parafin*	Su	6.1 µg/L	-	187
Piezoelektrik Sensör	İyon Çifti Kompleksi-PVC Matriks	Su, idrar	5.0×10^{-7} M	-	188
Elektrokimyasal	MIP/BDD Elektrot	Su*	24.1 nM	-	189
Elektrokimyasal-Biyosensör	Tyrosin-AuNPs-SPCEs*	Su*	22.6±2.1 µM	-	190

Elektrokimyasal	g-C3N4/ZnO/GCE	İnsan Serum	0.0066 μ M	-	191
Elektrokimyasal	P-DAN-GCE*	Tablet, İdrar*	0.05 nM	-	192
Elektrokimyasal	BDD	Etanol+*	1.15×10^{-6} mol/L	-	193
Elektrokimyasal	MIP	Su	3.59×10^{-4} mM	1.20×10^{-3} mM	194
Optik	MIPCH*	Su	1×10^{-16} M	-	195
Biyoassay*	<i>B. Licheniformis</i> *	Süt	77 μ g/L	-	196
Flüoresans Sensör	GQD-SMIP*	Su	1 μ M	-	197
SPR Temelli Sensör	SMX-Baskılı MAA-EGDMA-HEMA Polimer	Su	0.0011 μ g/L	0.0034 μ g/L	Bu çalışma

[185] Livia F. Sgobbi ve arkadaşları tarafından, sülfametoksazol ve trimethoprim tespiti bir organik boya olan prussian blue nanoküpleri ile modifiyeli nanotüpler ile idrar örneklerinde bu antibiyotiklerin analizini yapabilen tek kullanımlık elektrokimyasal sensör üretilmiştir. Yapılan çalışmalara göre bu sensör ile ölçümün tayin limiti 38 nm/L'dir

[186] Leonardo S. Andrade ve arkadaşları tarafından sülfametoksazol ve trimethoprim tespiti için hidrojen boron katkılı (HT-BDD) ve oksijen boron katkılı (OT-BDD) elmas elektrotlar üretilmiş ve performans kıyaslaması yapılmıştır. Yapılan araştırma sonucu OT-BDD elektrotların sulfamethoksazolü HT-BDD elektrotlara kıyasla daha az okside edebilmesinden (20 kat daha az) dolayı HT-BDD elektrotların analiz için daha uygun

olduğuna karar kılmışlardır. HT-BDD elektrotlar ile ölçümde tayin limiti olarak 3,65 µg/L bulmuşlardır.

[187] Xi zhuang ve arkadaşları grafen ve çinko oksit (ZnO) temelli nanoçubuklar ile modifiye edilmiş cam elektrotlar ile sülfametoksazol ve trimethoprim analizi yapmışlardır. Yapılan çalışmada çeşmeden ve gölden alınan su örnekleri ve insan idrarı kullanılmıştır. Araştırmaları sonucu sülfametoksazol için 0.4 µg/L tayin limiti hesaplamışlardır.

[188] I. Cesarino ve arkadaşları antimon nanopartikül ile modifiyeli çok duvarlı karbon nanotüp temelli parafin kompozit elektrotlar ile sülfametoksazol ve trimethoprimin voltametrik ölçümü yapmışlardır. Üretilen modifiyeli nanoyapıyı TEM ile karakterize etmişlerdir ve bu malzeme modifiyeli elektrot ile doğal sularda sülfametoksazol ve trimethoprim analizi yapmışlardır. Yapılan sonucu tayin limitini 6.1 µg/L bulmuşlardır.

[189] Bu çalışmada Yuan J. ve arkadaşları tarafından sulfa sınıfı ilaçlara duyarlı iyon çifti kompleksi (sulphadiazine - cetyltriocetylammmonium) modifiyeli PQC rezonatör üretilmiştir. 1.0×10^{-7} M ve 1×10^{-5} M derişim aralığında; Sulfadiazin, sulfadiazol, sülfametoksazol, sulfasetamid antibiyotikleri ile deneme yapılmış ve tayin limitleri ölçülmüştür 8.0×10^{-8} , 2.0×10^{-7} , 5.0×10^{-7} , 5.0×10^{-7} M olarak kaydedilmiştir.

[190] Y. Zhao ve arkadaşları bu çalışmada yüzey sularında sülfametoksazolu analiz etmek için elektro polimerizasyon tekniği ile pirolden üretilmiş moleküler baskılı polimerler ile BDD elektrotu modifiye etmeyi amaçlamışlardır. Çalışma sonunda üretilen sensör moleküler baskılı polimerin etkisi ile sülfametoksazole karşı yüksek seçicilikle bağlandığı ve tekrar edilebilir olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan analiz sonucunda ise tayin sınırı 24.1 nM bulunmuştur.

[190] Bu çalışmada del Torno-de Román L ve arkadaşları sülfametoksazol analizi için tirozin moleküllerini altın nanopartikülle modifiye edilmiş karbon SPE elektrotta çapraz bağlayarak tek kullanımlık amperometrik bir biyosensör üretmeyi amaçlamışlardır. Üretilen biyosensör çeşme suyu da dahil olmak üzere ispanyanın belirli bölgelerinden alınan farklı

su örnekleri üstünde denenmiş ve sülfamethoksazol için tayin limitinin $22.6 \pm 2.1 \mu\text{M}$ olduğu ölçülmüştür.

[191] Paramasivam Balasubramanian ve arkadaşları bu çalışmada sülfametoksazol analizi için grafitik karbon nitrit ve çinko oksit nano kompozit (nanotüp) modifiyeli cam elektrot ile voltametrik ölçüm yapmışlardır. Üretilen sensör ile kan serumu örnekleri üstünde de denemeler yapılmış ve sülfametoksazol için tayin limiti $0.0066 \mu\text{M}$ olarak ölçülmüştür.

[192] Bu çalışmada Chasta H. ve arkadaşları ürettikleri poli 1,5 Diaminonaftalin polimeri ile modifiye edilmiş cam elektrot ile voltametrik analizler yapmışlardır. Modifiye elektrot alan etkili SEM(FE-SEM) , elektrokimyasal impedans spektroskopisi ve dairesel voltametri ile karakterize edilmiştir. Üretilen modifiye elektrot ile sülfametoksazol tayini farmakolojik preparatlar ve sülfametoksazol tedavisi gören insanlardan alınan idrar örneklerinde uygulanmıştır. Tayin sınırı yapılan ölçümler sonucu 0.05 nM olarak bulunmuştur.

[193] Souza C.D. ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada BDD elektrodu ile sulfadiazin ve sülfametoksazol için amperometrik ölçüm yapılmıştır ve bu ölçüm metodunu HPLC ile kıyaslamışlardır. Ölçüm ortamı olarak sulfadiazin için sülfirik asit, etanol çözeltisinde sulfamethoksazol için ise etanol, fosfat tamponu kullanılmıştır. Bu iki antibiyotik için elde edilen tayin limiti değerleri sırası ile 2.19×10^{-6} ve $1.15 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ olarak ölçülmüştür. Yapılan ölçüm verilerini HPLC ile yapılan ölçümlerle kıyasladıklarında ise; sulfadiazin ve sülfametoksazol için elde edilen bağıl hata oranlarını sırası ile: -4.31% sulfadiazin ve -0.79% sülfametoksazol olarak bulmuşlardır.

[194] Ozkorucuklu, S.P ile arkadaşları bu çalışmada Poli-pirol ile baskılı ve baskısız polimer filmler sentezleyip bu polimerlerin sülfametoksazol ile olan bağlanma etkileşimi incelenmiştir. Sentezlenen polimer filmler ile kaplı elektrolar ile sülfametoksazolün ölçümü yapılmıştır. Yapılan analizler sonucu tayin limiti $3.59 \cdot 10^{-4} \text{ mM}$ bulunmuştur.

[195] Bu çalışmada sülfametoksazol baskılı iki boyutlu fotonik kristal hidrojel (MIPCH) ile sülfametoksazol duyarlı optik bir sensör üretilmiştir. Yapılan çalışmalarda sülfametoksazol

dışında yapısal analogları olan; sülfisoksazol, sulfadiazin ve sülfametazin ile de seçiciliği kontrol edilmiş ve en yüksek seçiciliğinin sülfametoksazole karşı olduğu gözlemlenmiştir. Su örneklerinde yapılan denemeler ile üretilen sensörün tayin limiti $1 \times 10^{-16} \text{M}$ olduğu hesaplanmıştır

[196] Bu çalışmada Tumini M. ve arkadaşları ürettikleri beş farklı biyoassay (B, T,M,Q,QS) ile 6 antibiyotik sınıfına (Beta-laktamlar, kinolonlar, sulfonamidler, aminoglikosidler, makrolidler) dahil antibiyotikleri incelenmiştir. Sülfametoksazol için süt örnekleri üzerinde yapılan analizlerin sonuçlar sırası ile 4100 1900 1900 1400 $77 \mu\text{g/L}$ 'dir. Bu farklı deney kitleri arasında en hassas olan QS assayinde *B. Licheniformis* türü bakteri kullanılmıştır.

[197] Le, T.H. ve arkadaşları sülfametoksazol tayini için flüoresans sensör yapmayı hedeflemişlerdir. Bu sensör için üretilmiş grafenden yapılmış kuantum noktaları sülfametoksazol baskılı silikat polimeri içine hapsedilmiştir. Bu çalışmada reseptöre bağlanan sülfametoksazol miktarındaki artış ile kuantum noktalarının flüoresans ışımadaki değişim arasındaki oranından faydalanarak sülfametoksazol tayini yapılmaktadır. Hesaplanan tayin limiti bu metot için $1 \mu\text{M}$ 'dür.

Bu çalışmada hazırlanan SPR sensör sistemiyle sülfametoksazol tayini yapılmıştır. Bu amaçla polimer film oluşturulmuştur. Oluşturulan polimer film ile sulu ortamda ve spike edilen süt örneklerinde SMX tayini yapılmıştır. Hazırlanan sensör sisteminin LOD ve LOQ değerleri sırası ile $0.0011 \mu\text{g/L}$ ve $0.0034 \mu\text{g/L}$ olarak bulunmuştur. Sonuçlar hazırlanan sensör sisteminin SMX tayini için potansiyel olduğunu göstermektedir.

5. YORUM

SMX baskılı polimer nanofilm kaplı SPR altın çipleri ile yapılan modelleme çalışmaları, karakterizasyon ve adsorpsiyon çalışmaları sonucunda;

Modelleme çalışması sonucunda çalışma kapsamında üreteceğimiz moleküler baskılı polimeri etkileyecek önemli faktörler olan monomer-kalıp oranı ve uygun çözücü incelenmiştir. Bu incelemeler B3LYP hibrid teorisi ve 6-31G+(d, p) baz seti kullanılarak laboratuvarında herhangi bir deneye gereksinim duyulmadan yapılmış ve başarılı bir şekilde uygulanmıştır.

SPR sensör çipleri üretildikten sonra temas açısı, SEM, AFM ve FT-IR karakterizasyonu yapılmıştır;

Temas açısı ölçüm değerleri çıplak SPR çip, alil merkaptan modifiyeli çip ve SMX baskılı polimer kaplı SPR çipleri için temas açısı değeri sırası ile ; $71.01 \pm 0,78$, 69.0 ± 1.09 , 66.0 ± 0.97 olarak bulunmuştur. Alil merkaptan modifiyeli çipin temas açısı değeri hidrofilik karaktere bağlı olduğundan polimer film kaplamanın yüzey hidrofilitasını arttırdığını göstermektedir.

AFM ölçümleri sonucunda baskılı sensör ve çıplak sensörlerin yüzey pürüzlülüğü kontrol edilmiştir. Çalışmalar sonucunda yüzey derinliği sırası ile 20,67 nm ve 8,5 nm olarak bulunmuştur.

SEM karakterizasyonu ile çiplerin yüzey morfolojisi incelenmiş, yapılan karakterizasyon çalışması sonucu SPR sensör çipi yüzeyinde polimerik film kaplamanın başarılı bir şekilde yapıldığı ve yapılacak diğer işlemler için uygun olduğu görülmüştür.

SMX baskılı polimer film kaplı SPR çipinin ve SMX içermeyen polimer film kaplı çiplerin FT-IR karakterizasyonu sonucunda elde edilen spektrum incelendiğinde spektrumda görülen piklerin kaynağının çip yüzeyinde baskılı çipte SMX ve polimerlerin sahip olduğu kimyasal bileşenlerden kaynaklandığı görülmektedir. Bu baskılanmanın başarılı bir şekilde gerçekleştiğini ve polimer filmin çalışma kapsamındaki kimyasallardan kaynaklandığını ifade etmektedir.

Karakterizasyon çalışmaları bittikten sonra SPR sensör çipleri bir dizi adsorpsiyon çalışmasına tabi tutulmuştur. Bu çalışmalar sonucunda;

Adsorpsiyon çalışmalarına başlamadan önce ortamın pH'ı fonksiyonel monomer ve kalıp molekülü protonlaması ve deprotonlamasını adsorpsiyonu etkilediğinden ve bu durum araştırılmış ve adsorpsiyonu etkilediğinden bu etki incelenmiş ve en yüksek adsorpsiyon 7.4'te bulunmuştur

Moleküler baskılamanın polimer filmin adsorpsiyona olan etkisini ise baskılama faktörü hesaplandığında görmekteyiz. Baskılama faktörü 3,4 olarak hesaplanmıştır bu bize SMX baskılamanın başarılı bir şekilde yapıldığı ve baskılamanın adsorpsiyon üzerindeki etkisini göstermektedir.

Sülfametoksazolün gerçek zamanlı ölçümü sülfametoksazol baskılı SPR nanosensörü tarafından yapılmıştır. SPR sinyali ile sülfametoksazol derişimi arasındaki oranı değerlendirmek için farklı derişimde sulfamethoksazol çözeltileri (0.025-253.2 µg/L) hazırlanmış ve sisteme verilmiştir. Yapılan bu işlemin sonuçlarına bakılarak LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.0011 µg/L ve 0.0034 µg/L olarak bulunmuştur. 0.025-253.2 µg/L arasında yapılan çalışmalar sonucu çizilen kalibrasyon eğrileri sonuçlarından R² değerini ise 0,74 ve 0,97 olarak hesaplandı. Bu sülfametoksazol baskılı SPR biyosensörün sülfametoksazolü 0.025-2.5 µg/L ve 12.6 253.2 µg/L derişim aralığında sırası ile %74 ve %97 kesinlikle ölçebileceğini göstermiştir.

Üç farklı izoterm modeli, Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich, adsorpsiyon davranışını ve nanofilm ile sülfametoksazol arasındaki etkileşimi ifade etmek için uygulanmıştır. Sonuçlar bize adsorpsiyon davranışımızın Freundlich izotermine daha uygun olduğunu göstermektedir. Bu bize çip yüzeyindeki adsorpsiyonun heterojen karakterde olduğunu göstermektedir.

Sülfametoksazol baskılı nanofilm kaplı sensör çipi ile sülfametoksazol baskısı içermeyen çipin seçiciliği amoksisilin, sefaleksil ve sülfametoksazol için incelenmiş ve sonuçlar baskılı çipin gerçekten baskısız çipe kıyasla sülfametoksazole karşı daha yüksek seçiciliğe sahip olduğunu göstermektedir.

Sülfametoksazol baskılı nanofilm kaplı sensörün tekrar kullanılabilirliği 25.3 µg/ L sülfametoksazol çözeltisi ile yapılan art arda beş denge-adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü ile incelenmiştir. Bu çalışmalar sonucu elde edilen sensogram bize çipin tekrar kullanımını sonucu tayin yetisini koruduğunu ifade etmektedir. Ayrıca sensör çipinin tayin yetisi üretiminden sonraki 1. aya kadar farklı zamanlarda 25.3 µg/ L sülfametoksazol çözeltisi ile incelenmiştir. Bu çalışma sonucu çipin tayin yetisini 1. aya kadar koruduğu bulunmuştur.

SMX için 2.5-253.2 µg/ L derişim aralığında iki farklı ticari sütte hazırlanmış spike'lı süt örnekleri geliştirdiğimiz sensör çipi ve SMX tayini için standart kabul edilen UV-VIS spektrofotometresi (254 nm'de) ile tayin edilmiş ve sonuçları kıyaslanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda geliştirdiğimiz çipin bu derişim aralığında daha yüksek geri kazanıma sahip olduğu ve örnek hazırlama kısmının UV-VIS yöntemine kıyasla daha kolay olduğu gözlemlenmiştir.

Sonuç itibari ile tez çalışmasında başarılı bir şekilde sülfametoksazole karşı seçici, çok düşük miktardaki analiti görebilen, tekrar kullanılabilen kolay kullanıma sahip, zorlu ön işlemler gerektirmeyen SPR sensör çipi geliştirilmiştir.

6. KAYNAKLAR

- [1] Sophia Rehm, Katharina M. Rentsch, LC-MS/MS method for nine different antibiotics, *Clinica Chimica Acta*, Volume 511, 2020, Pages 360-367,
- [2] Albert Serra-Compte, Mariël G. Pikkemaat, Alexander Elferink, David Almeida, Jorge Diogène, Juan Antonio Campillo, Marta Llorca, Diana Álvarez-Muñoz, Damià Barceló, Sara Rodríguez-Mozaz, *Environmental Pollution*, Volume 271, 2021, 116313,
- [3] Xin Wang, Jiahao Li, Dan Jian, Yue Zhang, Yanke Shan, Shouyu Wang, Fei Liu, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 329, 2021, 129173,
- [4] Yonghang Yang, Guojian Ren, Weikang Yang, Xudong Qin, Dongxu Gu, Zhiqiang Liang, Dong-Yu Guo, Pan Qinhe, *Polyhedron*, Volume 194, 2021, 114923,
- [5] Qiaohui Luo, Neng Yu, Chunfei Shi, Xiaoping Wang, Jianmin Wu, *Talanta*, Volume 161, 2016, Pages 797-803,
- [6] Almuqrin AH, Al-Otaibi JS, Mary YS, Mary YS. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2021 Feb 5
- [7] Xie L, Xiao N, Li L, Xie X, Li Y. *Int J Mol Sci.* 2020 Jun 10;21(11):4139.
- [8] Ruchi Srivastava, Fatmah A.M. Al-Omary, Ali A. El-Emam, Shilendra K. Pathak, M. Karabacak, Vijay Narayan, Satish Chand, Onkar Prasad, Leena Sinha, *NJournal of Molecular Structure*, Volume 1137, 2017, Pages 725-741,
- [9] Hai-bin Wang, Wen-jing Shi, Fu-de Ren, Lei Yang, Jian-long Wang, *Computational and Theoretical Chemistry*, Volume 994, 2012, Pages 73-80,
- [10] WHO Global Tuberculosis Report 2019 ISBN: 978-92-4-156571-4
- [11] Landecker, H. *Palgrave Commun* 5, 45 (2019)
- [12] Selman A. Waksman, *The American Journal of Medicine*, Volume 7, Issue 1
- [13] Classics in infectious diseases: on the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae* by Alexander Fleming, Reprinted from the *British Journal of Experimental Pathology* 10:226-236, 1929
- [14] C.B. Thorne, W.H. Peterson, *Journal of Biological Chemistry*, Volume 176, Issue 1, 1948, Pages 413-428

- [15] Renate Junowicz-Kocholaty, Walter Kocholaty, Albert Kelner, *Journal of Biological Chemistry*, Volume 168, Issue 2, 1947, Pages 765-769
- [16] Aureomycin ...a new antibiotic for the treatment of bacterial, viral, and rickettsial diseases..., *Journal of the American Pharmaceutical Association (Practical Pharmacy ed.)*, Volume 10, Issue 3, 1949, Pages 168-181
- [17] Matthew I Hutchings, Andrew W Truman, Barrie Wilkinson, Volume 51, 2019, Pages 72-80,
- [18] Merve Bacanlı, Nurşen Başaran, *Food and Chemical Toxicology*, Volume 125, 2019, Pages 462-466,
- [19] Daiane Cristina Rocha, Camila da Silva Rocha, Davi Santos Tavares, Sabrina Loise de Morais Calado, Marcelo Pedrosa Gomes, *Science of The Total Environment*, Volume 767, 2021, 144902,
- [20] M. Eugenia Valdés, Lúcia H.M.L.M. Santos, M. Carolina Rodríguez Castro, Adonis Giorgi, Damià Barceló, Sara Rodríguez-Mozaz, M. Valeria Amé, *Environmental Pollution*, Volume 269, 2021, 116133,
- [21] Katrina Marie Sta Ana, Jonalyn Madriaga, Maria Pythias Espino, *Environmental Pollution*, Volume 275, 2021, 116624,
- [22] Ke Liu, Daolai Zhang, Xiaotong Xiao, Lijuan Cui, Hailong Zhang, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Volume 190, 2020, 109993,
- [23] Beatriz Böger, Monica Surek, Raquel de O Vilhena, Mariana M Fachi, Allan M Junkert, Josiane MMF Santos, Eric L Domingos, Alexandre de F Cobre, Danilo R Momade, Roberto Pontarolo, *Journal of Hazardous Materials*, Volume 402, 2021, 123448,
- [24] Han Xu, Zeyou Chen, Xinyan Wu, Lin Zhao, Nan Wang, Daqing Mao, Hongqiang Ren, Yi Luo, *Science of The Total Environment*, Volume 758, 2021, 143693,
- [25] Zheng Pan, Side Yang, Lixia Zhao, Xiaojing Li, Liping Weng, Yang Sun, Yongtao Li, *Chemosphere*, Volume 272, 2021, 129803,
- [26] Chaoqi Chen, Christine A. Pankow, Min Oh, Lenwood S. Heath, Liqing Zhang, Pang Du, Kang Xia, Amy Pruden, *Environment International*, Volume 128, 2019, Pages 233-243,

- [27] Luca Maria Chiesa, Lucia DeCastelli, Maria Nobile, Francesca Martucci, Giacomo Mosconi, Mauro Fontana, Marta Castrica, Francesco Arioli, Sara Panseri, *LWT*, Volume 131, 2020, 109783,
- [28] Jing Ha, Ge Song, Lian-feng Ai, Jian-chen Li, *Journal of Chromatography B*, Volumes 1017–1018, 2016, Pages 187-194,
- [29] Olumayowa Joshua Onipede, Bobmanuel Nwankwo, Gregory Olufemi Adewuyi, Charles Uchenna Nwachukwu, *Scientific African*, 2021, e00768,
- [30] Abdulrasaq O. Oyedeji, Titus A.M. Msagati, Akan B. Williams, Nsikak U. Benson, *Chemical Data Collections*, Volume 25, 2020, 100312,
- [31] Julieta Griboff, Juan Cruz Carrizo, Rocío Inés Bonansea, María Eugenia Valdés, Daniel Alberto Wunderlin, María Valeria Amé, *Food Chemistry*, Volume 332, 2020, 127380
- [32] Fen Xu, Yanli Liu, Wenchao Du, Chengliang Li, Meiling Xu, Tanchun Xie, Ying Yin, Hongyan Guo, *Science of The Total Environment*, Volume 785, 2021, 147248,
- [33] Sarah Shawver, Carl Wepking, Satoshi Ishii, Michael S. Strickland, Brian D. Badgley, *Soil Biology and Biochemistry*, Volume 157, 2021, 108252,
- [34] Cheng Li, Yang Li, Xinyu Li, Xupu Ma, Shuhua Ru, Tianlei Qiu, Anxiang Lu, *Environmental Research*, Volume 198, 2021, 110463,
- [35] Lingtong Li, Jiayi He, Zhiwei Gan, Ping Yang, *Chemosphere*, Volume 272, 2021, 129730,
- [36] Kun Wang, Tao Zhuang, Zhaoxin Su, Menghao Chi, Haichao Wang, *Science of The Total Environment*, Volume 788, 2021, 147811,
- [37] Maximum Residue Limits (MRLs) and Risk Management Recommendations (RMRs) For Residues Of Veterinary Drugs In FOODSCX/MRL2-2018 <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/maximum-residue-limits/en/> Erişim Tarihi 20.05.2021
- [38] Abraham, E., Chain, E. *Nature* 146, 837 (1940).
- [39] Van Hoek, A. H., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A. P., & Aarts, H. *J. Frontiers in microbiology*, 2, 203. (2011)

- [40] R.M. Griffin, *Journal of Comparative Pathology*, Volume 79, Issue 1, 1969, Pages 33-39,
- [41] Niharika Koch, Nazim F. Islam, Songita Sonowal, Ram Prasad, Hemen Sarma, *Current Research in Microbial Sciences*, Volume 2, 2021, 100027,
- [42] Hyejun Jo, Shahbaz Raza, Adeel Farooq, Jungman Kim, Tatsuya Unno, South Korea, *Environmental Pollution*, Volume 276, 2021, 116764,
- [42] Mei Zhuang, Yigal Achmon, Yuping Cao, Xiaomin Liang, Liang Chen, Hui Wang, Bupe A. Siame, Ka Yin Leung, *Environmental Pollution*, Volume 285, 2021, 117402,
- [43] L. Papst, B. Beović, C. Pulcini, E. Durante-Mangoni, *Clinical Microbiology and Infection*, Volume 24, Issue 10, 2018, Pages 1070-1076,
- [44] Y. Ishii, *International Journal of Infectious Diseases*, Volume 21, Supplement 1, 2014, Page 63,
- [45] Russell W. Steele, Rajasekharan Warriar, Patrick J. Unkel, Bertrand J. Foch, Richard F. Howes, Sanjay Shah, Karen Williams, Sheila Moore, Sue J. Jue, *The Journal of Pediatrics*, Volume 128, Issue 4, 1996, Pages 531-535,
- [46] Dheeraj Goyal, Louise K. Francois Watkins, Martha P. Montgomery, Sonya M. Bodeis Jones, Hayat Caidi, Cindy R. Friedman, *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2021,
- [47] Klein, Eili & Boeckel, Thomas & Martinez, Elena & Pant, Suraj & Gandra, Sumanth & Levin, Simon & Goossens, Herman & Laxminarayan, Ramanan. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 115 (2018).
- [48] D. Archundia, C. Duwig, L. Spadini, M.C. Morel, B. Prado, M.P. Perez, V. Orsag, J.M.F. Martins, *Environment International*, Volume 130, 2019, 104905,
- [49] Dirany A, Efremova Aaron S, Oturan N, Sirés I, Oturan MA, Aaron JJ. *Anal Bioanal Chem*. 2011 Apr;400(2):353-60
- [50] Khalil I, Rønn AM, Alifrangis M, Gabar HA, Satti GM, Bygbjerg IC. *Am J Trop Med Hyg*. 2003 May;68(5):586-9
- [51] Avogadro: an open-source molecular builder and visualization tool. Version 1.2.0 <http://avogadro.cc/>

- [52] Wishart DS, Feunang YD, Guo AC, Lo EJ, Marcu A, Grant JR, Sajed T, Johnson D, Li C, Sayeeda Z, Assempour N, Iynkkaran I, Liu Y, Maciejewski A, Gale N, Wilson A, Chin L, Cummings R, Le D, Pon A, Knox C, Wilson M. *Nucleic Acids Res.* 2017 Nov 8. <https://go.drugbank.com/drugs/DB01015> Erişim Tarihi: 02.06.2021
- [53] Xiaobing Jiang, Lei Shi, *Food Control*, Volume 30, Issue 1, 2013, Pages 30-34,
- [54] Tipu, Yasin & Khushi, Muhammad & Abbas, Mateen & muqet khan, Abdul & Ali, S. Pakistan. *Asian Journal of Chemistry.* 24. 471-472 (2012)
- [55] Dünya Sağlık Örgütü <https://list.essentialmeds.org/medicines/334> Erişim Tarihi 02.06.2021
- [56] https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/077612s0051bl.pdf Erişim Tarihi 02.06.2021
- [57] <https://list.essentialmeds.org/medicines/286> Erişim Tarihi 02.06.2021
- [58] Zhou SF, Zhou ZW, Yang LP, Cai JP *Curr Med Chem.* 2009;16(27):3480-675. Epub 2009 Sep 1.
- [59] Goodarzi, Mohammad & Shahbazikhah, Parviz & Sohrabi, Mahmoud & Fathabadı, Mozghan & Nouri, Sarezo. (2009) *Journal Of The Chilean Chemical Society - J Chil Chem Soc.* 54
- [60] John Wiley & Sons, Inc. SpectraBase; SpectraBase Compound ID=DNH2K2EzynH SpectraBase Spectrum ID=IMvKxQIF1a1
<https://spectrabase.com/spectrum/IMvKxQIF1a1> (Erişim Tarihi 09.06.2021.).
- [61] Cemal Akay, Sibel A Özkan, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volume 30, Issue 4, 2002, Pages 1207-1213
- [62] Faten A. Nour El-Dien, Gehad G. Mohamed, Elmorsy Khaled, Eman Y.Z. Frag, *Journal of Advanced Research*, Volume 1, Issue 3, 2010, Pages 215-220,
- [63] Mónica Cecilia Vargas Mamani, Felix Guillermo Reyes, Susanne Rath, *Food Chemistry*, Volume 117, Issue 3, 2009, Pages 545-552,
- [64] Olajire A. Adegoke, Chinedum P. Babalola, Olayinka A. Kotila, Oyakhire Obuebhor, *Arabian Journal of Chemistry*, Volume 10, Supplement 2, 2017, Pages S3848-S3860,

- [65] Riad SM, Salem H, Elbalkiny HT, Khattab FI, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2015 Apr 5;140:451-61.
- [66] C. Hartig, T. Storm, M. Jekel, *Journal of Chromatography A*, Volume 854, Issues 1–2, 1999, Pages 163-173,
- [67] Sweta Naik, Satya Eswari Jujjavarapu, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, Volume 9, Issue 4, 2021, 105318,
- [68] Yafei Chen, Yajie Yang, Yu Wang, Ye Peng, Jinmei Nie, Guanyue Gao, Jinfang Zhi, *Bioelectrochemistry*, Volume 133, 2020, 107453,
- [69] Bangyan Liu, Yue Tang, Yuxia Yang, Yuangen Wu, *Food Control*, Volume 129, 2021, 108208,
- [70] Xiaoyan Zhang, Tingting Wu, Yuemeng Yang, Yongqiang Wen, Shutao Wang, Li-Ping Xu, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 321, 2020, 128472,
- [71] Li Xue, Ruya Guo, Fengchun Huang, Wuzhen Qi, Yuanjie Liu, Gaozhe Cai, Jianhan Lin, *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 173, 2021, 112800
- [72] Yanger Liu, Mingzhang Guo, Ruoxi Du, Jiani Chi, Xiaoyun He, Zixin Xie, Kunlun Huang, Yunbo Luo, Wentao Xu, *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 170, 2020, 112660
- [73] Pulin Liu, Qiaoyun Huang, Wenli Chen, *Environmental Pollution*, Volume 164, 2012, Pages 66-72,
- [74] Harshala J. Parab, Cheulhee Jung, Joo-Hyung Lee, Hyun Gyu Park, *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 26, Issue 2, 2010, Pages 667-673,
- [75] Seung-Gyun Woo, Sung-Je Moon, Seong Keun Kim, Tae Hyun Kim, Hyun Seung Lim, Gun-Hwi Yeon, Bong Hyun Sung, Chul-Ho Lee, Seung-Goo Lee, Jung Hwan Hwang, Dae-Hee Lee, *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 168, 2020, 112523,
- [76] Raja Chinnappan, Anas Abdel Rahamn, Razan AlZabn, Sandip Kamath, Andreas L. Lopata, Khalid M. Abu-Salah, Mohammed Zourob, *Food Chemistry*, Volume 314, 2020, 126133
- [77] Xuan Weng, Suresh Neethirajan, *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 85, 2016, Pages 649-656

- [78] Yanbo Wang, Zhiheng Rao, Jinru Zhou, Lei Zheng, Linglin Fu, *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 132, 2019, Pages 84-89
- [79] Salvador Mas, Ahmed A. Badran, María-José Juárez, Dolores Hernández Fernández de Rojas, Sergi Morais, Ángel Maquieira, *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 166, 2020, 112438
- [80] Shuai Zhang, Feilong Rong, Chuanpan Guo, Fenghe Duan, Linghao He, Minghua Wang, Zhihong Zhang, Mengmeng Kang, Miao Du, *Coordination Chemistry Reviews*, Volume 439, 2021, 213948
- [81] Kenneth A. Giuliano, D. Lansing Taylor, *Trends in Biotechnology*, Volume 16, Issue 3, 1998, Pages 135-140
- [82] Keusgen, M. *Naturwissenschaften* 89, 433–444 (2002).
- [83] Paul P Dillon, Bernadette M Manning, Stephen J Daly, Anthony J Killard, Richard O'Kennedy, *Journal of Immunological Methods*, Volume 276, Issues 1–2, 2003, Pages 151-161
- [84] Rasoul Pourtaghavi Talemi, Mohammad Hossein Mashhadizadeh, *Talanta*, Volume 131, 2015, Pages 460-466
- [85] Clark LC Jr, Wolf R, Granger D, Taylor Z. *J Appl Physiol*. 1953 Sep;6(3):189-93
- [86] Bhalla N, Jolly P, Formisano N, Estrela P. *Essays Biochem*. 2016 Jun 30;60(1):1-8
- [87] Suzuki S, Takahashi F, Satoh I, Sonobe N. *Bull. Chem. Soc. Jpn*. 1975;48
- [88] Baha Öndeş, Fatma Akpınar, Murat Uygun, Mihrican Muti, Deniz Aktaş Uygun, *Microchemical Journal*, Volume 160, Part B 2021, 105667
- [89] Nurlely, Musa Ahmad, Lee Yook Heng, Ling Tan, *Measurement*, Volume 175, 2021, 109112
- [90] Zixin Zhang, Osamu Niwa, Shunsuke Shiba, Shizuo Tokito, Kuniaki Nagamine, Shigeo Ishikawa, Masahiro Sugimoto, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 321, 2020, 128473
- [91] Adaris M. López Marzo, Carmen C. Mayorga-Martinez, Martin Pumera, *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 151, 2020, 111980,

- [92] Jun-Hee Park, Ji-Hong Bong, Jaeyong Jung, Jeong Soo Sung, Ga-Yeon Lee, Min-Jung Kang, Jae-Chul Pyun, *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 144, 2021, 109721,
- [93] Cancan Wang, Dan Jin, Yi Yu, Lina Tang, Yujie Sun, Zhongyue Sun, Guo-Jun Zhang, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 314, 2020, 128056,
- [94] Duygu Çimen, Nilay Bereli, Serdar Günaydın, Adil Denizli, *Talanta*, Volume 219, 2020, 121259,
- [95] Yuspian Nur, Shabarni Gaffar, Yeni Wahyuni Hartati, Toto Subroto, *Sensing and Bio-Sensing Research*, Volume 32, 2021, 100416,
- [96] M.R. Ali, M.S. Bacchu, M.A.A. Setu, S. Akter, M.N. Hasan, F.T. Chowdhury, M.M. Rahman, M.S. Ahommed, M.Z.H. Khan, *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 188, 2021, 113338
- [97] R. Rizzuto, P. Pinton, M. Brini, A. Chiesa, L. Filippin, T. Pozzan, *Cell Calcium*, Volume 26, Issue 5, 1999, Pages 193-200,
- [98] Marcantonio Bragadin, Sabrina Manente, Rossano Piazza, Guido Scutari, *Analytical Biochemistry*, Volume 292, Issue 2, 2001, Pages 305-307,
- [99] Magdalena Stobiecka, Slawomir Jakiela, Agata Chalupa, Piotr Bednarczyk, Beata Dworakowska, *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 88, 2017, Pages 114-121,
- [100] Fei Guo, Hong Liu, *Chemical Engineering Journal*, Volume 394, 2020, 125042,
- [101] Hui Jia, Guang Yang, Hui-Hao Ngo, Wenshan Guo, Hongwei Zhang, Fei Gao, Jie Wang, *Chemical Engineering Journal*, Volume 327, 2017, Pages 1117-1127
- [102] Sriram Thoppe Rajendran, Kinga Huszno, Grzegorz Dębowski, Javier Sotres, Tautgirdas Ruzgas, Anja Boisen, Kinga Zór, *Bioelectrochemistry*, Volume 138, 2021, 107720,
- [103] Sa Xiao, Yanqing Zhang, Panpan Song, Junbo Xie, Guangchang Pang, *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 126, 2019, Pages 815-823,
- [104] Mohadeseh Rahimi-Mohseni, Jahan Bakhsh Raoof, Reza Ojani, Tahereh A. Aghajanzadeh, Ayemeh Bagheri Hashkavayi, *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 113, 2018, Pages 648-654,

- [105] F. Battaglia, V. Baldoneschi, V. Meucci, L. Intorre, M. Minunni, S. Scarano, *Talanta*, Volume 230, 2021, 122347,
- [106] Jun-feng Qi, Duo Tan, Xue-juan Wang, Hui-ting Ma, Ying-chun Wan, Ao Hu, Lin-hai Li, Bin Xiao, Bin Lu, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 337, 2021, 129760,
- [107] K. Prabakaran, P.J. Jandas, Jingting Luo, Chen Fu, Qiuping Wei, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Volume 611, 2021, 125859,
- [108] Min You, Shuai Yang, Yu An, Fan Zhang, Pingang He, A novel electrochemical biosensor with molecularly imprinted polymers and aptamer-based sandwich assay for determining amyloid- β oligomer, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, Volume 862, 2020, 114017,
- [109] Guihua Zhang, Ying Yu, Manli Guo, Bixia Lin, Li Zhang, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 288, 2019, Pages 564-570,
- [110] Sa Xiao, Panpan Song, Fanjie Bu, Guangchang Pang, Aimin Zhou, Yanqing Zhang, Junbo Xie, *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 172, 2021, 112779,
- [111] Yuxing Wang, Irfani R. Ausri, Zimeng Wang, Cam Derry, Xiaowu Shirley Tang, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 308, 2020, 127645,
- [112] Erdoğan Özgür, Aykut Arif Topçu, Erkut Yılmaz, Adil Denizli, *Talanta*, Volume 212, 2020, 120778,
- [113] Na An, Kai Li, Yukun Zhang, Tingting Wen, Weixiao Liu, Gang Liu, Liang Li, Wujun Jin, *Talanta*, Volume 231, 2021, 122361,
- [114] Dongping Wang, Jacky Fong Chuen Loo, Wei Lin, Qiang Geng, Erika Kit Shan Ngan, Siu Kai Kong, Yeung Yam, Shih-Chi Chen, Ho Pui Ho, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 305, 2020, 127240,
- [115] Helmerhorst E, Chandler DJ, Nussio M, Mamotte CD . *Clin Biochem Rev.* 2012;33(4):161-173.
- [116] Schuck P, Zhao H. *Methods Mol Biol.* 2010;627:15-54
117. Pachauri V, Ingebrandt S. *Essays Biochem.* 2016;60(1):81-90
- [118] Villena Gonzales, Wilbert & Mobashsher, Ahmed & Abbosh, Amin. (2019), *Devices and Sensors. Sensors.* 19. 800. 10.3390/s19040800.

- [119] Farid E. Ahmed, John E. Wiley, Douglas A. Weidner, Chris Bonnerup, *Helvetico Mota Cancer Genomics & Proteomics* Nov 2010, 7 (6) 303-309
- [120] Deniz Sadighbayan, Mohammad Hasanzadeh, Ebrahim Ghafar-Zadeh, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Volume 133, 2020,24,116067,
- [121] Je Mei Bhattacharyya, Shira Cohen, Awad Shalabny, Muhammad Bashouti, Barak Akabayov, Gil Shalev, *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 132, 2019,
- [122] Yi Zhang, Dezhi Feng, Yi Xu, Ziwei Yin, Wei Dou, UM E Habiba, Changyi Pan, Zongkun Zhang, Hao Mou, Huiyong Deng, Xianqiang Mi, Ning Dai, *Applied Surface Science*, Volume 548, 2021, 149169,
- [123] Stern, Eric & Wagner, Robin & Sigworth, Fred & Breaker, Ronald & Fahmy, Tarek & Reed, Mark. (2007). *Nano letters*. 7. 3405-9. 10.1021/nl071792z.
- [124] Hitoshi Tomonaga, Yuichi Tanigaki, Kodai Hayashi, Tatsushi Matsuyama, Junichi Ida, *Chemical Engineering Research and Design*, Volume 171, 2021, Pages 213-224,
- [125] Anu Bharti, Sakshi Mittal, Shilpa Rana, Divya Dahiya, Navneet Agnihotri, Nirmal Prabhakar, *Analytical Biochemistry*, Volume 609, 2020, 113908,
- [126] Rua J. Kadhim, Esraa H. Karsh, Zainab J. Taqi, Majid S. Jabir, *Materials Today: Proceedings*, Volume 42, Part 5, 2021, Pages 3041-3045,
- [127] Manal Ahmed Awad, Ebtessam Mohammed Al Olayan, Muzzammil Iqbal Siddiqui, Nada Mahmmed Merghani, Sarah Saleh Abdu-llah Alsaif, Abeer S. Aloufi, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Volume 137, 2021, 111294,
- [128] Antuña-Jiménez, D.; González-García, M.B.; Hernández-Santos, D.; Fanjul-Bolado, P. *Biosensors* 2020
- [129] Salama, F.M.; Attia, K.A.; Said, R.A.; El-Olemy, A.; Abdel-Raouf, A.M. *RSC Adv.* 2018, 8, 11517–11527
- [130] Pereira Silva Neves, M.M.; González-García, M.B.; Bobes-Limenes, P.; Pérez-Junquera, A.; Hernández-Santos, D.; Vidal-Iglesias, F.J.; Solla-Gullón, J.; Fanjul-Bolado, P. *Anal. Methods* 2017, 9, 5108–5114
- [131] Britannica, The Editors of Encyclopaedia. "Polymer". *Encyclopedia Britannica*, 22 May. 2020, <https://www.britannica.com/science/polymer>. Erişim Tarihi: 7 Haziran 2021.

- [132] Songjun Li, Maiyong Zhu, Michael J. Whitcombe, Sergey A. Piletsky, Anthony P.F. Turner, Editor(s): Songjun Li, Shunsheng Cao, Sergey A. Piletsky, Anthony P.F. Turner, *Molecularly Imprinted Catalysts*, Elsevier, 2016, Pages 1-17,
- [133] Yuhua Liu, Ziru Lian, Fangfang Li, Abdul Majid, Jiangtao Wang, *Marine Pollution Bulletin*, Volume 169, 2021, 112541,
- [134] Lulu Wang, Ya Ma, Lishi Wang, *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 178, 2021, 113056,
- [135] Rahil Jalilian, Elham Ezzatzadeh, Alireza Taheri, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, Volume 9, Issue 4, 2021, 105513,
- [136] Polyakov MV. 1931. *Zhur. Fiz. Khim.* 2: 799–805
- [137] Dickey, Frank (1955). *The Journal of Physical Chemistry.* 59 (8): 695–707
- [138] G. Wulff, A. Sarhan, K. Zabrocki, *Tetrahedron Letters*, Volume 14, Issue 44, 1973, Pages 4329-4332,
- [139] I. PERÇİN DEMİRÇELİK. *Process Biochemistry* , vol.80, pp.181-189, 2019
- [140] Mehran Javanbakht, Khatereh Ali Pishro, Amir Heidari Nasab, Behrouz Akbari-adergani, *Materials Science and Engineering: C*, Volume 32, Issue 8, 2012, Pages 2367-2373,
- [141] Youhong Zhang, Yinpei Zhu, Leslie S. Loo, Jianguo Yin, Kean Wang, *Particuology*, Volume 57, 2021, Pages 10-18,
- [142] M.N. Mohamad Ibrahim, C.S. Sipaut, N.N. Mohamad Yusof, *Separation and Purification Technology*, Volume 66, Issue 3, 2009, Pages 450-456,
- [143] Muqsit Pirzada, Ekin Sehit, Zeynep Altintas, *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 166, 2020, 112464
- [144] Ji Qi, Bowei Li, Na Zhou, Xiaoyan Wang, Dongmei Deng, Liqiang Luo, Lingxin Chen, *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 142, 2019, 111533,
- [145] F. Battaglia, V. Baldoneschi, V. Meucci, L. Intorre, M. Minunni, S. Scarano, *Talanta*, Volume 230, 2021, 122347,
- [146] M. Pesavento, D. Merli, R. Biesuz, G. Alberti, S. Marchetti, C. Milanese, *Analytica Chimica Acta*, Volume 1142, 2021, Pages 201-210,

- [147] Jie Liu, Yuli Wang, Xiaoxue Liu, Qunhui Yuan, Yang Zhang, Yingchun Li, *Talanta*, Volume 199, 2019, Pages 573-580,
- [148] Erkut Yılmaz, Erdoğan Özgür, Nilay Bereli, Deniz Türkmen, Adil Denizli, *Materials Science and Engineering: C*, Volume 73, 2017, Pages 603-610
- [149] Andreas Leonhardt, Klaus Mosbach, *Reactive Polymers, Ion Exchangers, Sorbents*, Volume 6, Issues 2–3, 1987, Pages 285-290,
- [150] Mirata F, Resmini M. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2015;150:107-29.
- [151] Lofgreen JE, Ozin GA. *Chem Soc Rev*. 2014 Feb 7;43(3):911-33.
- [152] Y. Hongyuan K. Row, *Characteristic and Synthetic Approach of Molecularly Imprinted Polymer*, *Int J Mol Science*, 7 (2006)
- [153] Hasim Munawar, Juili S. Mankar, Madhu D. Sharma, Alvaro Garcia-Cruz, Luis André L. Fernandes, Martin Peacock, Reddithota J. Krupadam, *Talanta*, Volume 219, 2020, 121273,
- [154] Christine Unger, Peter A. Lieberzeit, *Talanta*, Volume 161, 2021, 104855,
- [155] Saied Jafari, Mohammad Dehghani, Navid Nasirizadeh, Mostafa Azimzadeh, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, Volume 829, 2018,
- [156] Patricia Weber, Benjamin R. Riegger, Klaus Niedergall, Günter E.M. Tovar, Monika Bach, Günter Gauglitz, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 267, 2018, Pages 26-33,
- [157] A. Mirmohseni, M. Rastgouy-Houjaghan, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 188, 2013, Pages 31-37,
- [158] Roya Khosrokhavar, Ali Motaharian, Mohammad Reza Milani Hosseini, Saeedeh Mohammadsadegh, *Microchemical Journal*, Volume 159, 2020, 105348,
- [159] Rogers, Kara. “Scientific modelling” *Encyclopedia Britannica*, 21 Mayıs 2012, <https://www.britannica.com/science/scientific-modeling>. Erişim Tarihi 7 Haziran 2021
- [160] Dawid Jan Król, Artur Wymysłowski, Kamil Nouri Allaf, *Microelectronics Reliability*, Volume 55, Issue 5, 2015,

- [161] Zahra Heidari, Rasool Pelalak, Rahime Eshaghi Malekshah, Mahboubeh Pishnamazi, Azam Marjani, Shaheen M. Sarkar, Saeed Shirazian, *Journal of Molecular Liquids*, Volume 329, 2021, 115485,
- [162] Corneliu Cojocaru, Andra Cristina Humelnicu, Petronela Pascariu, Petrisor Samoila, *Journal of Molecular Liquids*, Volume 337, 2021, 116406,
- [163] Tamanna Anwar, Pawan Kumar, Asad U. Khan, Chapter 1 - Modern Tools and Techniques in Computer-Aided Drug Design, Editor(s): Mohane S. Coumar, *Molecular Docking for Computer-Aided Drug Design*, Academic Press, 2021,
- [164] Linna Fu, Guangbin Liu, Dongxin Zhao, Libo Yuan, Kui Lu, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, Volume 255, 2021, 119673,
- [165] Ahmad Irfan, Muhammad Imran, Muhammad Khalid, Muhammad Sami Ullah, Noreen Khalid, Mohammed A. Assiri, Renjith Thomas, S. Muthu, Muhammad Asim Raza Basra, Mohammed Hussein, Abdullah G. Al-Sehemi, Mohsin Shahzad, *Journal of Saudi Chemical Society*, Volume 25, Issue 8, 2021, 101277,
- [166] Murad Hajili, Nazila Pour Khalili, Rasoul Moradi, Yusif Abdullayev, *Materials Today: Proceedings*, Volume 42, Part 3, 2021,
- [167] Stephen Among James, Wai Keat Yam, *Computational Biology and Chemistry*, Volume 92, 2021, 107499,
- [168] Avogadro: an open-source molecular builder and visualization tool. Version 1.2.0 <http://avogadro.cc/>
- [169] Lehtola, S. A review on non-relativistic, fully numerical electronic structure calculations on atoms and diatomic molecules. *Int J Quantum Chem.* 2019
- [170] S. Kurth, M.A.L. Marques, E.K.U. Gross, *Density-Functional Theory*, Editor(s): Franco Bassani, Gerald L. Liedl, Peter Wyder, *Encyclopedia of Condensed Matter Physics*, Elsevier, 2005, Pages 395-402,
- [171] Thomas, L. (1927). *Mathematical Proceedings of the Cambridge Philosophical Society*, 23(5), 542-548.
- [172] Fermi, Enrico. *Zeitschrift für Physik* 48.1-2 (1928): 73-79.
- [173] P. Hohenberg and W. Kohn *Inhomogeneous Electron Gas Phys. Rev.* 136, B864 – Published 9 November 1964

- [174] Hartree, D. R. *Mathematical Proceedings of the Cambridge Philosophical Society*. Cambridge University Press (CUP). 24 (1): 89–110 1928
- [175] Slater, J. C. (1930). *Phys. Rev.* 35 (2): 210–211.
- [176] Slater, J. (1929). *Physical Review*. 34 (2): 1293–1322
- [177] Fock, V. A. (1930). "Näherungsmethode zur Lösung des quantenmechanischen Mehrkörperproblems". *Z. Phys.* (in German). 61 (1): 126
- [178] A. D. Becke (1993). "A new mixing of Hartree-Fock and local density-functional theories". *J. Chem. Phys.* 98 (2): 1372–1377.
- [179] Lee C, Yang W, Parr RG. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys Rev B Condens Matter*. 1988 Jan 15;37(2):785-789.
- [180] John P. Perdew, M. Ernzerhof, *The Journal of Chemical Physics*, Volume 105, Issue 22, December 8, 1996, pp.9982-9985
- [181] J. Heyd , G.E. Scuseria, *Journal of Chemical Physics*, Volume 118, Issue 18, pp. 8207-8215 (2003).
- [182] Zhao W, Liu J, Tang S, Jin R. *J Mol Model*. 2020 Mar 31;26(4):88.
- [183] [Jeffrey GA (1999). *J. Mol. Struct.* 485–486:293–298].
- [184] Sgobi L., Razzino C, Machado S. *Electrochimica Acta* (2016) 191 1010-1017
- [185] Leonardo S. Andrade, Romeu C. Rocha-Filho, Quezia B. Cass, Orlando Fatibello-Filho *Electroanalysis*(2019) Vol 21 1475-1480
- [186] Xi zhuang, Yue Zaiyu Li, Shuang Zhao *Microchemical Journal* 159(2020) 105440
- [187] Cesarino I. ,Cesarino V. , Marcos R.V. Lanz, *Sensors and Actuators B* 188 (2013) 1293– 1299
- [188] Yuan J., Yao S. *Talanta* 58 (2002) 641-648
- [189] Y. Zhao, F. Yuan, X. Quan, H. Yu, S. Chen, h. Zhao, Z. Liub, N. Hilal *Anal. Methods*, 2015, 7, 2693
- [190] del Torno-de Román L, Alonso-Lomillo M.A, Dominguez-Renedo O, Arcos-Martinez M.J. *Sensors and Actuators B* 227 (2016) 48–53
- [191] Balasubramanian P. Settu R. , Chen S.M. , Chen T.W. *Microchimica Acta* (2018) 185: 396

- [192] Chasta H, Goyal R.N. *Electroanalysis*(2015) 27: 1229–1237
- [193] Souza C.D., Braga O.C., Vieira I.C, Spinelli A *Sensors Actuators B Chem* (2008) 135:66–73
- [194] Ozkorucuklu,S.P.Sahin, Y.; Alsancak, G. *Sensors* 2008, 8, 8463-8478
- [195] Cao Y. ,Liu G. ,Zheng B.,Wang X. , Li H. ,Wang, G. , Zhao L. ve Wang Y. *Soft Matter* (2021)17, 4969
- [196] Tumini M.
, Orlando G.Nagel Rafael L. *Althaus Rev Argent Microbiol* 2019;51(4) 345-353
- [197] Le, T.H. Lee, H.J. Kim, J.H. Park,
S.J. Highly Selective Fluorescence Sensor Based on Graphene Quantum Dots for Sulfa
methoxazole Determination.*Materials* 2020, 13, 2521.