

**GIDA ÖRNEKLERİNDEKİ BENZİL PENİSİLİN HASSAS
TAYİNİNE YÖNELİK MOLEKÜLER BASKILANMIŞ POLİMER
TEMELLİ OPTİK SENSÖRLERİN GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT OF MOLECULARLY IMPRINTED POLYMER
BASED OPTICAL SENSORS FOR THE SENSITIVE
DETECTION OF BENZYL PENICILLIN IN FOOD SAMPLES**

Volkan SAFRAN

Prof. Dr. Adil DENİZLİ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2021

ÖZET

GIDA ÖRNEKLERİNDEKİ BENZİL PENİSİLİN HASSAS TAYİNİNE YÖNELİK MOLEKÜLER BASKILANMIŞ POLİMER TEMELLİ OPTİK SENSÖRLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Volkan SAFRAN

Doktora, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Adil Denizli

Aralık 2021, 79 sayfa

Penisilin en sık kullanılan beta antibiyotiklerden olup, insan, çiftlik hayvanları, kümes hayvanları ve su ürünleri yetiştiriciliğinde çeşitli bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde uzun süredir yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yüzden, gıda ve çevredeki bu antibiyotik kalıntılarının tespiti halk sağlığının korunması açısından hayati önem taşımaktadır. Bu çalışmada, yüzey plazmon rezonans sensör ile moleküler baskılama tekniği kullanılarak hem sulu çözelti hem de süt örneklerinden seçici ve hassas benzilpenisilin (PEN-G) antibiyotığının tayini gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, PEN-G baskılanmış, poli(2-Hidroksietil metakrilat- N-metakroil-(L)-sistein metil ester-altın nanopartiküller-N-metakroil-(L)-fenilalanin metil ester (MIP-AuNPs) nanosensör hazırlanmıştır. Yüzey plazmon rezonans sinyal yanıtını arttırmak amacıyla eklenen altın nanopartiküllerin (AuNPs) etkisini incelemek için eklenmeden hazırlanan nanosensör AuNPs (MIP) ile kontrol deneyleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, baskılama verimliliğini incelemek amacı ile, PEN-G baskılanmamış (NIP-AuNPs) nanosensör, PEN-G molekülünün eklenmesi dışında aynı polimerizasyon reçetesi kullanılarak hazırlanmıştır. MIP-AuNPs nanosensörü için baskılamanın verimliliği (I.F 7.83), NIP- AuNPs nanosensörü ile karşılaştırılarak tespit edilmiştir. MIP-AuNPs nanosensörün, hedef PEN-G molekülü için amoksisiline göre 9.87

kat ve ampisiline göre 16.78 kat daha seçici olduğu belirlenmiştir. MIP-AuNPs nanosensör, 0.01-5 ppb PEN-G konsantrasyon aralığı için, 0.9992 korrelasyon katsayısı ile doğrusal ilişki gösterdi. MIP-AuNPs nanosensörün tekrarlanabilirlik çalışmaları, 0.25 ppb PEN-G için istatistiksel olarak analiz edilmiş ve hesaplanan yüzde nispi standart sapma değeri (RSD%<1.7), aynı sensörün dört adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsünden sonra PEN- G algılama yeteneğinde kayda değer bir kayıp olmadığını göstermiştir. Ayrıca gerçek gıda numunesi olarak, sütün içine 5 ppb PEN-G eklenerek sütteki PEN-G miktarı tespit edilmiştir. Validasyon çalışmaları yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) çalışmaları ile gerçekleştirilmiştir.

Anahtar kavramlar: altın nanopartiküller, moleküler baskılanmış polimer, nanosensör, benzilpenisilin, yüzey plazmon rezonans.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF MOLECULARLY IMPRINTED POLYMER BASED OPTICAL SENSORS FOR THE SENSITIVE DETECTION OF BENZYL PENICILLIN IN FOOD SAMPLES

Volkan SAFRAN

Doctor of Philosophy, Division of Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Adil Denizli

December 2021, 79 pages

Penicillin is one of the most commonly used beta antibiotics and has long been widely used in the treatment of various bacterial infections in humans, livestock, poultry and aquaculture. Therefore, the detection of these antibiotic residues in food and the environment is vital for the protection of public health. In this study, selective and sensitive Penicillin G (PEN-G) antibiotic detection from both aqueous solution and milk samples using molecular imprinting technique was performed by surface plasmon resonance sensor. For this purpose, PEN-G imprinted poly(2-Hydroxyethyl methacrylate-N-methacroyl-(L)-cysteine methyl ester-gold nanoparticles-N- methacryloyl-L-phenylalanine methyl ester (MIP-AuNPs) nanosensor was prepared. Control experiments were carried out via the nanosensor without the addition of AuNPs (MIP) to examine the effect of gold nanoparticles (AuNPs) incorporated to increase the surface plasmon resonance signal response. Moreover, to evaluate the imprinting efficiency, non-imprinted (NIP-AuNPs) nanosensor was designed using the same polymerization recipe except the addition of the PEN-G molecule. Characterization studies of MIP-AuNPs, NIP-AuNPs and MIP nanosensors were performed with FTIR- ATR spectrophotometer. Also, MIP-AuNPs and NIP-AuNPs nanosensors were characterized by atomic force microscopy, ellipsometer

and contact angle measurements. Imprinting efficiency (I.F 7.83) for the MIP-AuNPs nanosensor was determined by comparing it with the NIP-AuNPs nanosensor. Characterization studies of MIP-AuNPs, NIP-AuNPs and MIP nanofilms were performed with FTIR-ATR spectrophotometer. Also, MIP-AuNPs and NIP-AuNPs nanosensors were characterized by atomic force microscopy, ellipsometer and contact angle measurements. Imprinting efficiency (I.F 7.83) for the MIP-AuNPs nanosensor was determined by comparing it with the NIP-AuNPs nanosensor. The MIP-AuNPs nanosensor was 9.87 times more selective for the target PEN-G molecule than amoxicillin, and 16.78-times than ampicillin. A good linear relationship was obtained for the 0.01-5 ppb concentrations range with the correlation coefficients of 0.9992 for the MIP-AuNPs nanosensor. Repeatability studies of the MIP-AuNPs nanosensor were statistically analyzed for the 0.25 ppb PEN-G, and the percent relative standard deviation of the intra-assays (RSD) of less than 1.7% indicated a negligible loss of PEN-G sensing capability after four adsorption-desorption cycles with the same sensor. In addition, the amount of PEN-G in milk selected as a real food sample was measured by spiking 5 ppb PEN-G into the milk. Validation studies were performed by high performance liquid chromatography (HPLC) studies.

Keywords: gold nanoparticles, molecularly imprinted polymer, nanosensor, benzylpenicillin, surface plasmon resonance.

TEŞEKKÜR

Doktora tezimin teşekkür satırlarına hocam ya da danışmanım konumlarının çok ötesinde yaşam sürecimin devamında ulaşacağım başarılarımın altında imzası olacak, yaşamımın tümünde ailem kavramının içerisinde yer alacak Prof. Dr. Adil Denizli'ye, Yüksek lisans sürecimden doktora sürecimin sonuna kadar, birikimlerini, emeklerini ihtiyacım olan her süreçte benimle paylaşarak literatürde bu tezin varlığında derin bir rolü olan Doç. Dr. Fatma Yılmaz'a,

Doktora çalışmalarımda bana çok destek veren Ilgım Göktürk ve Adil Hocamın laboratuvarında birlikte çalıştığım mesai arkadaşlarıma,

2214-A doktora sırası araştırma burs programı ile yurt dışında tez çalışmalarımın bir kısmını yürütmeme destek olan Tübitak'a,

Hem dostluğuyla hem donanımıyla beni hiç yalnız bırakmayan değerli dostum ve ortağım (Doktor) Berkin Dilsiz'e,

Doğumumdan bugüne olduğum kişiye evrilmemi sağlayan, bana her zaman çok destek olan sevgili aile bireylerime,

Sadece tez sürecinde değil yaşamımda her zaman yanımda olan, olacağına yürekten inandığım kalbimden gelerek bu satırlara bana yazdırana,

Çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. Giriş.....	1
2. Genel bilgiler	5
2.1. Antibiyotiklerin sınıflandırılması	5
2.2. Antibiyotiklerin tayin yöntemleri	7
2.3. Antibiyotiklerin biyosensörsör ile tayini	8
2.4. Moleküler baskılama yöntemi	9
2.5. Yüzey plazmon rezonans	11
3. Materyal ve metod	17
3.1. Kimyasal malzemeler.....	17
3.2. SPR nanosensörlerin hazırlanmasında kullanılan çip yüzeyine alil grubunun bağlanması.....	17

3.3.	Altın nanopartiküllerin (AuNPs) sentezi.....	18
3.4.	PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs, baskılanmamış NIP-AuNPs, AuNPs'i içermeyen MIP SPR nanosensörlerin hazırlanması	19
3.5.	PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs, baskılanmamış NIP-AuNPs ve AuNPs'i içermeyen MIP SPR nanosensörlerin karakterizasyonu.....	22
3.6.	Hazırlanan PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs ve baskılanmamış NIP-AuNPs SPR nanosensörlerin karakterizasyonu.....	23
3.6.1.	Atomik kuvvet mikroskobu analizi	23
3.6.2.	Elipsometre ölçümleri	24
3.6.3.	Temas açısı ölçümleri.....	25
3.7.	PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs ve baskılanmamış NIP-AuNPs nanosensörler ile kinetik analizler.....	26
3.7.1.	Yarışmalı kinetik analizler.....	28
3.8.	Baskılama etkinliğini belirleme çalışmaları.....	28
3.9.	Tekrar kullanılabilirlik çalışmaları ve istatistiksel analizleri.....	30
3.10.	Sinyal artırımına AuNPs' nin etkisi	30
3.11.	Süt örneklerindeki PEN-G nin için kinetik analizler	30
3.12.	PEN-G tayini için validasyon çalışmaları.....	31
4.	Deneysel bulgular ve tartışma	32

4.1.	Altın nanopartiküllerin (AuNPs) sentezi ve karakterizasyonu	32
4.2.	MAC-AuNPs ve MAPAPEN-G ön-komplekslerin karakterizasyonu.....	32
4.3.	MIP-AuNPs, MIP ve NIP-AuNPs SPR nanosensörlerin karakterizasyonu	36
4.4.	SPR biyosensörlerle kinetik analizler	40
4.4.1.	Denge analizi	47
4.4.2.	Bağlanma kinetik analizi	47
4.4.3.	Denge izoterm modelleri.....	49
4.5.	Seçicilik çalışmaları	51
4.6.	MIP-AuNPs SPR nanosensörün baskılama etkinliğinin belirlenmesi.....	53
4.7.	MIP-AuNPs SPR nanosensörünün tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi	55
4.8.	AuNPs'in SPR nanosensörünün hassasiyetini artırıcı etkisi	57
4.9.	Süt örneğinden Penisilin-G tayini	58
4.10.	PEN-G tayininin validasyon çalışmaları	63
5.	Sonuçlar ve tartışma.....	65
6.	Kaynaklar	71
EKLER.....		78
EK 1 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu		78
ÖZGEÇMİŞ		79

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Biyosensörlerin temel bileşenleri ve çalışma prensibi.....	8
Şekil 2.2. Beş ana moleküler baskılama yöntemi (i) kovalent olmayan, (ii) elektrostatik/iyonik, (iii) kovalent, (iv) yarı kovalent ve (v) metal şelat koordinasyonu.....	11
Şekil 2.3. Dielektrik sınırlarda gerçekleşen toplam iç kırınım.....	13
Şekil 2.4. Tipik bir SPR sensörü ile elde edilen sensorgramının şematik gösterimi	14
Şekil 2.5. a) Plazmonik sensörlerin çalışma prensibinin şematik gösterimi b) yakalanan analit tarafından indüklenen sensör yüzeyindeki RI artışına bağlı olarak spektrumdaki değişiklik....	15
Şekil 2.6. PEN-G baskılanmış SPR sensörün şematik gösterimi	16
Şekil 3.1. Nanopartiküllerin boyut analizinin yapılması için kullanılan Zeta-sizer analizör programı.....	19
Şekil 3.2. SPR Nanosensör yüzeyinde film oluşturulmasının şematize edilmesi	21
Şekil 3.3. MIP-AuNPs, NIP-AuNPs ve MIP SPR nanosensörlerin hazırlanmasında kullanılan sistem a) spin kaplayıcı b) UV lamba	21
Şekil 3.4. AuNPs'lerin boyut analizinin yapılması amacıyla kullanılan zeta boyut analizör cihazı cihazı.....	22
Şekil 3.5. PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs ve baskılanmamış NIP-AuNPs SPR nanosensörlerin yüzey karakterizasyonu için kullanılan Atomik Kuvvet Mikroskobu cihazının görüntüsü.....	24
Şekil 3.6. PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs ve baskılanmamış NIP-AuNPs SPR nanosensörlerin yüzeyinde bulunan nanofilmlerin kalınlığını ölçmede kullanılan Elipsometre cihazının görüntüsü.....	25
Şekil 3.7. PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs ve baskılanmamış NIP-AuNPs SPR nanosensörlerin yüzeyinde bulunan nanofilmlerin temas açısı ölçümlerinin gerçekleştirildiği cihaz.....	26
Şekil 3.8. PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs, baskılanmamış NIP-AuNPs ve AuNPs'ler eklenmeden	

hazırlanan SPR nanosensörlerin kinetik analizlerinin yapıldığı SPR ölçüm cihazının görüntüsü..28	
Şekil 4.1..a. MAC-AuNPs ön-kompleksinin moleküler formülü. b. MAPAPEN-G ön- kompleksinin moleküler formülü.....33	33
Şekil 4.2. AuNPs'in zeta boyut analizörü ile boyut ölçümü34	34
Şekil 4.3. A) AuNPs'in ve MAC-AuNPs ön-kompleksinin spektrofotometrik ölçümü B) MAPA monomerinin ve MAPAPEN-G ön-kompleksinin spektrofotometrik ölçümü 34	34
Şekil 4.4. MAC monomeri ve MAC-AuNPs ön-komplekse ait FTIR-ATR spektrumu 35	35
Şekil 4.5. MAPA monomeri ve MAPAPEN-G ön-komplekse ait FTIR-ATR spektrumu..... 35	35
Şekil 4.6. MIP-AuNPs, MIP ve NIP-AuNPs SPR nanosensörlere ait FTIR-ATR spektrumu36	36
Şekil 4.7. MIP-AuNPs nanosensörün: A. Atomik kuvvet mikroskop görüntüsü; B. Elipsometre ölçüm görüntüsü; C. Temas açısı ölçüm görüntüsü..... 38	38
Şekil 4.8. NIP-AuNPs nanosensörün: A. Atomik kuvvet mikroskop görüntüsü; B. Elipsometre ölçüm görüntüsü; C. Temas açısı ölçüm görüntüsü..... 39	39
Şekil 4.9.a. 0.01 ppb PEN-G konsantrasyonu için elde edilen sensogram 40	40
Şekil 4.9.b. 0.05 ppb PEN-G konsantrasyonu için elde edilen sensogram 41	41
Şekil 4.9.c. 0.1 ppb PEN-G konsantrasyonu için elde edilen sensogram 41	41
Şekil 4.9.d. 0.25 ppb PEN-G konsantrasyonu için elde edilen sensogram 42	42
Şekil 4.9.e. 0.5 ppb PEN-G konsantrasyonu için elde edilen sensogram 42	42
Şekil 4.9.f. 1 ppb PEN-G konsantrasyonu için elde edilen sensogram 43	43
Şekil 4.9.g. 2.5 ppb PEN-G konsantrasyonu için elde edilen sensogram 43	43
Şekil 4.9.h. 5 ppb PEN-G konsantrasyonu için elde edilen sensogram 44	44
Şekil 4.10. Farklı derişimlerdeki PEN-G çözeltileri ve MIP-AuNPs nanosensör arasındaki etkileşimlerin zamana göre ΔR değerleri..... 44	44
Şekil 4.11. MIP-AuNPs nanosensörün farklı PEN-G konsantrasyonlarına verdiği SPR yanıtı, (a)	

Bütün PEN-G konsantrasyonlarına karşılık gelen SPR yanıtı ΔR arasındaki ilişki (b) iki farklı PEN-G iyon konsantrasyon aralığı (0.01-0.25 ve 0.5-5 ppb) için verilen SPR yanıtı arasındaki ilişki	46
Şekil 4.12. (a) Denge analiz yaklaşımı (Scatchard) (b) Bağlanma kinetik yaklaşımı ile kinetik hız sabitlerinin belirlenmesi	48
Şekil 4.13. (a) Langmuir (b) Freundlich (c) Langmuir- Freundlich adsorpsiyon modelleri.....	50
Şekil 4.14. MIP-AuNPs SPR nanosensörün 0.25 ppb PEN-G, AMX ve AMP çözeltileri için verdiği SPR sinyal yanıtlarının zamana karşı ΔR değerleri	52
Şekil 4.15. NIP-AuNPs SPR nanosensörün 0.25 ppb PEN-G, AMX ve AMP çözeltileri için verdiği SPR sinyal yanıtlarının zamana karşı ΔR değerleri	53
Şekil 4.16. MIP-AuNPs ve NIP-AuNPs SPR nanosensörün 0.25 ppb PEN-G çözeltisi için verdiği SPR sinyal yanıtlarının zamana karşı ΔR değerleri	54
Şekil 4.17. MIP-AuNPs nanosensörünün yanıtının 0.25 ppb PEN-G çözeltisi için tekrarlanabilirlik çalışmaları.....	55
Şekil 4.18. Farklı partiler ile hazırlanmış PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs nanosensörü için gün içi deneyler; 0.25 ppb PEN-G analizi için kullanılan her üç parti şeklinde hazırlanmış sensör için beş tekrarlı analiz.....	56
Şekil 4.19. AuNPs'in PEN-G için sinyal yanıtını artırıcı etkisi. PEN-G konsantrasyonu:0.25 ppb.	57
Şekil 4.20. MIP-AuNPs nanosensörün PEN-G katkılı (5 ppb) ve katkısız süt örneği için sinyal yanıtı	59
Şekil 4.21. PEN-G'nin HPLC ile analizi A) 1.0-25 ppb PEN-G çözeltisi için kalibrasyon eğrisi B) 5 ppb PEN-G katkılanmamış ve katkılanmamış süt örneği.....	64

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Sütte bulunan bazı antibiyotiklerin üst değerleri.....	6
Çizelge 2.2. Optik sensörlerin kullanım alanları	15
Çizelge 3.1. PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs, baskılanmamış NIP-AuNPs ve AuNPs'siz MIP SPR nanosensörlerin hazırlanma reçeteleri	20
Çizelge 4.1. PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs nanosensörün ve PEN-G baskılanmamış NIP-AuNPs nanosensörün yüzeylerinin su temas açıları.....	40
Çizelge 4.2. Kinetik hız sabitleri.....	49
Çizelge 4.3. Denge bağlanma izoterm parametreleri.....	51
Çizelge 4.4. MIP-AuNPs ve NIP-AuNPs nanosensörlerin PEN-G için seçicilik ve bağlı seçicilik katsayıları.....	54
Çizelge 4.5. Tekrarlanabilirliği gösteren kesinlik değerleri	56
Çizelge 4.6. Gün içi kesinlik.....	56
Çizelge 4.7. Penisilin G tayini için kullanılan sensörler.....	62

SİMGELER VE KISALTMALAR

SİMGELER

C	Analit derişimi (nM)
k_a	Bağlanma hız sabiti ($\text{nM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
k_d	Ayrılma hız sabiti (s^{-1})
K_A	Bağlanma sabiti (nM^{-1})
K_D	Ayrılmaz sabiti (nM)

KISALTMALAR

MAC	N-Metakroil-(L)-Sistein Metil Ester
MAPA	N-Metakroil-(L)-Fenilalanin Metil Ester
PEN-G	Benzilpenisilin
HEMA	2-Hidroksietil Metakrilat
EDMA	Etilen Glikol Dimetakrilat
FTIR-ATR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi-Zayıflatılmış Toplam Yansıma
MIP	Moleküler Baskılanmış Polimer
NIP	Baskılanmamış Polimer
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu

1. GİRİŞ

Gıda ürünlerinde, içme suyunda ve çevrede antibiyotik kalıntılarının bulunması, antibiyotiğe dirençli bakteri suşlarının ortaya çıkmasına, normal ekolojik dengenin bozulmasına ve alerjik reaksiyon insidansının artması dahil olmak üzere ciddi sağlık sorunlarına yol açmaktadır. En yaygın kullanılan antibiyotikler olan penisilinler, insanlarda, çiftlik hayvanlarında, kümes hayvanlarında ve su ürünleri yetiştiriciliğinde çeşitli bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde uzun süredir yaygın olarak kullanılmaktadır. Sonuç olarak bu gıdalarda ve çevrede bulunan antibiyotik kalıntılarının tespiti halk sağlığının korunması açısından hayati önem taşımaktadır [1]. Avrupa Birliği Yönetmelikleri, bu tehlikeleri önlemek için süt ve etteki bazı antibiyotikler için maksimum kalıntı limitleri (MRL'ler) belirlemiştir [2]. Genellikle antibiyotikler, *Bacillus stearothermophilus*'un büyüme inhibisyonuna dayanan mikrobiyolojik tabanlı tekniklerle tespit edilmiştir [3]. Bu testler genellikle uzun bir analiz süresi ve seçicilik eksikliği göstermekle kalmaz, aynı zamanda farklı β -laktam antibiyotikler ve hatta diğer antibiyotik sınıfları arasında ayırım yapamazlar. Penisilinlerin farklı matrislerden tespiti çoğunlukla ayırma yöntemleriyle gerçekleştirilir. Bugüne kadar, penisilin tespiti için iki ana metodoloji olan kromatografik testler (HPLC, LC-MS, vb.) [4-7] ve immünoassay yöntemleri [8-9] ya da kapiler elektroforez [10] kullanılmaktadır. Ne yazık ki, tüm bu yöntemler hassas ve seçici olmasına rağmen pahalı ve zaman alıcıdır, karmaşık analitik ekipman, kirletici çözücüler ve kalifiye personel gerektirir. Bu sınırlamaların üstesinden gelmek için yeni sensörlerin geliştirilmesi gereklidir. Bu nedenle, kolay uygulanabilecek, hızlı, basit ve spesifik bir analiz yönteminin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Şimdiye kadar PEN-G tayini için birkaç hızlı ve hassas yöntem bildirilmiştir [11-13].

Sensörler, biyolojik tanıma elemanlarını içeren basit ve kullanışlı dönüştürücü alıcıların bir kombinasyonuna sahip analitik cihazlardır [14]. Son yıllarda, yüksek özgüllük ve seçiciliklerinden dolayı penisilin antibiyotiğinin tespitinde elektrokimyasal [15-29], florimetrik ve kolorimetrik ölçümlere [30-33] dayalı optik sensörler kullanılmıştır. Yüzey plazmon rezonansı (SPR), ince bir metal filmle kaplı bir prizmada yansıyan ışığın yoğunluğuna dayanan optik bir tekniktir. SPR sensörleri, basitlikleri, yüksek özgüllükleri ve duyarlılıkları, gerçek zamanlı ölçümleri, düşük maliyetleri ve etiketlemeye ihtiyaç

duymamaları nedeniyle çeşitli biyomolekülleri saptamak için kullanılmıştır [34]. Optik bir teknik olarak SPR, hedef molekül ligand kaplı sensör yüzeyine bağlandığında veya absorbe edildiğinde sensörün altın yüzeyindeki kırılma indisi değişikliklerini ölçer. SPR nanosensörler, basitlikleri, düşük maliyetleri, yüksek özgüllük ve duyarlılıkları, gerçek zamanlı ölçümleri, etiketlemeye gerek olmaması ve minyatürleştirme kolaylığı nedeniyle son zamanlarda çeşitli biyomoleküllerin tespiti için yaygın olarak kullanılmaktadır.

Kayma açılarından elde edilen yanıt birimleri ve SPR eğrisinin değişim seviyesi, analit miktarına bağlı olup ve gerçek zamanlı olarak izlenebilir [35]. SPR biyosensörler, protein-protein, nükleotidler ve ilaç-albümin arasındaki etkileşimleri araştırmak için kullanılmıştır. Ayrıca, çeşitli faktörlerin neden olduğu hücre morfolojik değişiklikleri incelemek için hücre yüzeyi işaretleyici-antikor problemlerinde kullanılırlar [36].

Cacciatore ve ark. beta-laktam antibiyotik penisilin'in tespiti için kullanılacak bir optik biyosensör geliştirmiştir. Test, digoksinin etiketli ampisilin'in, Streptococcus pneumonia'nın çözünür bir penisilin bağlayıcı proteinine bağlanmasının inhibisyonuna dayanmaktadır [37]. Son yıllarda, maksimum dalga boyu zayıflaması gibi rezonans koşullarını tespit eden veya mikroskopik kırılma indeksindeki değişikliği ölçen SPR sensörleri, gıda analizi alanında giderek daha fazla kullanılmaktadır. Bunun nedeni, SPR sensörlerin vitaminleri, mikotoksinleri, reseptör proteinleri, hormonları ve veteriner ilaç kalıntılarını ve ayrıca salmonella gibi tüm hücreleri analiz etmek için kullanılabilmesidir. Bununla birlikte, gıda kontaminantlarının yerinde tespiti için kullanılacak yüksek verimli, oldukça hassas, uygun maliyetli yöntemlerin geliştirilmesi hala sınırlıdır. Bunun nedeni, benzer moleküler yapıya sahip farklı analitler arasındaki çoklu sinyal örtüşmesi veya karşılıklı girişim ve çapraz reaksiyonlardır [38].

Özel olarak hazırlanmış tanıma bölgeleriyle antikör benzeri yapay malzemeler yaratan moleküler baskılama teknolojisi, moleküler tanıma için iyi bir analitik araç haline gelmiştir. Mükemmel seçicilik, yüksek kimyasal ve fiziksel stabilite, basit ve ucuz hazırlama yöntemleri gibi birçok değere sahip moleküler baskılanmış polimerler (MIP'ler), sensörlerde tanıma elemanları olarak biyolojik moleküller için umut verici olarak kabul edilir. MIP'ler hemen hemen her ilgili hedef için tasarlanabilir. MIP tabanlı sensörler, farmasötiklerin belirlenmesi için başarıyla geliştirilmiştir [39].

Sunulan çalışmada, PEN-G baskılanmış SPR temelli nanosensör hazırlanarak, PEN-G'nin hem sulu çözeltiden hem de PEN-G spike edilmiş süt örneğinden seçici tayini gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, PEN-G tanıma bölgelerini içeren moleküler baskılanmış SPR nanosensör hazırlanmış, sinyal yanıtını artırıcı AuNPs'in ortama eklenmesi ile düşük tayin limiti (LOD) elde edilmiştir.

Aşağıdaki basamaklar takip edilerek, çalışma planı tamamlanmıştır.

- Yüzey plazmon rezonans sinyal yanıtını arttırmak amacıyla eklenen altın nanopartiküller (AuNPs) sentezlenmiştir.
- AuNPs ile kompleks yapıcı MAC monomerin karıştırılarak etkileşmesi sonucu MAC-AuNPs ön-kompleksi oluşturulmuştur.
- Moleküler baskılanmış nanosensör hazırlamak için, PEN-G ile N-metakroil-(L)- fenilalanin metil ester (MAPA) fonksiyonel monomerin koordine olarak MAPAPEN- G ön-kompleksi oluşturulmuştur.
- SPR çip altın yüzeylerin alil merkaptan ile modifiye edilerek yüzeye -vinil grupları takılmıştır.
- Oluşan MAC-AuNPs ve MAPAPEN-G ön-kompleksleri 2-Hidroksietil metakrilat (HEMA) monomeri ile karıştırılarak göreceli hidrofilik karışım elde edilmiştir.
- Hazırlanan monomer karışımı alil merkaptan ile modifiye edilmiş SPR çip yüzeyine damlatılarak spin kaplayıcı ile yüzeye homojen yayılması sağlanmıştır.
- Polimerizasyon işlemi UV ışığı altında monomer karışımının poli(2-Hidroksietil metakrilat-N-metakroil-(L)-sistein metil ester-altın nanopartiküller-N-metakroil-(L)- fenilalanin metil ester nanofilme dönüştürülerek SPR nanosensör (MIP-AuNPs) hazırlanması için kullanılmıştır.
- PEN-G kalıp molekülü polimerik matris filminden desorpsiyon ajanı yardımı ile uzaklaştırılmıştır.
- PEN-G baskılanmış ve baskılanmamış poli(2-Hidroksietil metakrilat-N-metakroil- (L)-sistein metil ester-altın nanopartiküller-N-metakroil-(L)-fenilalanin metil ester nanofilmler, FTIR-ATR spektrofotometre ile karakterize edilmiştir.

- PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs ve baskılanmamış NIP-AuNPs SPR nanosensörlerin karakterizasyonu, atomik kuvvet mikroskobu (AFM), elipsometre ve temas açısı (CA) ölçümleriyle karakterize edilmiştir.
- Kinetik çalışmalar için 10 mM pH 4.0 asetat tamponu içerisinde hazırlanan PEN- G'nin sekiz farklı konsantrasyon değeri (0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5 ppb) için adsorpsiyon çalışmaları gerçekleştirilmiş olup reflektans değerlerindeki değişim plazmonik yanıt olarak ölçülmüştür.
- PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs SPR nanosensörün tekrar kullanılabilirliği, gün içi tekrarlanabilirlik deneyleri ile gerçekleştirilmiş olup, üç farklı partide hazırlanan SPR nanosensörler ile her analiz beş tekrarlı yapılmıştır. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.
- PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs SPR nanosensörün seçiciliği, şekil ve boyut bakımından PEN-G ile benzerlik gösteren, amoksisilin ve ampisilin antibiyotikleri ile test edilmiştir.
- Baskılamanın etkinliğini tespit edebilmek amacı ile, PEN-G kalıp molekülü eklenmeden hazırlanan baskılanmamış poli(2-Hidroksietil metakrilat-N-metakroil-(L)-sistein metil ester-altın nanopartiküller-N-metakroil-(L)-fenilalanin metil ester SPR nanosensör (NIP-AuNPs), baskılanmış (MIP-AuNPs) SPR nanosensör ile aynı koşullarda hazırlanmıştır.
- AuNPs'in sinyal artırıcı etkisi, AuNPs eklenmeden hazırlanan PEN-G baskılanmış poli(2-Hidroksietil metakrilat-N-metakroil-(L)-sistein metil ester-altın nanopartiküller-N-metakroil-(L)-fenilalanin metil ester (MIP) SPR nanosensör ile doğrulanmıştır.
- Gerçek örnek olarak, (MIP-AuNPs) SPR nanosensör ile PEN-G antibiyotiğinin spike edilmiş süt örneğinden seçici tayini gerçekleştirilmiştir.
- Gerçek örnek olarak, (MIP-AuNPs) SPR nanosensör ile PEN-G antibiyotiğinin seçici tayininin validasyon çalışmaları, HPLC analizleri ile gerçekleştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Antibiyotiklerin sınıflandırılması

Hayvancılıkta antibiyotiklerin kullanımı 1940'lı yılların sonuna doğru uzanır ve günümüzde tetrasiklinler, aminoglikozidler ve β -laktamlar veterinerlik sektöründe tedavi amaçlı kullanılan antibiyotiklerdir [40]. β -laktam penisilin türevleri sefalosporinleri, monobaktamları ve karbapenemleri içine alan geniş antibiyotik sınıfıdır [41]. Ticari ürün elde etmek için kullanılan sütler patojenik bakterilerden arındırılmak üzere sterilizasyon işlemine tabi tutulması rağmen, sterilizasyon sonunda

%10-20 değer aralıklarında PEN-G kalıntılara rastlamak mümkündür ve sütte bulunan antibiyotik kalıntıları IgE üretimini tetikleyerek, antibiyotiğe duyarlı bireyler de kinin, histamin, lökotrin gibi kimyasalların salınmasına neden olarak döküntü, kurdeşen gibi durumlara sebep olurlar [42,43]. Antibiyotik kalıntıları yalnızca süt kalitesi etkilemesinin yanında fermantasyon sonucu elde edilen (peynir, yoğurt gibi) gıda başlatıcılarını da etkileyerek hem ürün kalitesini hem de tüketici sağlığını olumsuz yönde etkiler. Ayrıca antibiyotik kullanımına bağlı olarak, antibiyotiğe dirençli mikroorganizmaların da gelişmesinde önemli bir unsurdur. Avrupa Birliği (AB) tarafından 2012 verileri referans alındığında hayvansal alanlarda tedavi amaçlı kullanılmak üzere 1776.9 ton penisilin türevi üretilmiş, bu değer üretilmiş olan diğer antibiyotik türevlerinin toplam %22.3'lük kısmını oluşturmaktadır [44]. Avrupa Birliği tarafından tüketici sağlığını korumak için hayvansal gıdalarda bulunması gereken antibiyotik üst sınır değerleri belirlenmiştir. Tablo 1'de sütte bulunan bazı antibiyotiklerin üst değerleri gösterilmektedir.

Çizelge 2.1. Sütte bulunan bazı antibiyotiklerin üst değerleri [45].

Antibiyotik Sınıfı	Aktif Bileşini	Sütte Bulunması	
		Gereken	Üst Değer
Penisilinler	Benzilpenisilin, amoksisilin,		4
	ampisilin		30
	Oksasilin, nafsilin, kloxacillin, dikloksasilin		
Makrolidler	Eritromisin A		40
	Spiramisin		200
	Tilmikosin, tilosin		50
Polimiksinler	Kolistin		50
Aminoglikozitler			
	Streptomisin		200
	Kanamisin A		150
	Gentamisin		100
	Neomisin B		1500
Tetrasiklinler	Tetrasiklin, oksitetrasiklin klortetrasiklin		100

AB tarafından yayınlanmış olan üst antibiyotik sınır değerlerinin aşılması hem tüketicileri hem de besin zincirini olumsuz yönde etkilemektedir. Aynı zamanda antibiyotik kullanımı, mikroorganizmaların antibiyotik karşı olan dirençliliğini de arttırarak, dirençli mikroorganizmaların gelişmesinde önemli paya da sahiptir. Bu veriler ışığında, sütte bulunan antibiyotik kalıntılarının etkin bir şekilde tayin edilmesi hem besin zincirini hem ekolojik çevreyi hem de tüketici sağlığının korunması açısından son derece önemlidir.

2.2. Antibiyotiklerin tayin yöntemleri

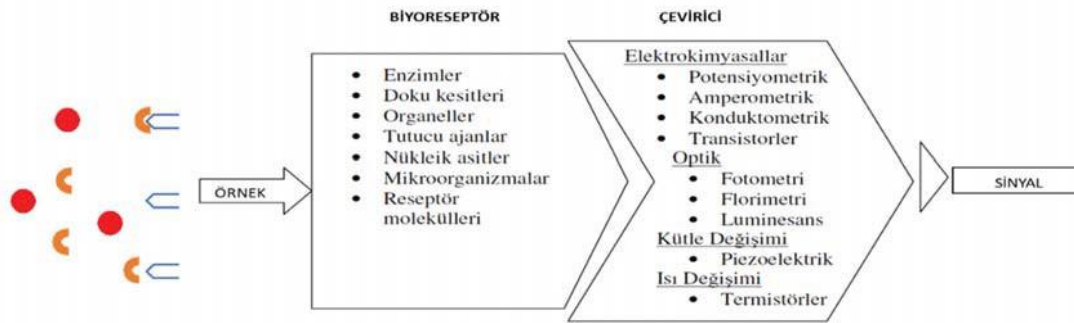
Literatür çalışmaları incelendiğinde, antibiyotik kalıntılarının tayin edilmesinde kullanılan yöntemleri üç ana başlık altında toplamak mümkündür ve bu yöntemler sırasıyla mikrobiyal inhibisyon testleri, kromatografik yöntemler ve biyosensörler olarak sınıflandırılabilir. Mikrobiyal inhibisyon testleri uygulama kolaylığı bakımından tercih edilen bir yöntemdir ve yöntem; mikroorganizmanın bulunduğu ortama analiz edilecek (süt) numunenin konulması ve mikroorganizmanın gelişme gösterip göstermemesi temeline dayanır [46]. Delvotest test; β -laktam grubu antibiyotik tayininde kullanılmak üzere 1970'li yıllarda geliştirilen mikrobiyal inhibisyon test yöntemidir (Kantiani vd. 2009). Yöntemde *Bacillus stearothermophilus* mikroorganizmasının gelişim gösterdiği ve pH indikatörüne sahip besi yerine süt numunesi konular, 64°C'de 2.5 saat boyunca inkübasyona bırakılan mikroorganizmanın gelişimi incelenir [47,48]. Süre sonunda analiz edilmek istenen sütte, antibiyotik kalıntıları bulunmazsa, mikroorganizmanın üremesi gerçekleşir ve ortama bırakmış olduğu asit üretimine bağlı olarak, besi ortamı mor renkten sarı renge dönüşür. Mikrobiyal inhibisyon testlerinin kolay uygulanabilirliği ve ekonomik olmaları avantaj olarak karşımıza çıkarken, test sonuçlarının doğruluğunun belirlenmesi için analitik cihazlara duyulan ihtiyaç ve test için gerekli olan uzun inkübasyon süresi yöntemin dezavantajları olarak karşımıza çıkmaktadır [49].

Antibiyotiklerin tayin edilmesinde kullanılan diğer bir yaklaşımda kromatografidir ve analitik cihazlar kullanılarak düşük tayin aralıklarında antibiyotik miktarı tespit edilebilir (Lan vd. 2017). Literatür çalışmaları incelendiğinde; PEN-G kalıntılarının tayin edilmesinde yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HLPC) [50] MALDI-TOF kütle spektrometresi [51], sıvı kromatografisi kütle spektrometresi (LC-MS) [52] ve kapiller elektrokromatografisi-kütle spektrometresinin [53] kullanıldığı görülmektedir. Analitik cihazlar yardımıyla, PEN-G'yi düşük tayin aralıklarında tespit etmek mümkünken, kromatografik yaklaşımlar birtakım dezavantajları da beraberinde getirmektedir. Örneğin; analitik cihazlarda PEN-G bulunduğu düşünülen örneklerin ön ayırma işlemine tabi tutulması gerekmektedir ve genellikle ön ayırma işleminde asetonitril gibi organik çözücülere ihtiyaç duyulur. Fakat β -laktam grubu antibiyotiklerin uygun koşullar (pH ve sıcaklık gibi) sağlanmadığı takdirde kararlılıklarını kolayca kaybettikleri için kromatografik tayinlerde sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Bunlara ek olarak analitik

cihazların pahalı olmaları, metot geliştirme aşamasında uzman personele ihtiyaç duyulması ve özellikle sütlerde antibiyotik tayini öncesinde örnek hazırlama basamaklarının çokluğu (çöktürme-santrifüj-örneğin analitik cihazda analizi) hem zaman kaybını hem de maliyeti artıran etmenler olarak karşımıza çıkmaktadır.

2.3. Antibiyotiklerin biyosensörler ile tayini

Antibiyotik kalıntılarının tayin edilmesinde son yaklaşım olarak biyosensörler literatürde sıklıkla kullanılmaktadır. Biyosensörler (Şekil 2.1); biyolojik numuneleri algıma özelliği bulunan, biyolojik ve fizikokimyasal bileşenlerden meydana gelen analitik cihazlardır [54]. Biyolojik kısım (biyoreseptör) analiz edilmek istenen örneği tanıyan ya da etkileşime giren birimdir ve makromoleküller, enzimler, antibadiler biyoreseptör olarak kullanılırlar (Khandpur, 2003). Fizikokimyasal kısım çevirici birim olarak da ifade edilir ve incelenmek istenen örneğin derişimine bağlı olarak meydana gelen etkileşimleri sinyale çeviren kısımdır (Khandpur, 2003). Biyosensörlerin çalışma prensibi incelendiğinde; biyosensörün dış katmanının geçirgen olduğu görülmektedir ve biyosensörün iç kısmında bulunan biyolojik numune biyokimyasal reaksiyonlar sonucunda başka bir ürüne dönüşür ve mekanik ya da elektriksel özelliklerin değişmesiyle karakterize edilir. Ardından çevirici birimin türüne bağlı olarak çıkış sinyali elde edilerek analiz tamamlanır. Biyosensörlerin biyoreseptör kısmında enzimler, antibadiler ve işaretlenmiş DNA'lar yüzeye tutuklanarak kullanılırken, çevirici birimler olarak termal, elektrokimyasal, pizoelektrik ve optik çeviriler tercih edilmektedir [55].



Şekil 2.1. Biyosensörlerin temel bileşenleri ve çalışma prensibi.

Biyosensörlerin gıda analizlerinde, klinik çalışmalar ile çevre uygulamalarında kullanıldığı görmek mümkündür ve kullanım kolaylıkları, düşük maliyetleri, pratik olmaları ve analizlerin eş zamanlı olarak izlenebilmesi biyosensörlerin yaygın olarak kullanılmasında ki tercih nedenlerinden bazılarıdır [41]. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde immüno-sensör [9], elektrokimyasal [13], aptamer tabanlı [41], kolorimetrik [56], ve optik [57] temelli biosensörler kullanılarak PEN-G kalıntıları düşük tayin aralıklarında tespit edilmiştir. PEN-G'ye karşı özgüllüğün sağlanması için enzim ya da antibadilerden yararlanılmıştır. Bu işlemler iki önemli dezavantajı da beraberinde getirir. Öncelikle enzim ve antibadilerin analiz öncesinde yüzeye immobilize edilmeleri sırasında aktive kayıplarıyla karşılaşılması mümkündür. Diğer bir dezavantaj da enzim ile antibadilerin pahalı olmaları nedeniyle maliyetin artmasıdır. Son zamanlarda moleküler baskılanmış polimerler diğer bir deyişle plastik antibadiler bu dezavantajları ortadan kaldırmak üzere alternatif bir seçenek olarak tercih edilmektedir.

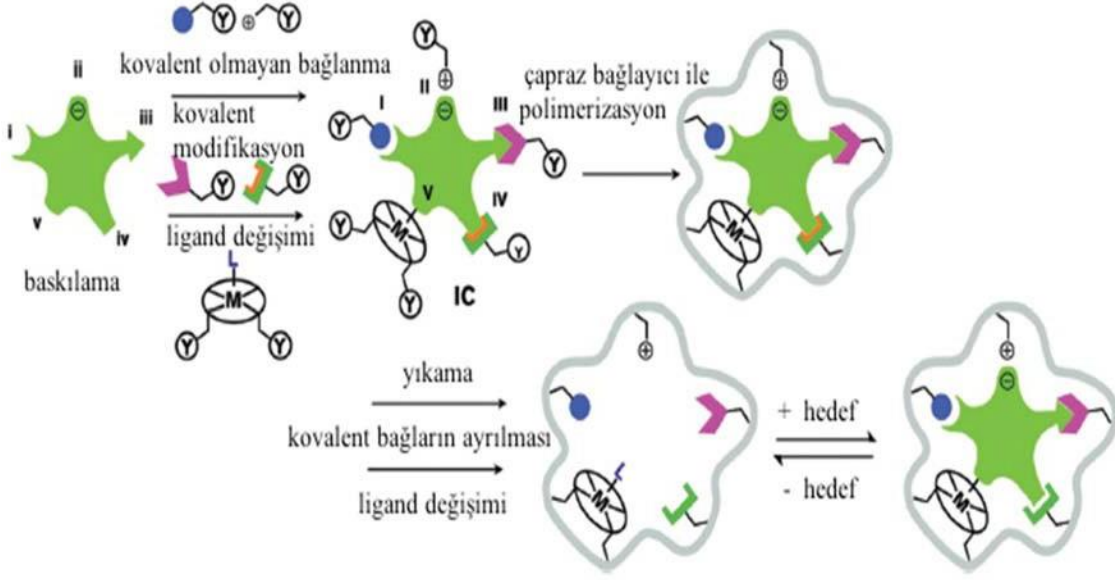
2.4. Moleküler baskılama yöntemi

Moleküler baskılama yöntemi ile tayin edilmesi yada uzaklaştırılması gereken hedef molekül için seçici tanıma bölgelerine sahip polimerler hazırlanır. Moleküler baskılama yöntemi kullanılarak hazırlanan destek matrislerinin hedef analit molekülünü yüksek seçicilikle tayin etmesi oldukça önemlidir. Moleküler baskılama tekniği; herhangi bir polimer matriks içerisinde, seçilmiş olan hedef molekülü (protein, iyon, pestisit gibi) şekil, büyüklük ve geometrik yapı bakımından tanıyan hafıza bölgelerinin oluşturulması olarak tanımlanabilir. Moleküler baskılanmış polimerler 3 basamakta hazırlanır. İlk basamakta hedef molekülü tanıyan ve hedef molekülle etkileşime girmesi için uygun monomer yada monomerlerin kullanıldığı ön-kompleks basamağıdır. Bu basamağı takiben uygun çapraz bağlayıcı kullanılarak polimerizasyona başlanır ve son basamakta; uygun desorpsiyon çözültisi kullanılarak hedef molekül polimer matriksten uzaklaştırılır. Bu işlem sonunda polimer matrikse hedef molekülü 3 boyutlu geometrik yapı, büyüklük ve şekil bakımından tanıyan hafıza bölgelerinin elde edilir. Moleküler baskılanmış polimerler birçok avantajı da beraberinde getirmektedirler; örneğin moleküler baskılanmış polimerlerin hazırlanması kolay, ucuz ve hedef molekülüne karşı oldukça seçicidir. Bu avantajlara ek olarak uç pH ve sıcaklık aralıklarında yapılarını koruyabildikleri gibi tekrar tekrar kullanıma da uygundur.

Bu bakımdan uygun polimerizasyon koşulları altında hazırlanmış olan moleküler baskılanmış polimerlerden ayırma işlemlerinde, çevre uygulamalarında ve biyosensör çalışmalarında yararlanılmaktadır [58, 59].

Baskılanacak molekül, kovalent olmayan, kovalent, ya da ligand (L) aracılı metal (M) etkileşimleri ile tamamlayıcı fonksiyonel gruplar ile bağlanır. Hedef molekül ile fonksiyonel monomer (IC) arasındaki etkileşimler ile kompleks oluşturulur. Hidrojen bağları ya da van der Waals etkileşimleri kompleks oluşurken gerçekleşen bağlanmalarda (I) etkin olabilir; (II) elektrostatik ya da iyonik etkileşimler ile bağlanmalar gerçekleşebilir; (III) bağlanma kovalent etkileşimler ile olabilir; (IV) uzatıcı kol (turuncu) kullanılarak kovalent etkileşimler ile bağlanma olabilir; (V) ligand-metal ya da metal-ligand koordinasyonu ile bağlanma gerçekleşebilir [60].

Fonksiyonel monomerin çapraz bağlayıcı varlığında çapraz bağlanma reaksiyonuna girebilecek fonksiyonel bir grup (Y) içermesi gerekir. Oluşturulan kompleksin Çapraz bağlayıcı varlığındaki polimerizasyon reaksiyonu ile katı polimer matris (gri) elde edilir. Baskılama yöntemi ile, baskılanan hedef molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki etkileşimler bozulmamaktadır. Baskılanan hedef molekülün uzaklaştırılması için aradaki kimyasal bağların kırılması ya da ligand değişimi işleminin uygulanması gerekir. Hedef molekül uzaklaştırıldıktan sonra hazırlanan matrisin çeperlerinde fonksiyonel grupları içeren hedef moleküle özgül boşluklar kalır. Daha sonra bu özgül boşluklar tarafından hedef molekülün tanınması kovalent olmayan etkileşimler (i, ii ve iv), kovalent bağ oluşumu (iii), ya da ligand değişimi (v) ile gerçekleşir. Bununla birlikte, çapraz bağlanma gerçekleşirken hedef molekülün çevresindeki özgül olmayan yüzey özellikleri sayesinde matrisin hedef molekülü tanıyarak bağlanması ihtimali bulunmaktadır [61,62]. Şekil 2.2 de moleküler baskılamada kullanılan beş ana yöntem gösterilmektedir.



Şekil 2.2. Moleküler baskılama yöntemleri (i) kovalent olmayan bağlanma, (ii) elektrostatik/iyonik etkileşimler, (iii) kovalent bağlanma, (iv) yarı kovalent bağlanma (v) metal şelat koordinasyonu ile bağlanma.

2.5. Yüze plazmon rezonans

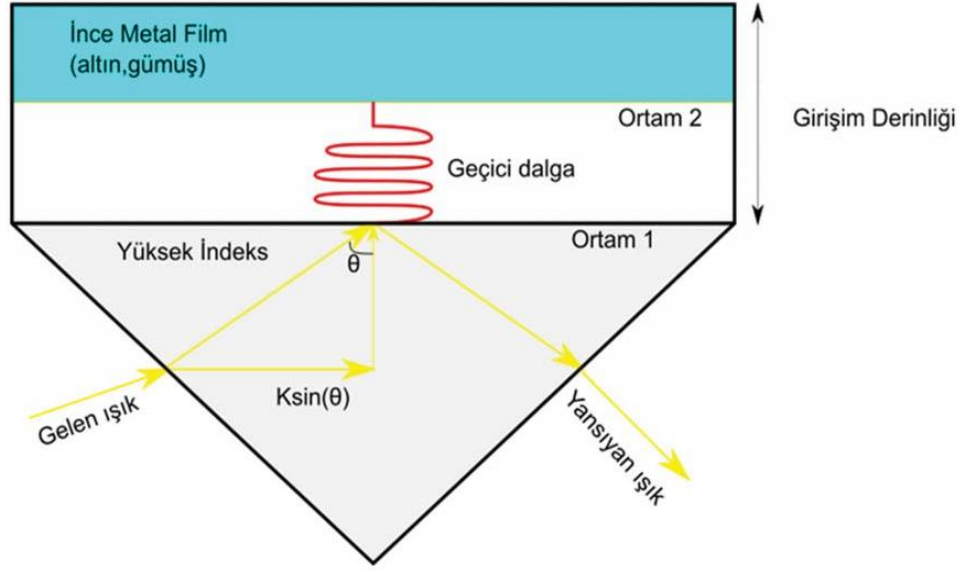
Yüze plazmon rezonans (SPR) temelli sensörler optik tabanlı analitik cihazlardır ve SPR sensörler kullanılarak herhangi bir molekülü eş-zamanlı olarak ve herhangi bir işaretleyici moleküllere ihtiyaç duyulmadan incelenmesi mümkündür. Yöntem 1902 yılında Wood'un yapmış olduğu literatür çalışmalarına dayanır ve biyomolekül etkileşimlerin incelenmesi ilk kez 1983 yılında Liedberg ve arkadaşları tarafından literatüre kazandırılmıştır [63]. Yüze plazmon rezonans; iletken film ile ayrılmış olan ve iki farklı kırılma indislerine sahip ortama (metal ve dielektrik ortam) uygun dalga boyunda gönderilmiş olan ışığın metal yüzeyle (SPR çipi) etkileşmesi sonucu meydana gelir. Bu sırada gönderilen ışığın bir kısmı yansımaya uğrarken, bir kısmı da çip yüzeyinde bulunan metal atomlarıyla etkileşime girer. Plazmon; metal yüzey ile dielektrik bölgenin sınır noktasında meydana geldiği için, bu sınır bölgesi yüzeyde meydana gelen değişikliklere karşı oldukça hassastır ve SPR'nin analitik uygulamalarda tercih edilmesinde en büyük etkendir [64].

Analitik uygulamalar sırasında ışık kaynağı metalle kaplanmış olan (yaygın olarak altın)

sensör yüzeyine gönderilir ve gönderilmiş olan ışığın bir kısmı yansımaya uğrayarak dedektör tarafından ölçülür. Eğer sensör yüzeyinde herhangi bir değişim olursa (örneğin tayin edilmek istenen analitin yüzeye bağlanması gibi) bu durum ışığın da kırılma indisi etkiler ve ilk durumda ölçülen açının değişimine sebep olur. Zamana bağlı olarak bu açılarda meydana gelen değişimler eş-zamanlı olarak izlenerek kinetik analizler gerçekleştirilir. SPR sensörlerin kullanımı birçok avantajı da beraberinde getirir. Örneğin biyomolekül etkileşimleri eş-zamanlı olarak incelenirken, herhangi bir işaretleyici moleküle de gerek duyulmaz. Biyomolekül-biyomolekül etkileşimleri eş- zamanlı olarak izlendiği için elde edilen kinetik eğrilerden etkileşim sabitlerinin saptanması da oldukça kolaydır.

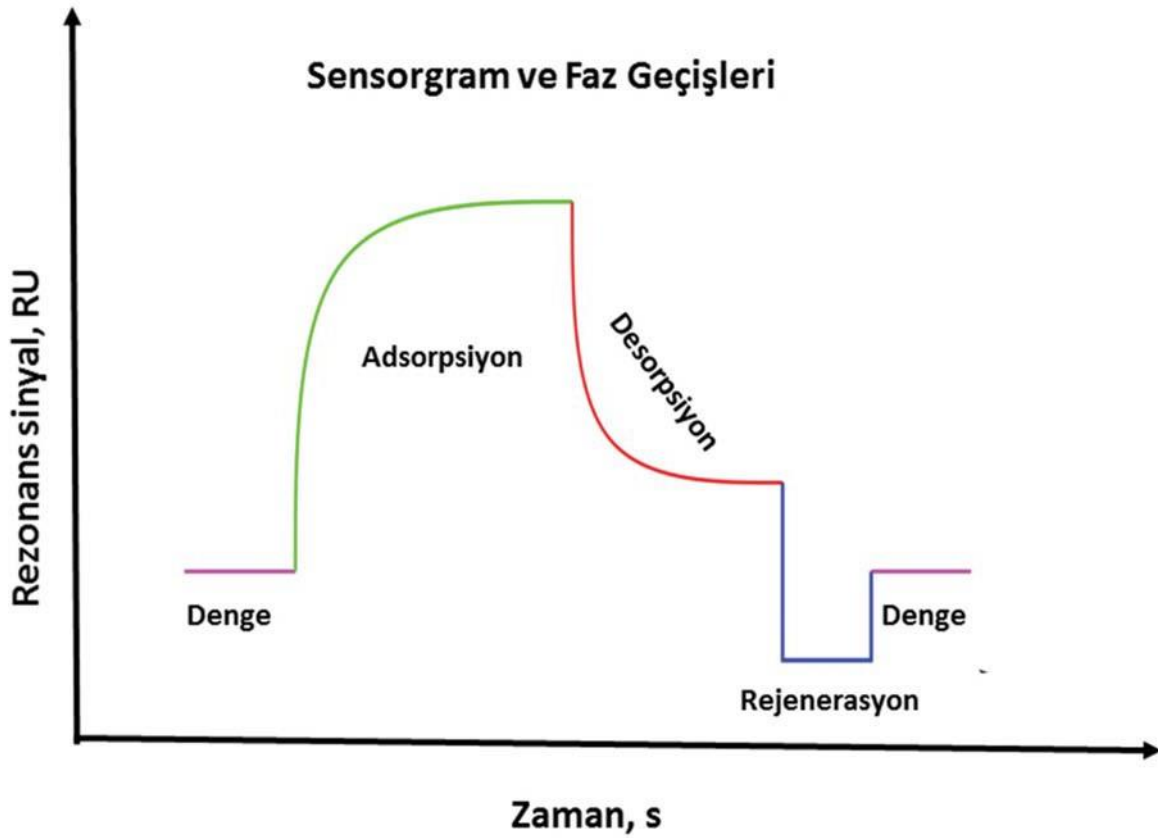
Ayrıca işaretli moleküle gerek duyulmaması hem analiz süresinin kısılması hem de incelenmek istenen biyomolekülün zarar görmesini de önlemektedir. Tüm bunlara ek olarak SPR sensörler kullanılarak düşük tayin aralıklarında analiz yapmakta mümkündür. Son zamanlarda SPR optik sensörler gıda ve çevre analizleri ile teşhis alanlarında kullanılmaktadırlar [65-67].

SPR sensörlerde biyo-tanıma sonrasında hedef molekülün yüzeye tutunması sonucunda yüzeydeki yoğunluğu artar bu ise kırılma indisindeki yoğunluğun artmasına neden olmaktadır. Kırılma indisinin yoğunluğunun artması sonucunda ise rezonans açısı kaymaktadır. Kretschmann prizma yapısı en çok tercih edilen Kretschmann prizma yapısıdır. Şekil 2.3 de iç kırınım gerçekleşmesi sonucu oluşan elektron salınımları açık bir şekilde görülmektedir. Ayrıca gelen ışığın bir bölümünün absorbe edilmesi ile yüzeyde oluşan plazmon şeklindeki gibi gözlenebilmektedir. Şekil 2.4 ise SPR ile elde edilen sensorgram sürecini ifade etmektedir.



Şekil 2.3. Dielektrik sınırlarda gerçekleşen toplam iç kırınım.

Metal filmde plazmon oluşumuna sebep olacak elektrik alandaki vektör salınımı sadece p-polarize ışık sağlayabildiği için yüzeyde plazmon oluşmasını sağlamaktadır. Metal yüzeyine gelen elektron plazmalarının yarattığı bu durum transvers manyetik dalgası olarak tanımlanmaktadır. S-polarize ışık ise metal filme paralel olarak oluşması dolayısıyla yüzeyde plazmon oluşturamamaktadır [68].

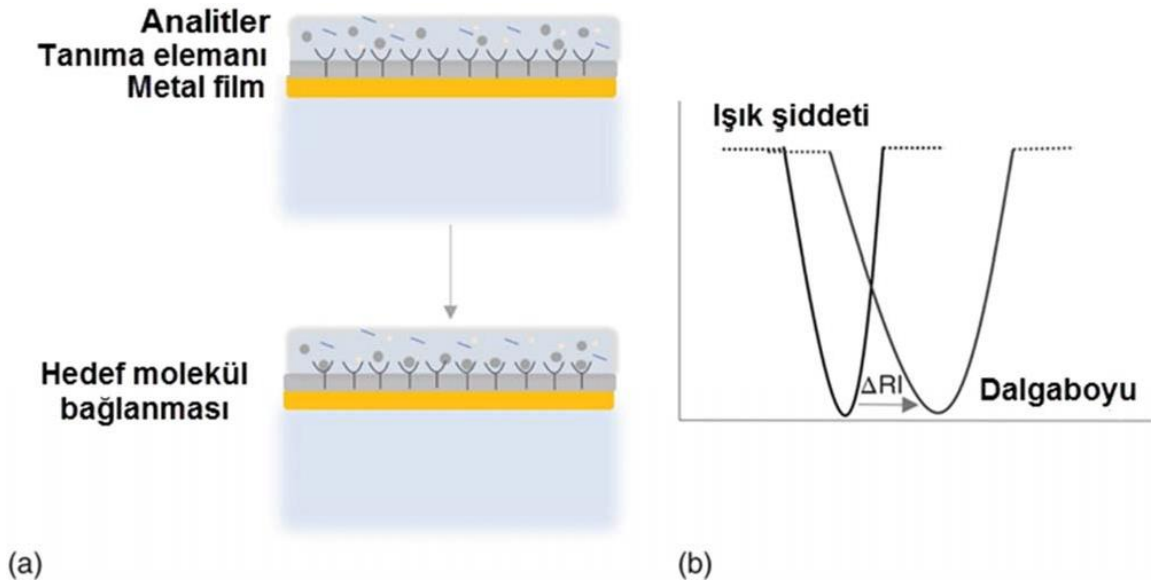


Şekil 2.4. Tipik bir SPR sensörü ile elde edilen sensorgramının şematik gösterimi.

Plazmonik sensörler, optik temelli sensörlerin bir sınıfı olup analitin bağlandığı tanıma elemanlarını içeren metal ve/veya metal-dielektrik yapıların olduğu destek malzemelerinden oluşmaktadırlar [69]. Sensöre bir analit çözeltisi uygulandığında, analitin yüzeydeki bir alıcı tarafından yakalanması gerçekleşir ve algılama elemanı kırılma indisinde (RI) değişikliğine neden olur. Şekil 2.5 kırılma indisindeki değişikliği göstermektedir. Yüzey plazmonu, sensör yüzeyindeki RI'deki değişikliklere karşı çok hassastır. Bölgesel RI kaynaklı değişiklikler, yüzey plazmonu ile bağlantılı ışıktaki değişiklikler incelenerek tespit edilebilir. Plazmonik sensörler, ultra düşük konsantrasyonlardaki biyolojik ve kimyasal molekülleri hızlı, gerçek zamanlı ve etiketsiz tayin etmek için kullanılmaktadır. Çizelge 2.2 optik temelli sensörlerin kullanım alanlarını göstermektedir [70-74].

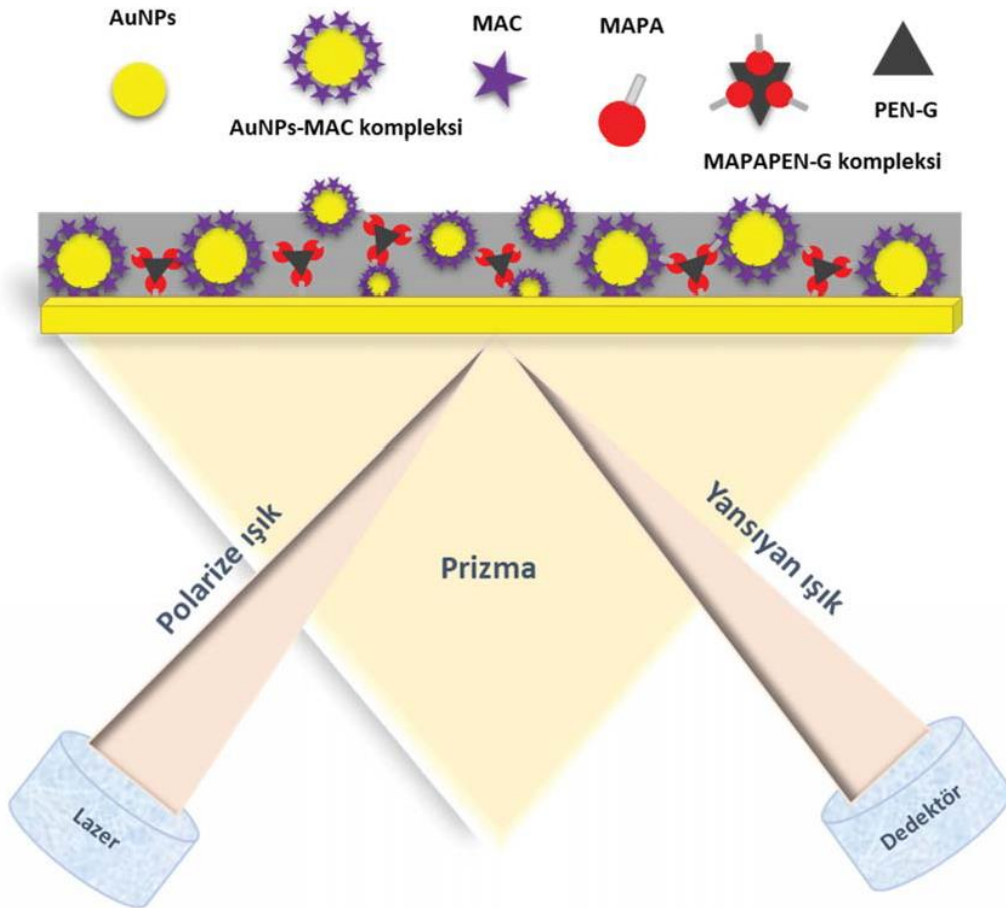
Çizelge 2.2. Optik sensörlerin kullanım alanları

Kullanım alanı	Hedef	Sensör	Referans
Besin kontrolü	Mikotoksinler	SPR	[70]
Medikal teşhis	Albumin	SPR	[71]
Çevre takibi	Pestisit	Optik temelli	[72]
Biyomoleküler etkileşim	Anti-lizozim tek- alan antikor	GC	[73]
Güvenlik	Uçucu organik bileşikler	SERS	[74]



Şekil 2.5. a) Plazmonik sensörlerin çalışma prensibinin şematik gösterimi b) yakalanan analit tarafından indüklenen sensör yüzeyindeki RI artışına bağlı olarak spektrumdaki değişiklik.

Bu çalışmada, yüzey plazmon rezonans temelli sensör ile moleküler baskılama tekniği kullanılarak hem sulu çözelti hem de süt örneklerinden seçici ve hassas Penisilin G (PEN-G) antibiyotikinin tayini gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, PEN-G baskılanmış, poli(2-Hidroksietil metakrilat- N-metakroil-(L)-sistein metil ester-altın nanopartiküller-N-metakroil-(L)-fenilalanin metil ester (MIP-AuNPs) nanosensör hazırlanmıştır. Yüzey plazmon rezonans sinyal yanıtını arttırmak amacıyla eklenen altın nanopartiküllerin (AuNPs) etkisini incelemek için AuNPs eklenmeden hazırlanan nanosensör (MIP) ile kontrol deneyleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, baskılama verimliliğini incelemek amacı ile, PEN-G baskılanmamış nanosensör (NIP-AuNPs), PEN-G molekülünün eklenmesi dışında aynı polimerizasyon reçetesi kullanılarak hazırlanmıştır. Şekil 2.6 PEN-G baskılanmış SPR sensörü şematik olarak göstermektedir.



Şekil 2.6. PEN-G baskılanmış SPR sensörün şematik gösterimi.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Kimyasal malzemeler

Kompleks yapıcı N-metakroil-(L)-sistein metil ester (MAC) monomeri ve hidrofobik N-metakroil-(L)-fenilalanin metil ester (MAPA) fonksiyonel monomer Nanoreg (ANKARA) firmasından satın alınmıştır. Sodyum sitrat tribazik dihidrat ve altın (III) klorür trihidrat, 2-hidroksietilmetakrilat (HEMA), azoizobisbütironitril (AIBN), etilenglikol dimetakrilat (EDMA), Penisilin G sodyum tuzu (PEN-G), Amoksisilin (AMX) ve Ampisilin (AMP) antibiyotikleri, Merck (Darmstadt, Germany) firmasından temin edildi. SPR çipler (SPR-1000-050 SPR CHIP GWC) Genoptics (Orsay, France) firmasından alındı. Potasyum bromür (KBr) ve analitik olarak saf olan diğer kimyasallar Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilirken, gerçek örnek analizi için gerçekleştirilen deneylerde kullanılan süt örneği lokal marketten satın alınmıştır. Deneylerde kullanılan ve direnci 18 MO/cm olan deiyonize suyu elde etmek için, sırası ile yüksek akışlı selüloz asetat membran (Barnstead D2731), ters ozmoz Barnstead (Dubuque, IA) ROpure LP® birimi, Barnstead D3804 NANOpure® organik/kolloid uzaklaştırma birimi ve iyon değiştirici dolgulu kolon sistem kullanılmıştır.

3.2. SPR biyosensörlerin hazırlanmasında kullanılan çip yüzeyine alil grubunun bağlanması

SPR sensörün altın yüzeyini temizlemek amacı ile 10 mL asidik pirana çözeltisi içine sensör hazırlamada kullanılan çiplerin altın yüzeyleri daldırılarak 30 saniye çözelti ile etkileştirilmiştir. Çözeltiden çıkarılan SPR nanosensör saf etil alkol ile yıkandıktan sonra, vakum etüvünde (200 mmHg, 40°C) 3 saat kurutularak yüzeye alil gruplarının bağlanması için hazır hale getirilmiştir. Kurutma işleminden sonra, yüzeye alil gruplarının bağlanması amacı ile alil merkaptanın çözeltisi kuru yüzeye damlatılarak, 20 saniye süresince spin coater ile döndürülerek yüzeyde ince tabaka halinde dağılması sağlanmıştır. 24 saat yüzeyde kovalent bağlanma için bekletilen SPR çip, etil alkol ile yıkanmış ve bağlanmayan alil merkaptan gruplarının uzaklaşması sağlanmıştır.

3.3. Altın nanopartiküllerin (AuNPs) sentezi

PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs, ve baskılanmamış NIP-AuNPs SPR nanosensörler poli(2-Hidroksietil metakrilat-N-metakroil-(L)-sistein metil ester-altın nanopartiküller-N-metakroil-(L)-fenilalanin metil ester nanofilmlerin altın yüzeyine bağlanması ile elde edildi. Moleküler baskılamanın etkinliğini ve AuNPs'in sinyal artırma özelliğini incelemek için monomer karışımına sırası ile PEN-G ve AuNPs eklenmeden SPR nanosensörler hazırlandı. Kullanılan AuNPs, Turkevich metoduna göre [75] H₂AuCl₄ tuzunun Au'a sodyum sitrat kullanılarak indirgenmesiyle sentezlenmiştir. Sentezlenen AuNPs'in konsantrasyonu zeta boyut analizi ile tespit edilen AuNPs'in ortalama boyut değerinin kullanılmasıyla hesaplanmıştır [76]. AuNPs'in boyutlarını ölçmek için gerçekleştirilen analiz için Nano Zetasizer (NanoS, Malvern Instruments, Londra, İngiltere) cihazı kullanılmıştır. Analizde deiyonize suyun yoğunluğu; 0.88 mPa.s ve kırınma indeksi; 1.33 olarak kullanılmıştır. Sentezlenen nanopartiküllerin çözeltisi boyut analizörünün örnek haznesine yerleştirilerek zeta boyut analizi gerçekleştirilmiştir. Oda sıcaklığındaki ışık saçılmasının 90° lik geliş açısında ölçülmesi ile partikül sayısı hesaplanmış olup, ölçümler üç kez tekrarlanarak gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.1 Zeta boyut analizörünün resmini göstermektedir. Denklem 3.1 nanopartikül başına düşen Au atomlarının sayısını (N), Denklem 3.2, AuNPs'in konsantrasyonunu (C) hesaplamak için kullanıldı. Denklemlerde kullanılan (ρ) Au'nun yoğunluğunu gösterirken (fcc, 19.3 g/cm³), (M) Au'nun atomik kütesini, (D) AuNPs'in çapını, (N_T) Au atomlarının toplam sayısını, V çözeltinin hacmini, (N_A) Avogadro sayısını göstermektedir.

$$N = \frac{\pi \rho D^3}{6 M} \quad (3.1)$$

$$C = \frac{N_T}{NVN_A} \quad (3.2)$$



Şekil 3.1. Nanopartiküllerin boyut analizinin yapılması için kullanılan Zeta-sizer analizör programı.

3.4. PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs, baskılanmamış NIP-AuNPs, AuNPs'i içermeyen MIP SPR nanosensörlerin hazırlanması

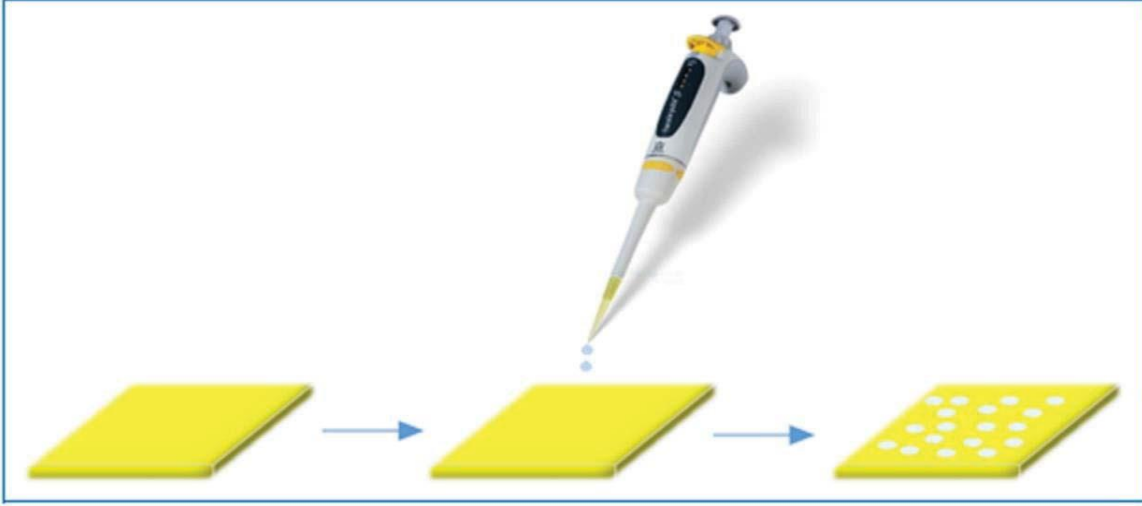
PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs, ve baskılanmamış NIP-AuNPs SPR nanosensörler üretilirken, poli(2-Hidroksietil metakrilat-N-metakroil-(L)-sistein metil ester-altın nanopartiküller-N-metakroil-(L)-fenilalanin metil ester nanofilmlerin sentezlenebilmesi için öncelikle MAC-AuNPs ve MAPAPEN-G ön-komplekslerinin hazırlanması gerekmektedir. Bu amaçla MAC monomeri AuNPs ile koordine olarak MAC-AuNPs ön- kompleks yapıcı monomer olarak kullanılmıştır. MAC monomeri, sinyal artırıcı olarak kullanılan AuNPs ile kompleksleşerek MAC-AuNPs ön-kompleks oluşturur. Konsantrasyonu belirlendikten sonra gerekli miktardaki MAC monomeri (6.75 μL) AuNPs (30 μL) ile 0.01 mmol:0.01 nmol oranında 1 saat etkileşerek MAC-AuNPs ön-kompleksi oluşturuldu. MAC-AuNPs ön-kompleks oluşumu UV-VIS spektrofotometre (Shimadzu UV-1601, Japan) ile belirlendi. Aynı kompleksleşme prosedürü, fonksiyonel monomer MAPA (17 μL) ve kalıp molekül PEN-G (3.34 mg) nin 0.01 mmol: 0.01 mmol oranında 1 saat etkileşimi sonucunda MAPAPEN-G ön-kompleksi oluşturulması için uygulandı. MAPAPEN-G ön-kompleksleşmesi de UV-VIS spektrofotometre ile tespit edilmiştir.

PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs SPR nanosensörün hazırlanması amacı ile öncelikle monomer fazı oluşturulmuştur. Bu amaçla HEMA (0.01 mmol) ve EDMA (0.04 mmol) monomerleri daha önce oluşturulmuş MAC-AuNPs ve MAPAPEN-G ön-komplekslere eklenmiştir. 2 mg AIBN başlatıcısını içeren PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs, baskılanmamış NIP-AuNPs ve AuNPs'i içermeyen hazırlanan polimer karışımın çözeltileri (10 µL) daha önceden etil alkol ile temizlenmiş ardından N₂ ile kurutulmuş, SPR çip yüzeylerine damlatıldı. Daha sonra SPR çipleri UV ışığı altında 1 saat süresince polimerleşmek üzere bekletildi. Hazırlanan metanol:asetik asit karışımı (80:20, v/v%) kalıp molekül PEN-G yi uzaklaştırmak için kullanıldı. Bu amaçla PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs nanosensör 20 mL desorpsiyon çözeltisine konularak çalkalamalı banyoda kalıp molekülün uzaklaşması sağlandı. Desorpsiyon çözeltisi PEN-G molekülü 291 nm de UV-VIS spektrofotometrede absorbans vermeyinceye kadar uygulandı. Baskılanmamış NIP-AuNPs SPR nanosensörün hazırlanması için, MIP-AuNPs SPR nanosensörün hazırlandığı prosedürün aynısı PEN-G eklenmeden uygulandı. AuNPs'in eklenmediği PEN-G baskılanmış MIP nanosensör aynı şekilde MIP-AuNPs SPR nanosensörün hazırlandığı prosedürle AuNPs eklenmeden hazırlandı. Çizelge 3.1 PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs'in, baskılanmamış NIP- AuNPs'in ve AuNPs eklenmeden hazırlanan MIP SPR nanosensörün hazırlanma reçetelerini özetlemektedir.

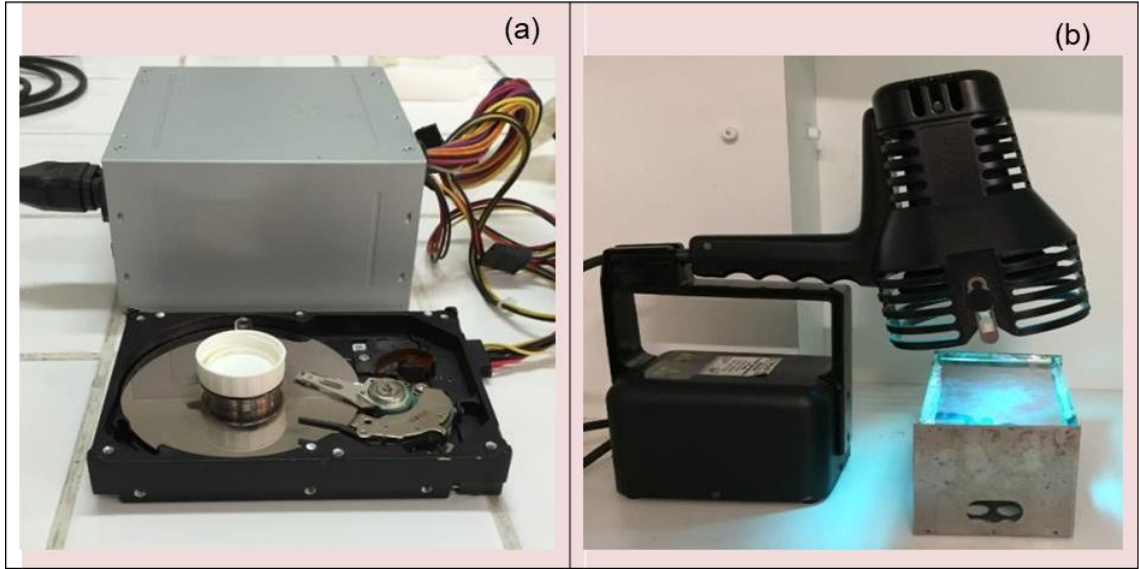
Çizelge 3.1. PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs, baskılanmamış NIP-AuNPs ve AuNPs'siz MIP SPR nanosensörlerin hazırlanma reçeteleri.

MIP-AuNPs	NIP-AuNPs	MIP
0.01 mmol PEN-G	0.01 mmol MAC	0.01 mmol PEN-G
0.01 mmol MAC	0.01 nmol AuNPs	0.01 mmol MAC
0.01 nmol AuNPs	0.01 mmol HEMA	0.01 mmol HEMA
0.01 mmol HEMA	0.04 mmol EDMA	0.04 mmol EDMA
0.04 mmol EDMA		

Şekil 3.2. nanofilm oluşturmak üzere çiplerin yüzeyine polimer oluşturmak üzere hazırlanan karışımın damlatılmasını şematize etmektedir. Şekil 3.3. nanosensör hazırlanırken çip yüzeyinde nanofilm oluşturulmasında kullanılan sistemi göstermektedir.



Şekil 3.2. SPR Nanosensör yüzeyinde film oluşturulmasının şematize edilmesi [170].



Şekil 3.3. MIP-AuNPs, NIP-AuNPs ve MIP SPR nanosensörlerin hazırlanmasında kullanılan sistem a) spin kaplayıcı b) UV lamba.

3.5. PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs, baskılanmamış NIP-AuNPs ve AuNPs'i içermeyen MIP SPR nanosensörlerin karakterizasyonu

PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs, ve baskılanmamış NIP-AuNPs SPR nanosensörler hazırlanırken sinyal artırıcı olarak ortama eklenen AuNPs'in karakterizasyonu zeta boyut analizörü ile yapıldı. Sentezlenen MIP-AuNPs in boyut analizi için Nano Zetasizer (NanoS, Malvern Instruments, Londra, İngiltere) cihazı kullanılmıştır. Analizde kullanılan deiyonize suyun yoğunluğu; 0.88 mPa.s olup kırılma indis değeri ise 1.33 olarak uygulanmıştır. Zeta boyut analizi için 90° lik geliş açısında ışık saçılması sinyallerinin tayini gerçekleştirilerek partikül sayısı tayin edilmiştir. Bu amaçla sentezlenen nanopartiküllerin çözeltisi boyut analizörünün örnek haznesine yerleştirilerek zeta boyut analizi ölçümleri yapılmıştır. Işık saçılma sinyalleri ölçümü partikül sayısının hesaplanmasında kullanılmış olup ölçümler üç kez tekrarlanmıştır. Şekil 3.4 Zeta boyut analizörünün resmini göstermektedir.



Şekil 3.4. AuNPs'nin boyut analizinin yapılması amacıyla kullanılan zeta boyut analizör cihazı.

PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs ve baskılanmamış NIP-AuNPs SPR nanosensörleri oluşturan poli(2-Hidroksietil metakrilat-N-metakroil-(L)-sistein metil ester-altın nanopartiküller-N-metakroil-(L)-fenilalanin metil ester nanofilmleri oluşturan MAC- AuNPs ve MAPAPEN-G ön-kompleksler FTIR-ATR spektrometresi (Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS10, Waltham, MA, ABD) ile karakterize edilmiştir. Analizden önce polimer örnekleri vakum etüvünde 24 saat kurutulmuştur. FTIR-ATR spektrumlarının elde edilmesi amacı ile %1 lik örnek içeren karışım (99 mg KBr + 1 mg örnek) havanda dövülerek, hidrolik preste 600 kg/cm basınçta 10 dakika bekletilmiş ve ince bir tablet haline getirilmiştir. Hazırlanan tabletin spektrumu 4600-400 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında taranmıştır.

3.6. Hazırlanan PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs ve baskılanmamış NIP-AuNPs SPR nanosensörlerin karakterizasyonu

3.6.1. Atomik kuvvet mikroskobu analizi (AFM)

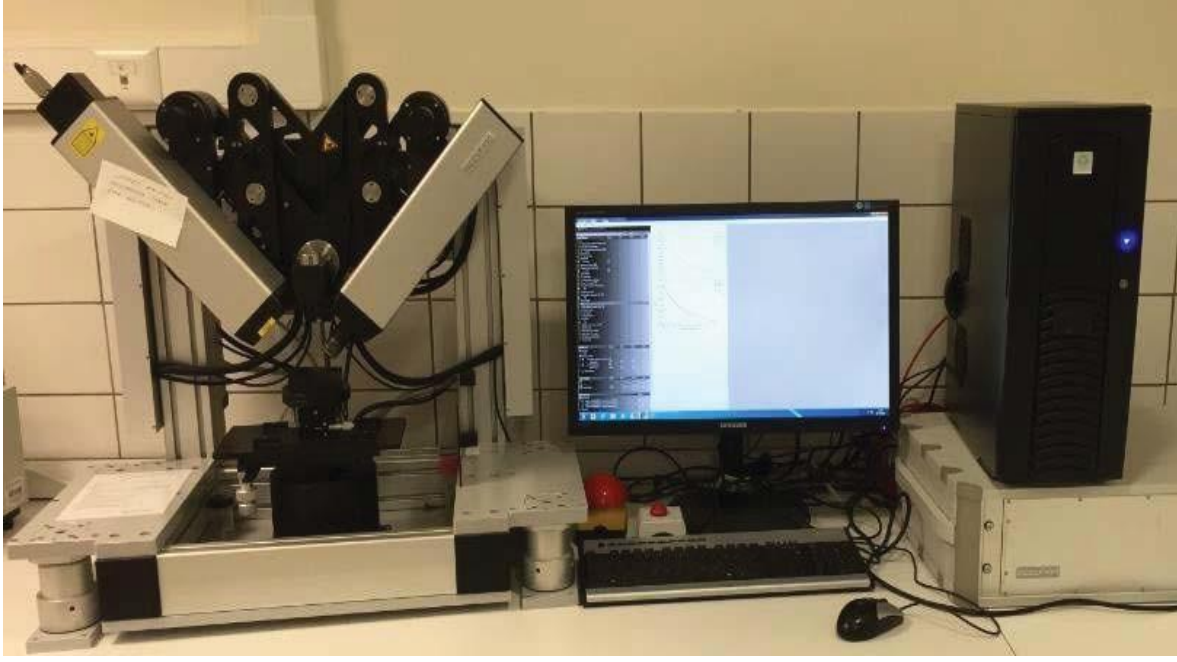
Yüzey plazmon rezonans nanosensörlerin yüzeyi, serbest kantileverli interferometre özelliği ile 4096 x 4096 piksel çözünürlükte ölçüm yapabilen atomik kuvvet mikroskobu (Veeco MultiMode V, USA) ile karakterize edilmiştir. PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs ve baskılanmamış NIP-AuNPs SPR nanosensörlerin yüzey morfolojisinin karakterizasyonu için atomik kuvvet mikroskobunun yarı degen mod özelliği kullanılmıştır. 5 x 5 µm' lik bir bölgenin görüntüsü 2 µm/s tarama hızı kullanılarak, 256 x 256 piksel çözünürlükte alınmış olup, ölçümler için salınım rezonans frekansı 315 kHz, titreşim genliği 1 VRMS, boş titreşim genliği 2 VRMS olacak şekilde ayarlanmıştır. PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs ve baskılanmamış NIP-AuNPs SPR nanosensörlerin yüzey karakterizasyonu için kullanılan Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) cihazının görüntüsü Şekil 3.5 te gösterilmiştir.



Şekil 3.5. PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs ve baskılanmamış NIP-AuNPs SPR nanosensörlerin yüzey karakterizasyonu için kullanılan Atomik Kuvvet Mikroskobu cihazının görüntüsü.

3.6.2. Elipsometre ölçümleri

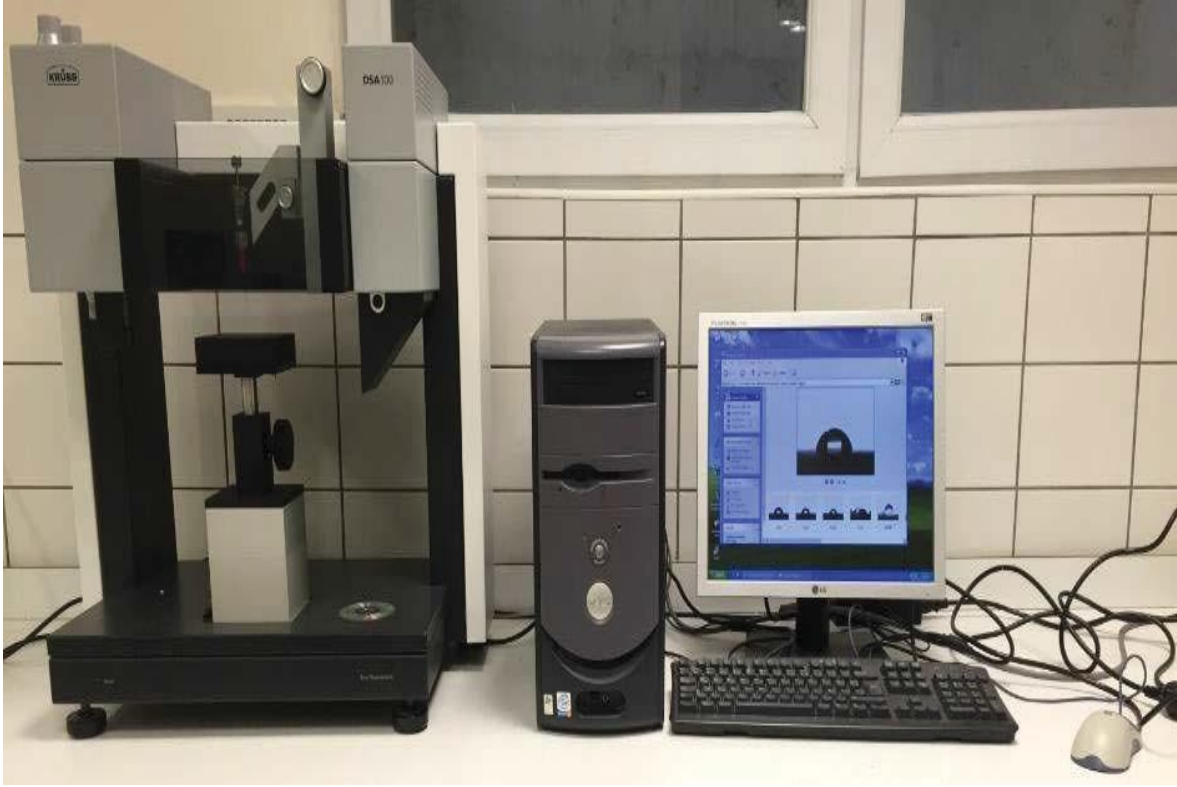
PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs ve baskılanmamış NIP-AuNPs SPR nanosensörlerin yüzeyini oluşturan nanofilmlerin kalınlığını ölçmek için EP3-Nulling Elipsometre (Göttingen, Almanya) cihazı kullanılmıştır. Kalınlık ölçümleri için geliş açısı 62° ve dalga boyu 532 nm olarak ayarlanmıştır. SPR nanosensörlerin kalınlığını ölçmek için lazer ışık kaynağı kullanılmış olup, yüzey kalınlığının hesaplamasını sağlayan programda BK7 + 50 nm altın + 70 nm polimer katmanı verisi sisteme tanımlanmıştır. Kalınlığı belirlemek için sensör yüzeyindeki 6 farklı noktadan 3 tekrarlı ölçümler gerçekleştirilmiştir. Elde edilen değerlerin ortalaması hesaplanarak kalınlık değerleri rapor edilmiştir. Şekil 3.6 poli(2-Hidroksietil metakrilat-N-metakroil-(L)-sistein metil ester-altın nanopartiküller-N-metakroil-(L)-fenilalanin metil ester nanofilmlerin kalınlığını ölçen cihazı göstermektedir.



Şekil 3.6. PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs ve baskılanmamış NIP-AuNPs SPR nanosensörlerin yüzeyinde bulunan nanofilmlerin kalınlığını ölçmede kullanılan Elipsometre cihazının görüntüsü.

3.6.3. Temas açısı ölçümleri

PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs ve baskılanmamış NIP-AuNPs SPR nanosensörlerin hidrofilitelerini belirlemek amacı ile ıslanabilirliği ölçen temas açısı değerleri KRÜSS DSA100 (Hamburg, Almanya) cihazı kullanılarak elde edilmiştir. Bu amaçla yapışık damla metodu kullanılarak temas açısı belirlenmiş olup, yüzey plazmon rezonans nanosensörlerin ıslanabilirliği yüzeylerine 1 damla su damlatılarak ölçülmüştür. 10 farklı bölgeye su damlatılarak, her bölgedeki görüntüler alınmış ve farklı temas açıları saptanmıştır. Saptanan temas açısı ölçümleri için nanosensör yüzeyi ile damlacığın sol temas noktasından alınan temas açısı ve sağ temas noktasından alınan temas açısı değerleri baz alınmıştır. Belirlenen sağ temas açısı ve sol temas açısı noktalarının verdiği temas açılarının ortalaması alınarak, ortalama temas açısı sonuçları tespit edilmiştir. Nanosensörlerin yüzeyinde bulunan nanofilmlerin su damlası ile temasından elde edilen temas açısı ölçümlerinin gerçekleştirildiği cihaz Şekil 3.7 da gösterilmektedir.



Şekil 3.7. PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs ve baskılanmamış NIP-AuNPs SPR nanosensörlerin yüzeyinde bulunan nanofilmlerin temas açısı ölçümlerinin gerçekleştirildiği cihaz.

3.7. PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs ve baskılanmamış NIP AuNPs nanosensörler ile kinetik analizler

PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs ve baskılanmamış NIP-AuNPs SPR nanosensörlerin kinetik analiz çalışmalarından elde edilen yüzey plazmon eğrilerini görüntülemek için SPRimager II (GWC Technologies, WI, USA) cihazı kullanılmıştır. MIP-AuNPs ve NIP-AuNPs nanosensörlerin hazırlanmasında kullanılan SPR çipler (SPR-1000-050 SPR CHIP GWC) Genoptics, Orsay, Fransa firmasından satın alma yoluyla temin edilmiştir. 50 nm kalınlıkta altın kaplamadan oluşan SPR çiplerin, yüzey alanı 25.0x12.5 mm dir. Işığın % kırılma değerlerini elde etmek için görüntü alınırken nanosensörlere ulaşma açısı değiştirilmiştir (48.7-56.7°). Işığın geliş açısına karşı elde edilen % kırılma miktarı ve eğimi grafiğe geçirilerek rapor edilmiştir.

PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs, baskılanmamış NIP-AuNPs ve AuNPs'ler eklenmeden hazırlanan nanosensörlerin kinetik çalışmaları farklı konsantrasyonlardaki PEN-G çözeltileri ile gerçekleştirilmiştir. 10 mM pH 4.0 asetat tamponu içerisinde hazırlanan sekiz farklı derişimdeki (0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5 ppb) örnek çözeltileri kinetik analizler için cihazın örnek kısmına sırasıyla verilerek adsorpsiyon- desorpsiyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.8 PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs, baskılanmamış NIP-AuNPs ve AuNPs'ler eklenmeden hazırlanan SPR nanosensörlerin kinetik analizlerinin gerçekleştiği SPR ölçüm cihazını ve SPRimager II sistemini göstermektedir. Sistemin ana elemanlarını, lazer kaynağı, ayna sistemi, kamera, peristaltik pompa ve yazılım programını içeren bilgisayar oluşturmaktadır. Kinetik analizleri incelemek üzere; PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs, baskılanmamış NIP-AuNPs ve AuNPs eklenmeden hazırlanan SPR nanosensörlerin yüzeyi deiyonize su ile yıkandıktan sonra SPR sisteminden fosfat tamponu geçirilerek, yüzey plazmon eğrileri ölçülmüş ve rezonans kırılma açısı tespit edilmiştir. Tespit edilen kırılma açısı, çalışma açısı olarak belirlenmiş olup, bu açiya ayarlanan cihaz ile kinetik analizler gerçekleştirilmiştir. Kinetik analizler için kinetik görüntüleme programını içeren SPRview yazılımı kullanılmıştır. Kullanılan program dakikada yaklaşık 150 ölçüm yaparak % kırılma miktarının değişimini anlık olarak tespit edebilmektedir. Rezonans kırılma açısı belirlendikten sonra, belirlenen rezonans açısına ayarlanan SPR sisteminden 10 dakika süre ile 10 mM pH 4.0 asetat tamponu geçirilmeye devam edilmiştir. Sistem dengeye ulaştıktan 50 saniye sonra farklı konsantrasyonlarda hazırlanan PEN-G çözeltileri sırasıyla 0.2 mL/dk akış hızında SPR sistemine peristaltik pompa kullanılarak verilmiştir. Rezonans frekansındaki gözlenen kayma değerleri anlık olarak rapor edilmiş olup, sinyaller dengeye ulaştıktan sonra sisteme desorpsiyon çözeltisi olarak metanol:asetik asit çözeltisi (80:20, v/v%) uygulanmış ve kinetik analiz işlemi tamamlanmıştır. Desorpsiyon işleminin tamamlanmasından sonra dengeye gelmesi için sistemden tekrar deiyonize su ve ardından 10 mM pH 4.0 asetat tamponu geçirilmiştir. SPR sistemi dengeye ulaştıktan sonra, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan PEN-G çözeltilerinin kinetik çalışmaları aynı yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.8. PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs, baskılanmamış NIP-AuNPs ve AuNPs'ler eklenmeden hazırlanan SPR nanosensörlerin kinetik analizlerinin yapıldığı SPR ölçüm cihazının görüntüsü.

3.7.1. Yarışmalı kinetik analizler

PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs SPR nanosensörün PEN-G antibiyotiğine olan seçiciliğini göstermek için 10 mM pH 4.0 asetat tamponu ile ayrı ayrı hazırlanan 0.25 ppb konsantrasyonundaki AMX ve AMP çözeltileri SPR sistemine ayrı ayrı verilerek adsorpsiyon çalışmaları incelenmiştir. Yarışmalı analizler için kinetik analizlerde uygulanan aynı yöntem izlenmiş olup; sırası ile rezonans frekansının belirlenmesi, adsorpsiyon ve desorpsiyon çalışmalarının gerçekleştirilmesi işlemleri takip edilmiştir.

3.8. Baskılama etkinliğini belirleme çalışmaları

Çalışma kapsamında su örneklerindeki PEN-G'nin düşük maliyetli hassas ve seçici tespiti için SPR temelli etkin tayin yöntemi geliştirildi. Bu amaçla sistein aminoasidini içeren MAC monomeri sülfür grubu sağlayıcısı olarak kullanılırken, fonksiyonel MAPA monomeri

hidrofobik grup sağlayıcısı olarak kullanılmıştır. Amino asit temelli tekrar kullanılabilir MIP-AuNPs SPR nanosensörün PEN-G yi ppb konsantrasyon düzeyinde tayin edebildiği görülmektedir. Tanıma elemanı olarak görev yapan MIPs şekil ve büyüklük bakımından kalıp moleküle benzeyen baskılanmış bölgeleri oluşturmak için kullanılır. Baskılanmış bu bölgeler hedef molekülü seçici tanıyarak tekrar bağlanma ve etkinliği artırmada görev alırlar [77]. PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs SPR nanosensörün baskılama seçiciliğini belirlemek için, PEN-G baskılanmamış NIP-AuNPs, MIP-AuNPs SPR nanosensör ile aynı koşullarda hazırlanmıştır. Bu kapsamda hazırlanan 0.25 ppb derişimdeki PEN-G çözeltisi MIP- AuNPs SPR ve NIP-AuNPs SPR nanosensör sistemine aynı koşullarda uygulanarak kinetik analizler gerçekleştirilmiş ve baskılama seçiciliği belirlenmiştir. Ayrıca PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs SPR ve baskılanmamış NIP-AuNPs SPR nanosensörlerin PEN-G çözeltisi için çakıştırılmış plazmon grafiği oluşturulmuştur. Denklem 3.3 AMX ve AMP için dağılıma ve seçicilik katsayısını hesaplamada kullanılan denklemini göstermektedir;

$$K_d = [(C_i - C_e) / C_e] \times V / m \quad (3.3)$$

Seçicilik katsayısının (k) hesaplanması Denklem 3.4 de gösterilmektedir.

$$k = K_{d \text{ template}} / K_{d \text{ nontemplate}} \quad (3.4)$$

Bağıl seçicilik katsayısı (k') nın hesaplanması ise Denklem 3.5 de gösterilmektedir.

$$k' = k_{MIP} / k_{NIP} \quad (3.5)$$

Baskılamanın etkinliği ise baskılama faktörünün (I.F) Denklem 3.6'ya göre hesaplanması ile tespit edilmiştir.

$$I.F' = J_{MIP} / J_{NIP} \quad (3.6)$$

3.9. Tekrar kullanılabilirlik çalışmaları ve istatistiksel analizleri

PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs SPR nanosensörün tekrar kullanılabilirliğini incelenmek amacıyla 0.25 ppb derişiminde PEN-G içeren çözeltiler SPR nanosensör sistemine uygulanmıştır. SPR nanosensör sistemi uygun rezonans frekansına ayarlandıktan sonra 10 mM pH 4.0 asetat tamponu ile dengeye getirilmiştir. SPR nanosensör sistemi dengeye geldikten sonra hazırlanan PEN-G çözeltisi sisteme uygulanarak rezonans kayma değerleri anlık olarak gözlenmiştir. Sistem tekrar dengeye ulaşınca desorpsiyon çözeltisi geçirilerek bağlanan PEN-G desorbe olarak ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Bu işlemler sistemde gün içinde 3 kez 5 tekrarlı gerçekleştirilmiş olup sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs SPR nanosensörün gün içi tekrarlanabilirlik çalışmalarının istatistiksel değerlendirilmesi gerçekleştirilmiş ve tekrarlanabilirliği gösteren kesinlik değerleri yüzde bağıl standart sapma (%RSD) olarak hesaplanmıştır.

3.10. Sinyal artırımına AuNPs' nin etkisi

İletken monomerler, Grafen, karbon nanotüpler (CNTs), AuNPs ve diğerleri yüzey plazmon rezonans sinyal yanıtını artırmada yaygın olarak kullanılmaktadır. Çalışma kapsamında PEN-G'nin tayininde sinyal yanıt artırıcı olarak ve AuNPs ler kullanılmıştır. Kontrol deneyi olarak, AuNPs'in sensitiviteyi artırıcı etkisi AuNPs eklenmeden hazırlanan MIP SPR nanosensörün PEN-G tayininde kullanılmasıyla tespit edilmiştir. Çalışma kapsamında aminoasit bazlı monomerler ve AuNPs ile moleküler baskılama tekniği kullanılarak PEN-G'nin seçici tayini için yeni MIP-AuNPs SPR nanosensör geliştirilmiştir. 0.5 ppb PEN-G çözeltileri MIP-AuNPs ve MIP SPR nanosensörlere sırası ile uygulanarak kinetik analizler gerçekleştirilmiş sonuçlar AuNPs'in sinyal artırıcı etkisini tespit etmek amacı ile değerlendirilmiştir.

3.11. Süt örneklerindeki PEN-G nin için kinetik analizler

Sütün ana üreticisi olan süt inekleri enfeksiyon hastalıkları açısından risk altında olduklarından antibiyotik kullanımı şarttır. İstatistiklere ve son araştırmalara göre, ilaçların yanlış kullanılması, sütte ilaç kalıntılarının varlığının ana kaynağıdır [78].

Sütteki ilaç kalıntısı konsantrasyonunun 1969 yılında FAO/WHO tarafından belirlenen limitin altında olması gerektiği vurgulanmaktadır. Veteriner ilaçları için maksimum kalıntı limiti birkaç kez değiştirilmiş olup sürekli olarak ortaya yeni ilaçlar çıkmaktadır. Süt ve süt ürünleri halk arasında sağlıklı ve kapsamlı bir besin maddesi olarak kabul edildiğinden, bu mevcut durumlara göre girişimlerde bulunulması önemlidir [79].

Matriks etkisini incelemek için, gıda örneği olarak, süt içerisindeki PEN-G' nin MIP- AuNPs SPR nanosensör ile tayini gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla lokal marketten alınan süt örneğine, belli konsantrasyondaki PEN-G spike edilerek PEN-G baskılanmış MIP- AuNPs SPR nanosensör sistemine uygulanmış ve kinetik analizler gerçekleştirilmiştir. Ancak sisteme uygulanmadan önce bilinen bir PEN G konsantrasyonuna sahip inek sütü numunesine numune ön-işleme işlemi uygulandı. Bu amaçla sütü deproteinize etmek için sürekli karıştırarak asetonitril ilave edildi [80]. Ortaya çıkan karışımı filtrelemek için bir filtre kağıdı (Whatman, 125 mm) kullanıldı ve süpernatant geri kazanıldı. Süpernatant, herhangi bir asılı kalmış maddeyi uzaklaştırmak için için MSE 869-Minor santrifüj kullanılarak 30 dakika boyunca 10.000 rpm'de santrifüjlendi. Hazırlanan SPR nanosensör, PEN-G'yi süt numunesinde bulunan diğer moleküllerden yüksek spesifiklik ve submikromolar hassasiyetle tayin etmek için kullanıldı. Uygulanan yöntem, PEN-G miktarının 5 ppb konsantrasyon değerinde olduğu süt numunesindeki PEN-G seviyesini izlemek için kullanıldı.

3.12. PEN-G tayini için validasyon çalışmaları

PEN-G molekülünün süt örneklerindeki MIP-AuNPs SPR nanosensör ile tayini HPLC sistemi ile doğrulandı. 1, 6.25, 12.5, 25 ppb konsantrasyonundaki PEN-G çözeltileri kalibrasyon eğrisinin oluşturulmasında kullanıldı. PEN-G'nin her bir farklı konsantrasyondaki çözeltisi, 10 mM amonyum asetat:asetonitril (75:25, v/v%) içinde 1 mgmL⁻¹ konsantrasyonundaki stok PEN-G çözeltisinden hazırlandı.

PEN-G antibiyotiğini içeren süt örneği, PEN-G antibiyotiğinin marketten alınmış süte eklenmesiyle (5 ppb) hazırlandı ve hazırlanan örnek ters faz bir C18 kolonu ile HPLC sisteminde 220 nm de izokratik elüsyon sistemi ile analiz edildi. Mobil faz, 10 mM amonyum asetat ve asetonitril solüsyonunun (75:25, h/h %) bir karışımıydı.

4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Altın nanopartiküllerin (AuNPs) sentezi ve karakterizasyonu

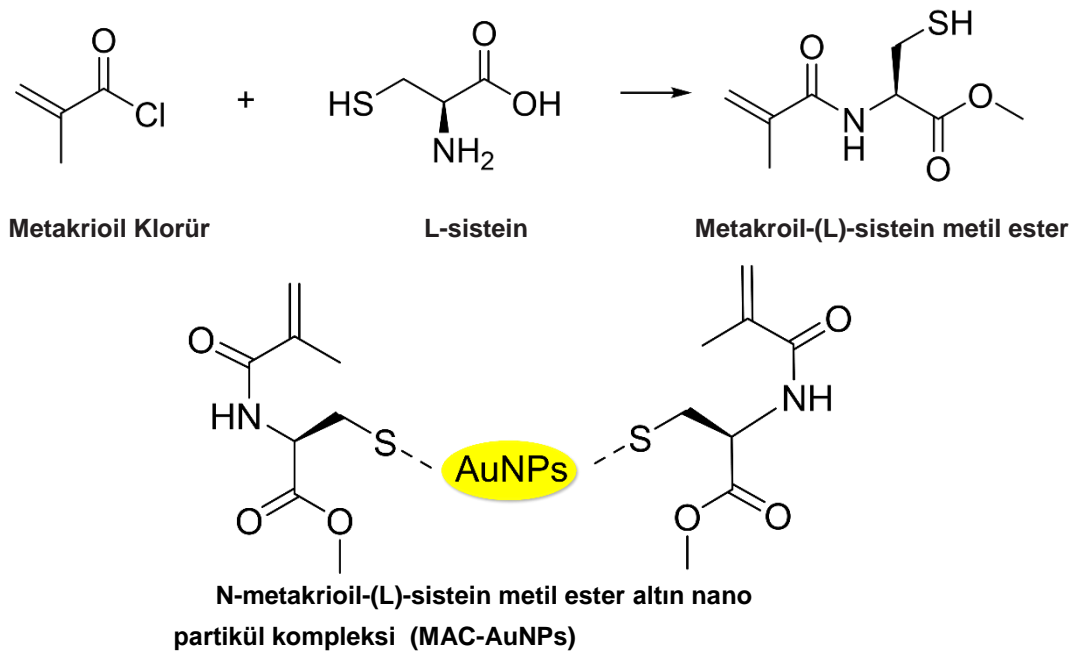
Sinyal artırıcı olarak kullanılan AuNPs'in konsantrasyonunu belirlemek amacı ile öncelikle AuNPs'in boyut dağılımının analizi Nano Zetasizer boyut analizörü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.2 AuNPs'in zeta boyut analizörü ile boyut ölçümünü göstermektedir. Şekilde görüldüğü üzere düşük polidispersite indeks değerinden (PDI=0.116), homojen bir ortalama boyut dağılımına sahip monodispers AuNPs'in elde edildiği ve farklı boyutlardaki partiküllerin olmaması nedeniyle sistemde agregasyonun görülmediği tespit edilmiştir. AuNPs'in ortalama boyutu üç kez (n=3) tekrarlanan ölçümler sonucunda 23.88 nm olarak belirlendi. AuNPs'in konsantrasyonu, zeta boyut analizi ile belirlenen AuNPs'in ortalama boyutu kullanılarak $3,3 \times 10^{-7}$ M olarak hesaplandı.

4.2. MAC-AuNPs ve MAPAPEN-G ön-komplekslerin karakterizasyonu

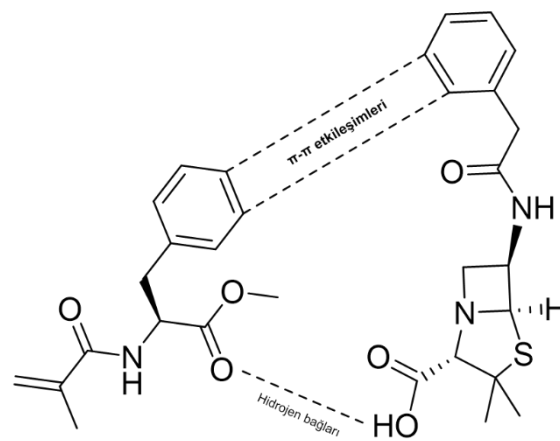
Plazmonik sinyalde artışa neden olarak sensitiviteyi artırmak amacı ile kullanılan AuNPs MAC monomeri ile etkileşime sokularak MAC-AuNPs ön-kompleks oluşturulmuştur. Şekil 4.3.A, UV-VIS spektrofotometre kullanılarak AuNPs ve MAC monomer arasındaki kompleks oluşumunu göstermektedir. MAC-AuNPs'in ön kompleksinin spektrofotometrik ölçümleri incelendiğinde, AuNPs ile MAC monomerin kompleksleşmesi dalga boyu kayması ile doğrulanmaktadır. Aynı şekilde fonksiyonel MAPA monomeri ve kalıp PEN-G molekülünün kompleksleşmesi, Şekil 4.3.B de görüldüğü üzere, UV-VIS spektrofotometre kullanılarak doğrulanmıştır. AuNPs ile MAC monomerin kompleksleşmesi ve MAPA monomeri ile kalıp PEN-G molekülünün kompleksleşmesi şekil 4.1.A. ve şekil 4.1.B. de sırası ile gösterilmiştir.

MAC monomeri ile AuNPs'in kompleksleşerek MAC-AuNPs ön-kompleks oluşturması FTIR-ATR spektroskopisi ile doğrulanmıştır. MAC monomerinin amid I ve amid II bantlarına ait karakteristik titreşim bantları sırasıyla 1452 cm^{-1} ve 1523 cm^{-1} 'de görülürken, -OH grubuna ait bant ise 3347 cm^{-1} 'de gözlenmektedir. Karboksilik asite ait (C=O) gerilme bandı 1726 cm^{-1} 'de iken -SH grubuna ait gerilme bandı 2867 cm^{-1} 'de görülmektedir. MAC-AuNPs ön kompleksine ait spektrumda -SH bağı gerilme bantlarının

olmaması, AuNPs'in MAC monomerindeki sistein grubu ile koordinasyon yaptığını göstermektedir. Şekil 4.4, MAC monomeri ve MAC-AuNPs ön-komplekse ait FTIR-ATR spektrumunu gösterirken, oluşturulan MAC-AuNPs ön kompleksi, MIP-AuNPs nanosensörünün polimerik yapısına başarıyla dahil edildi. MAPA monomerinin ve MAPAPEN-G ön-kompleksinin FTIR-ATR spektrumunu göstermektedir.

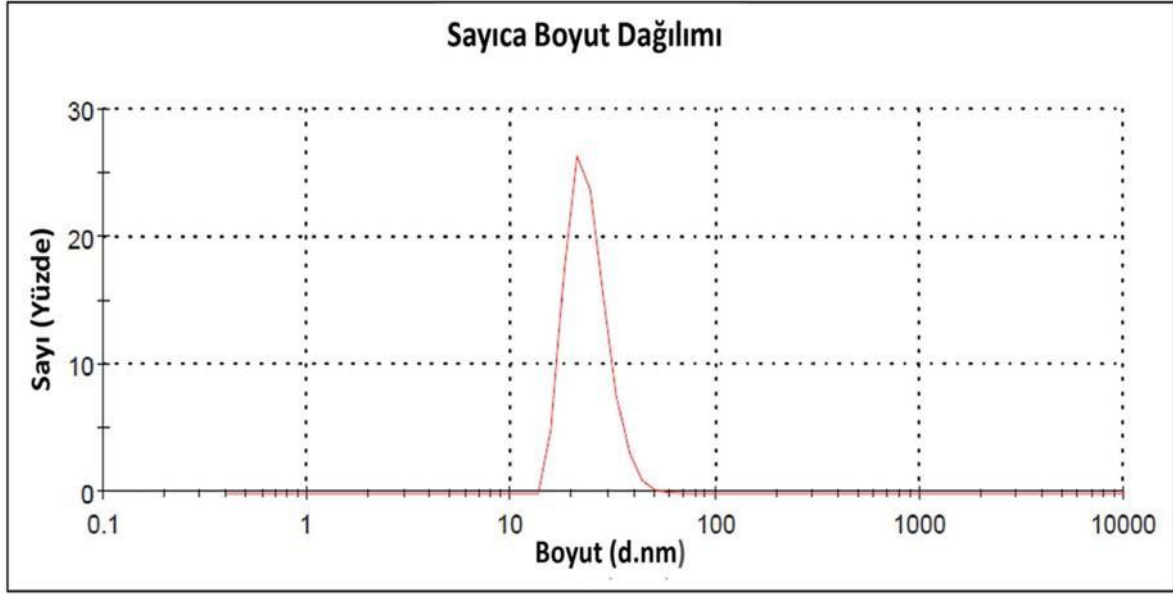


(a)

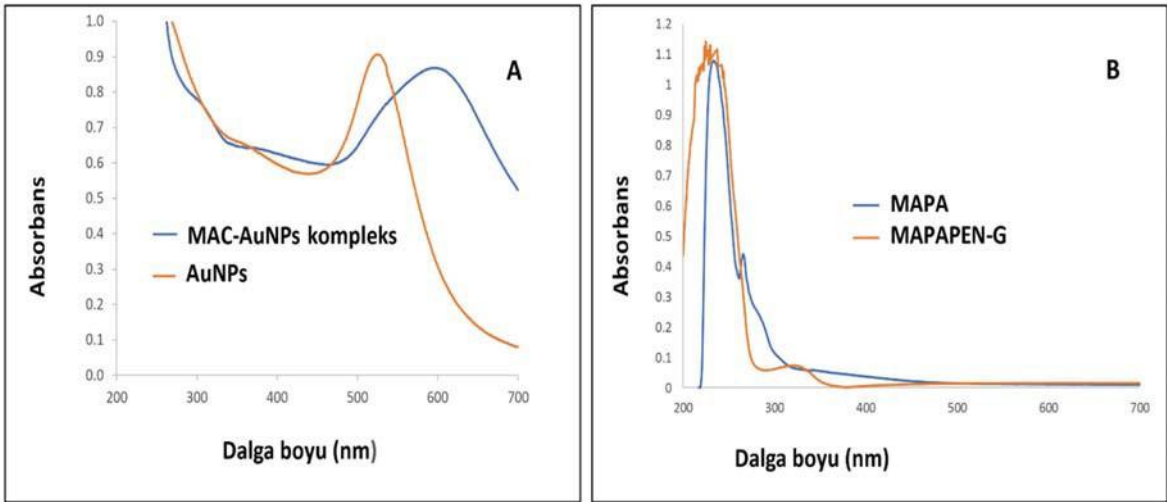


(b)

Şekil 4.1. a. MAC-AuNPs ön-kompleksinin moleküler formülü. b. MAPAPEN-G ön-kompleksinin moleküler formülü.

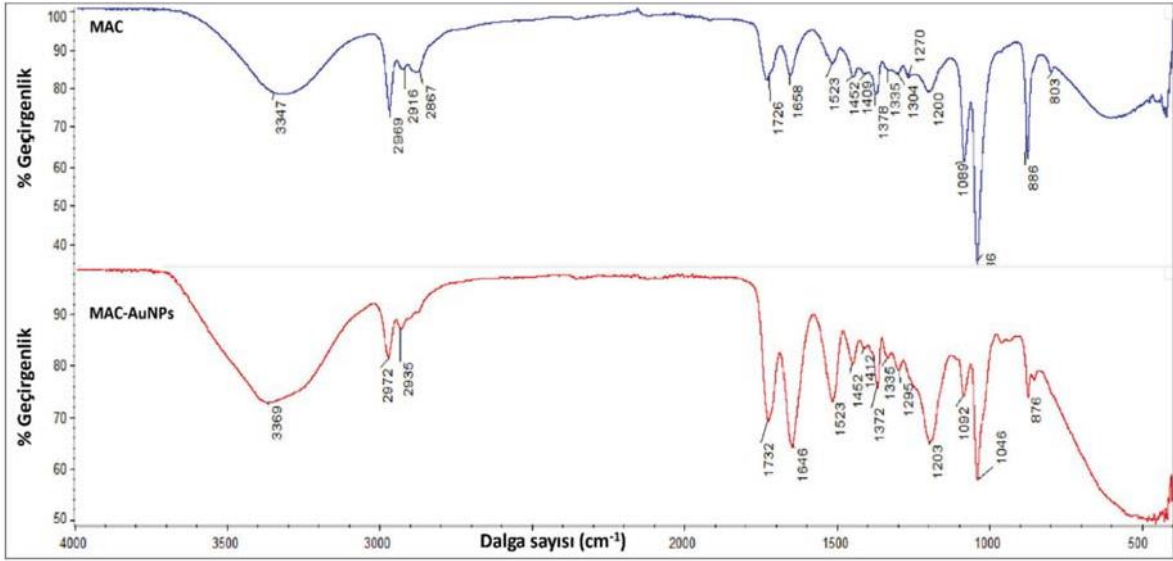


Şekil 4.2. AuNPs'in zeta boyut analizörü ile boyut ölçümü.

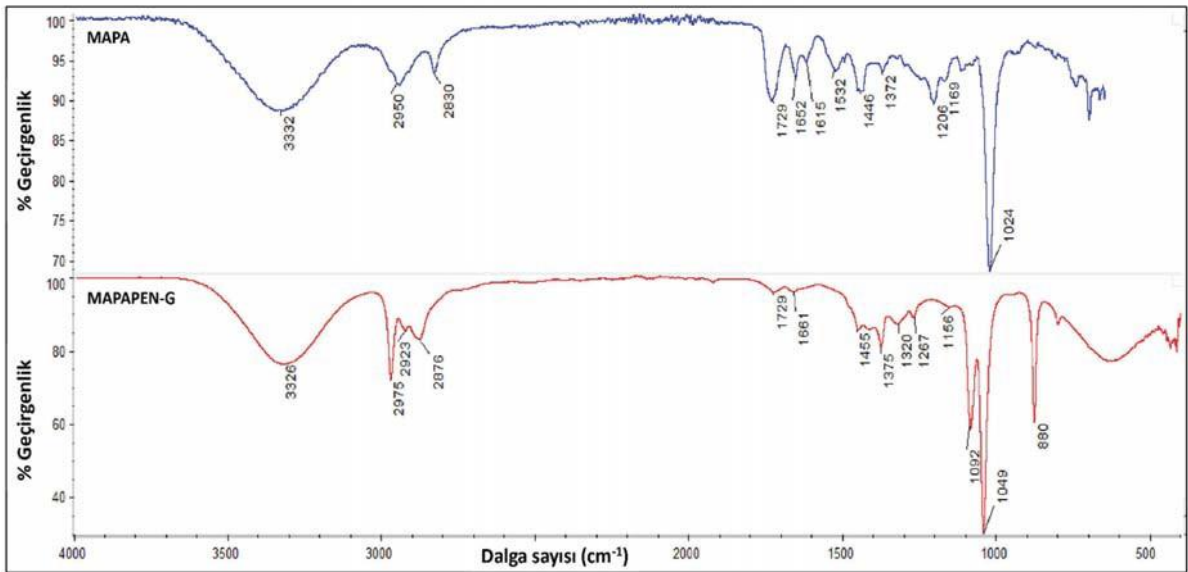


Şekil 4.3. A) AuNPs'in ve MAC-AuNPs ön-kompleksin spektrofotometrik ölçümü.

B) MAPA monomerin ve MAPAPEN-G ön-kompleksin spektrofotometrik ölçümü.



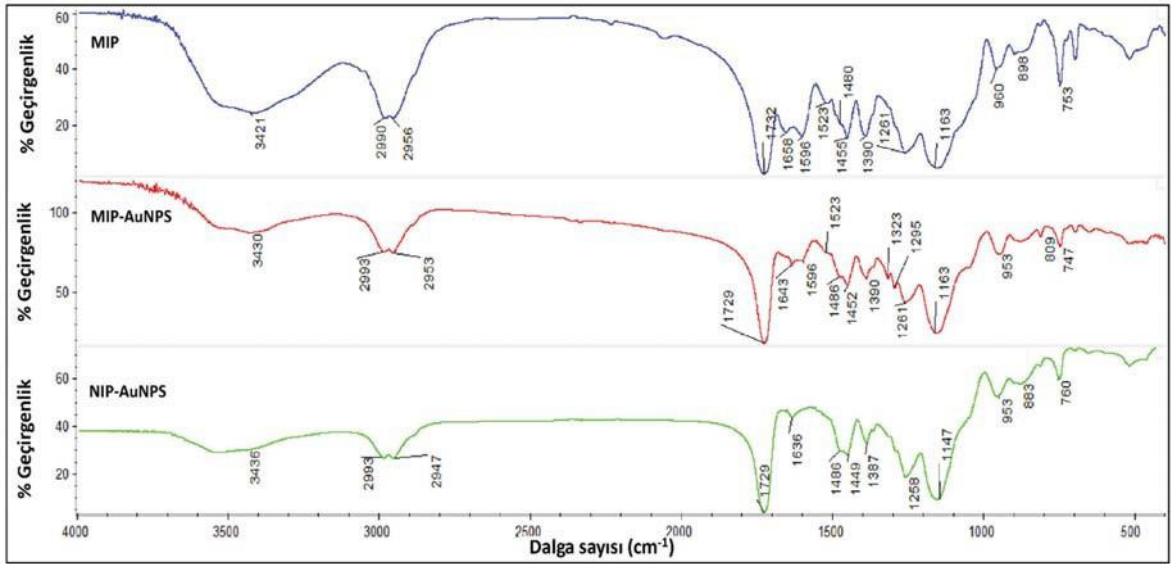
Şekil 4.4. MAC monomeri ve MAC-AuNPs ön-komplekse ait FTIR-ATR spektrumu.



Şekil 4.5. MAPA monomeri ve MAPAPEN-G ön-komplekse ait FTIR-ATR spektrumu.

4.3. MIP-AuNPs, MIP ve NIP-AuNPs SPR nanosensörlerin karakterizasyonu

PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs nanosensörün, yüzey plazmon rezonans sinyal yanıtını arttırmak amacıyla eklenen AuNPs'in etkisini incelemek için AuNPs eklenmeden hazırlanan MIP nanosensörün ve baskılama verimliliğini incelemek amacı ile, baskılanmamış NIP-AuNPs nanosensörün karakterizasyonu işlemi sırasında ile FTIR-ATR spektrofotometre, atomik kuvvet mikroskobu (AFM), elipsometre ve temas açısı ölçümleriyle sağlanmıştır. Öncelikle MIP, MIP-AuNPs ve NIP-AuNPs SPR nanosensörlerin yüzeyindeki nanofilmlerin yapı tayini FTIR-ATR spektrofotometresi ile gerçekleştirilmiştir. MIP, MIP-AuNPs ve NIP-AuNPs SPR nanosensörlerinin FTIR-ATR spektrumu karşılaştırıldığında, polimerik yapıya PEN-G molekülü ve AuNPs girdiği tespit edilmiştir. Hazırlanan MAC-AuNPs ön-kompleksinin, MIP-AuNPs nanosensörünün polimerik yapısına başarıyla dahil olduğu FTIR-ATR spektrumu ile doğrulanmıştır. Şekil 4.6 FTIR-ATR spektrumu incelendiğinde 1643 cm^{-1} ve 1596 cm^{-1} dalga sayılarında görülen amid I ve amid II bantları PEN-G molekülünün yapıya entegre olduğunu göstermektedir. MIP-AuNPs, MIP ve NIP-AuNPs SPR nanosensörlere ait FTIR-ATR spektrumu Şekil 4.6 da görülmektedir.

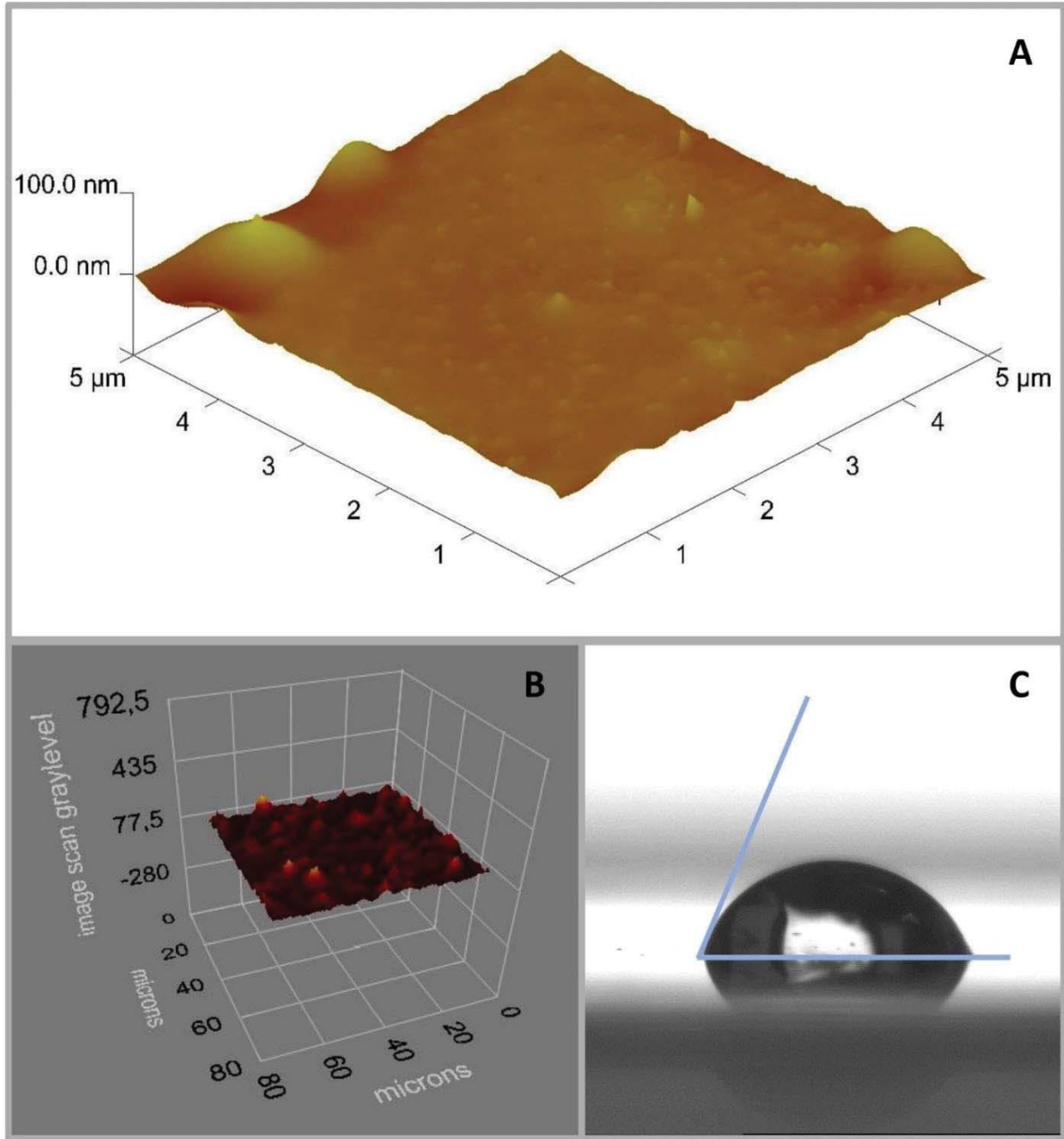


Şekil 4.6. MIP-AuNPs, MIP ve NIP-AuNPs SPR nanosensörlere ait FTIR-ATR spektrumu.

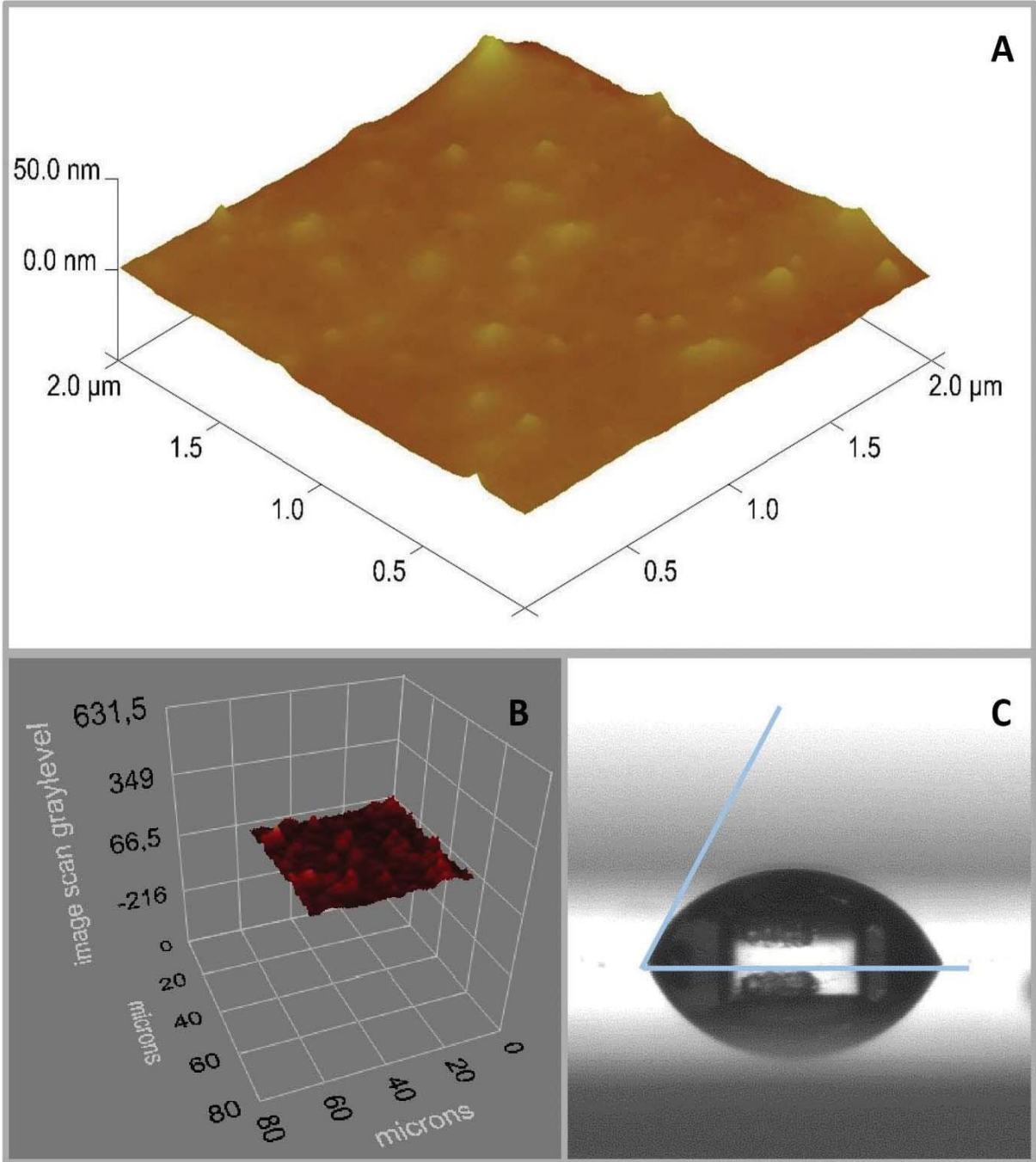
MIP-AuNPs ve NIP-AuNPs SPR nanosensörlerin yüzey morfolojisi yarı değen modda atomik kuvvet mikroskobu ile karakterize edilmiştir. PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs nanosensörünün yüzey derinliği AFM görüntüleri ile 51.37 ± 2.46 nm olarak tespit edilirken baskılanmamış NIP-AuNPs nanosensörün yüzey derinliği 70.68 ± 1.39 nm olarak tespit edilmiştir. MIP-AuNPs ve NIP-AuNPs nanosensörlerin yüzey derinlik değerleri arasındaki fark baskılama işleminin başarıyla gerçekleştirildiğini gösterir. Öte yandan, MIP-AuNPs SPR nanosensörün ip yüzeyi boyunca görülen pürüzlülük dağılımından, PEN-G'nin SPR nanosensör ip yüzeyine homojen olarak baskılandığı anlaşılmaktadır. MIP-AuNPs ve NIP-AuNPs SPR nanosensörlerin yarı değen modda ölçülen AFM görüntüleri Şekil 4.7.A ve Şekil 4.8.A gösterilmektedir.

PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs ve baskılanmamış NIP-AuNPs SPR nanosensörlerin ortalama yüzey kalınlığı elipsometre cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Ölçümler 532 nm dalga boyunda, 62° lik bir geliş açısında gerçekleştirilmiştir. MIP-AuNPs ve NIP-AuNPs SPR nanosensörler için hesaplanan ortalama kalınlık değerleri sırası ile 77.5 ± 0.4 ve 66.5 ± 0.2 nm'dir. Şekil 4.7.B ve Şekil 4.8.B PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs ve baskılanmamış NIP-AuNPs SPR nanosensörlerin elipsometre ölçümlerini göstermektedir. Ellipsometre ölçümlerinden ortaya çıkan yüzey kalınlıklarının daha büyük olmasının muhtemel sebebi AuNPs'in zeta boyut analizinde de görüldüğü gibi boyut dağılımının 50 nm'ye kadar ıkabilmesindedir.

PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs ve baskılanmamış NIP-AuNPs SPR nanosensörlerin yüzey ıslanabilirlikleri hidrofilik özelliklerinin Krüss DSA100 (Hamburg, Almanya) temas açısı cihazı kullanılarak tespit edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Temas açısı değerleri DSA2 yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır. Çizelge 4.1'de PEN-G baskılanmış MIP- AuNPs ve baskılanmamış NIP-AuNPs SPR nanosensörlerin yüzeylerinin su temas açıları özetlenmiştir. Su temas açısı ölçümlerinden görüldüğü gibi PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs SPR nanosensör yüzeyin temas açısı değeri $76.6^\circ \pm 0.5$ olarak kaydedilirken, baskılanmamış NIP-AuNPs SPR nanosensör için su temas açısı $70.2^\circ \pm 0.7$ dir. PEN-G baskılanması sonucu temas açısının artmış olmasının sebebi moleküler baskılama ile PEN-G'nin MAPA'ya koordinasyonu sonucunda yüzeyin hidrofobikliğinin artmış omasıdır. Şekil 4.7.C ve Şekil 4.8.C PEN-G baskılanmış MIP- AuNPs ve baskılanmamış NIP- AuNPs temas açısı ölçümlerine ait görüntüleri göstermektedir.



Şekil 4.7. MIP-AuNPs nanosensorün. **A.** Atomik kuvvet mikroskop görüntüsü; **B.** Elipsometre ölçüm görüntüsü; **C.** Temas açısı ölçüm görüntüsü.



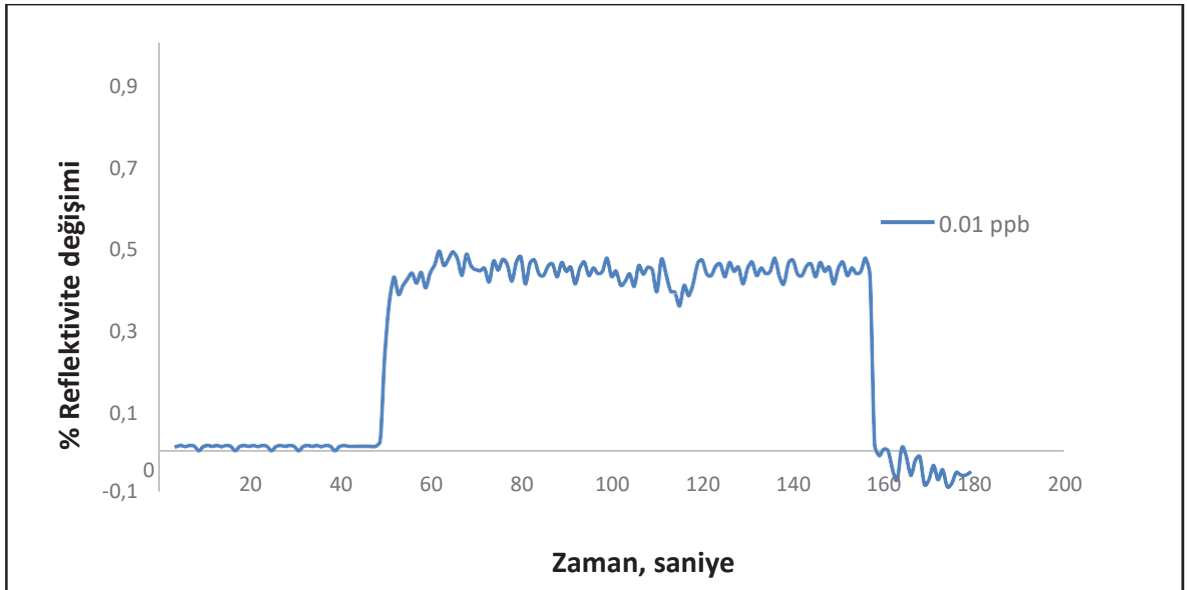
Şekil 4.8. NIP-AuNPs nanosensörün. **A.** Atomik kuvvet mikroskop görüntüsü; **B.** Elipsometre ölçüm görüntüsü; **C.** Temas açısı ölçüm görüntüsü.

Çizelge 4.1. PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs nanosensörün ve PEN-G baskılanmamış NIP-AuNPs nanosensörün yüzeylerinin su temas açıları.

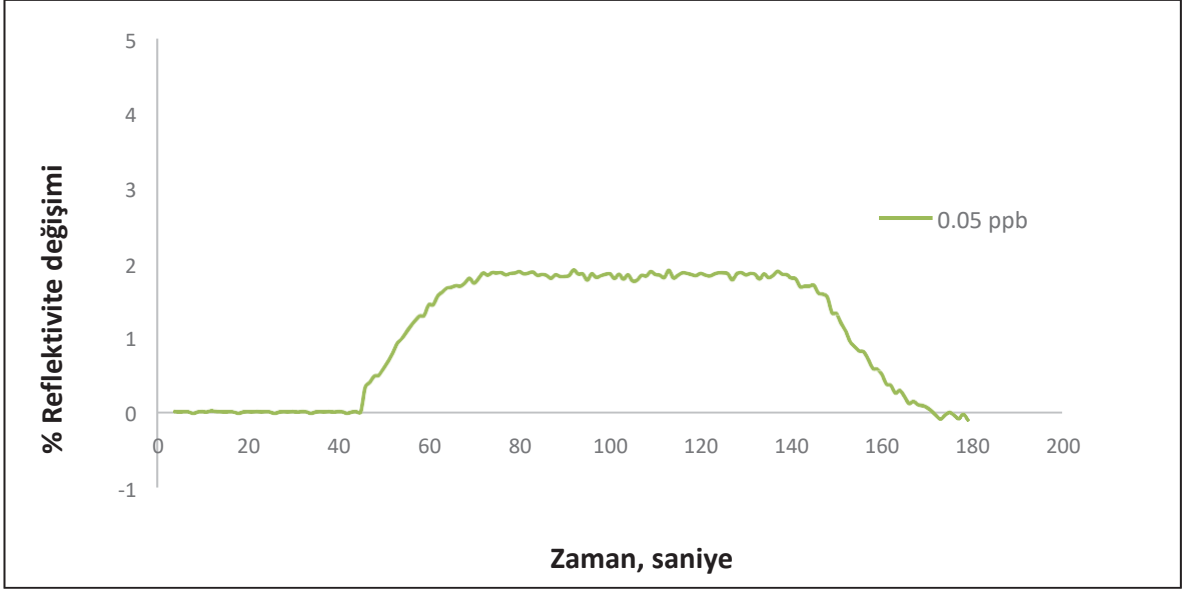
Yüzey	Su temas açısı, °
NIP-AuNPs	70.2°±0.7
MIP-AuNPs	76.6°±0.5

4.4. SPR biyosensörlerle kinetik analizler

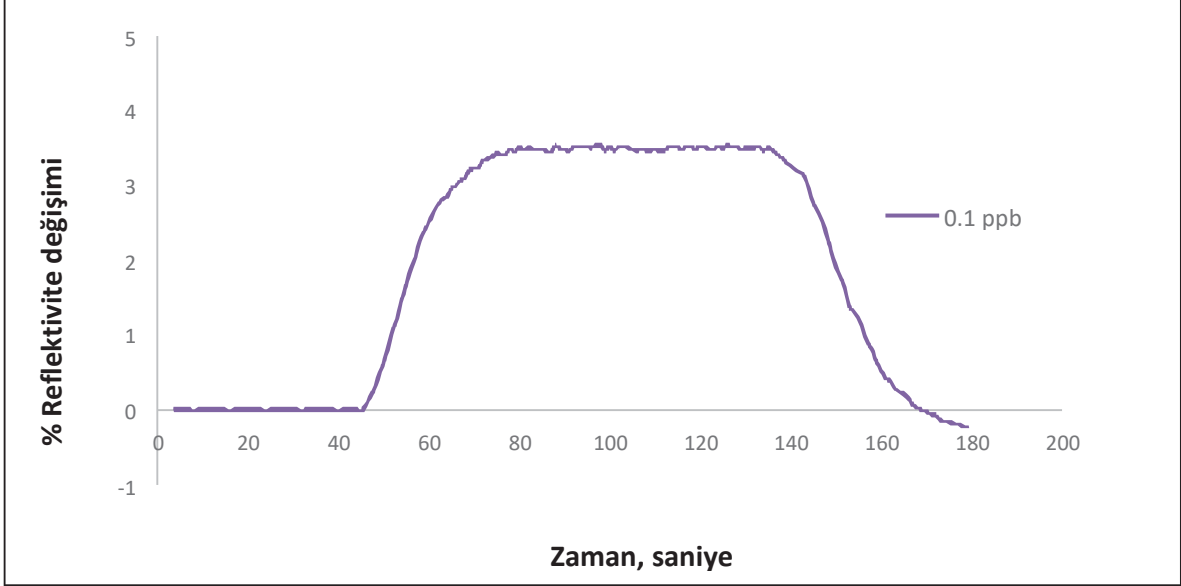
Günümüzde, SPR temelli sensörler herhangi bir işaretleme işlemine ihtiyaç duymadan moleküler analizlerin gerçekleştirilmesinde kullanılmaktadır [81]. Kısa analiz süresi ve düşük maliyetli olma gibi çeşitli avantajlara sahip olan SPR bazlı sensörler ile moleküllerin kinetik, nicel ve nitel olarak karakterizasyonu gerçekleştirilmektedir [82]. Bu tez kapsamında PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs ve baskılanmamış NIP-AuNPs SPR nanosensörler hazırlanmış ve PEN-G'nin 0.01–5 ppb konsantrasyon aralığında hazırlanan çözeltileri için kinetik analizler gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.9'da farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış PEN-G çözeltilerinin MIP-AuNPs SPR nanosensör tarafından verilen sensör cevaplarının sensorgramları verilmiştir.



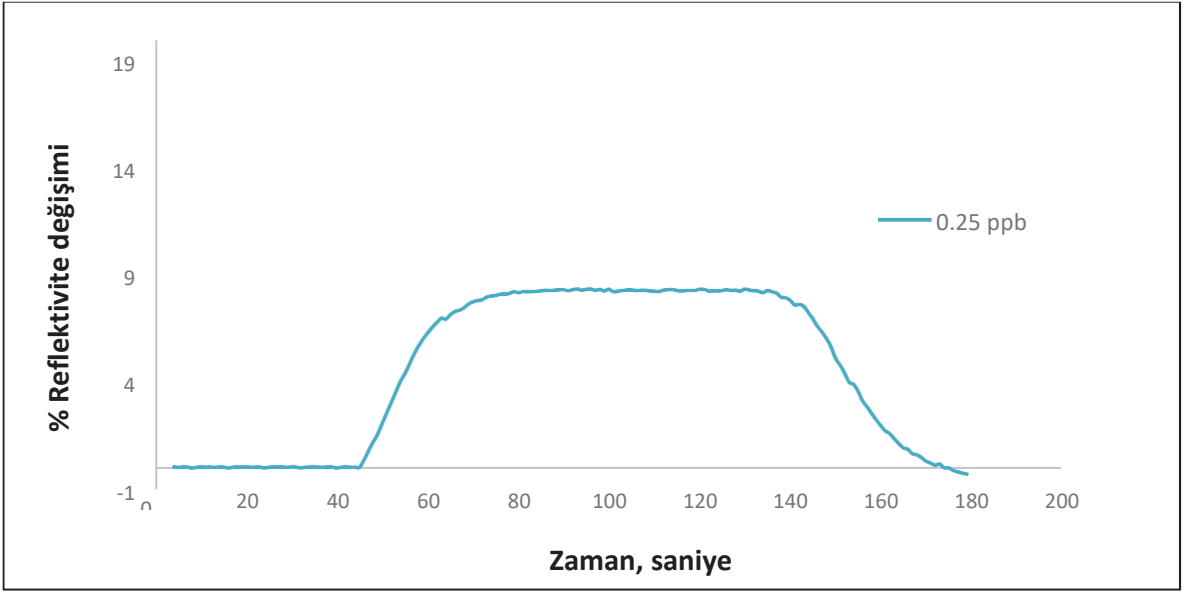
Şekil 4.9.a. 0.01 ppb PEN-G konsantrasyonu için elde edilen sensorgram.



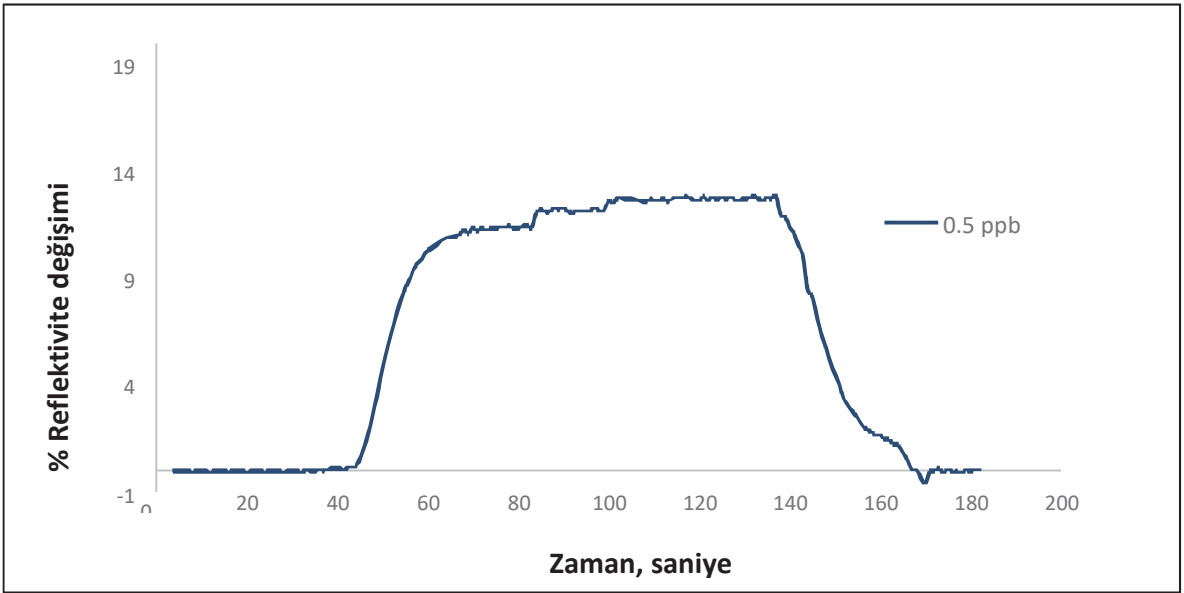
Şekil 4.9.b. 0.05 ppb PEN-G konsantrasyonu için elde edilen sensorgram.



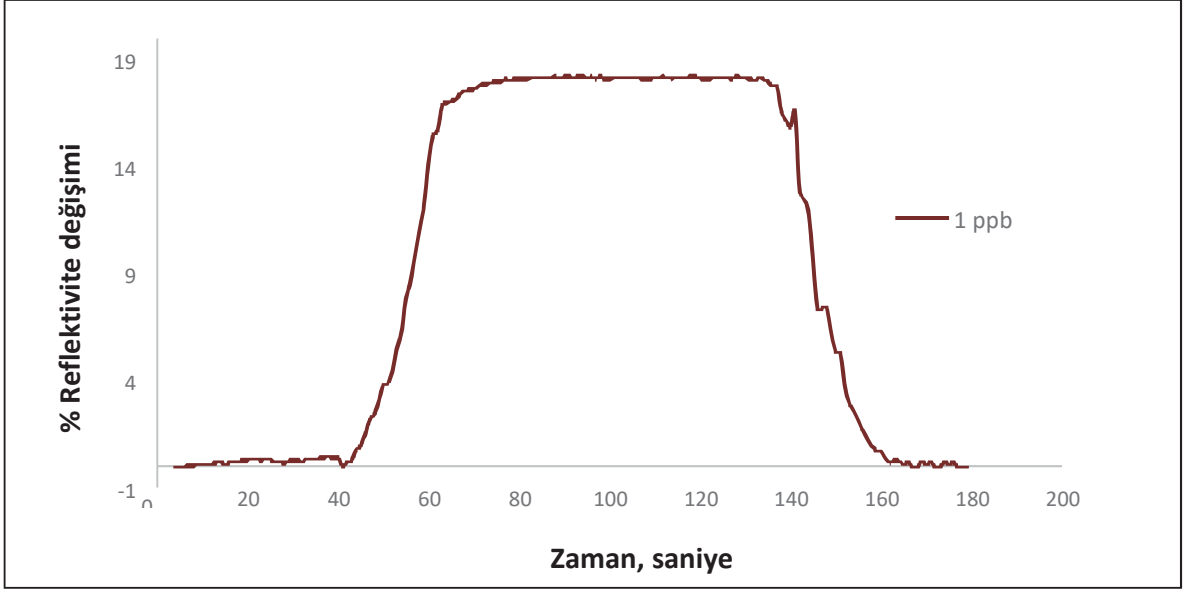
Şekil 4.9.c. 0.1 ppb PEN-G konsantrasyonu için elde edilen sensorgram.



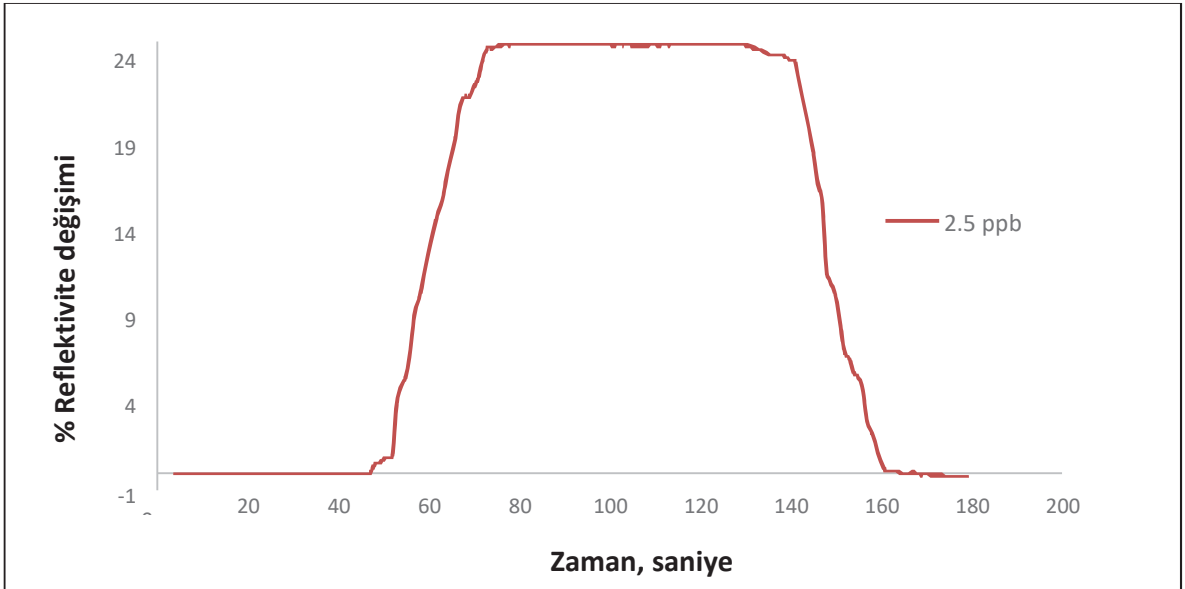
şekil 4.9.d. 0.25 ppb PEN-G konsantrasyonu için elde edilen sensorgram.



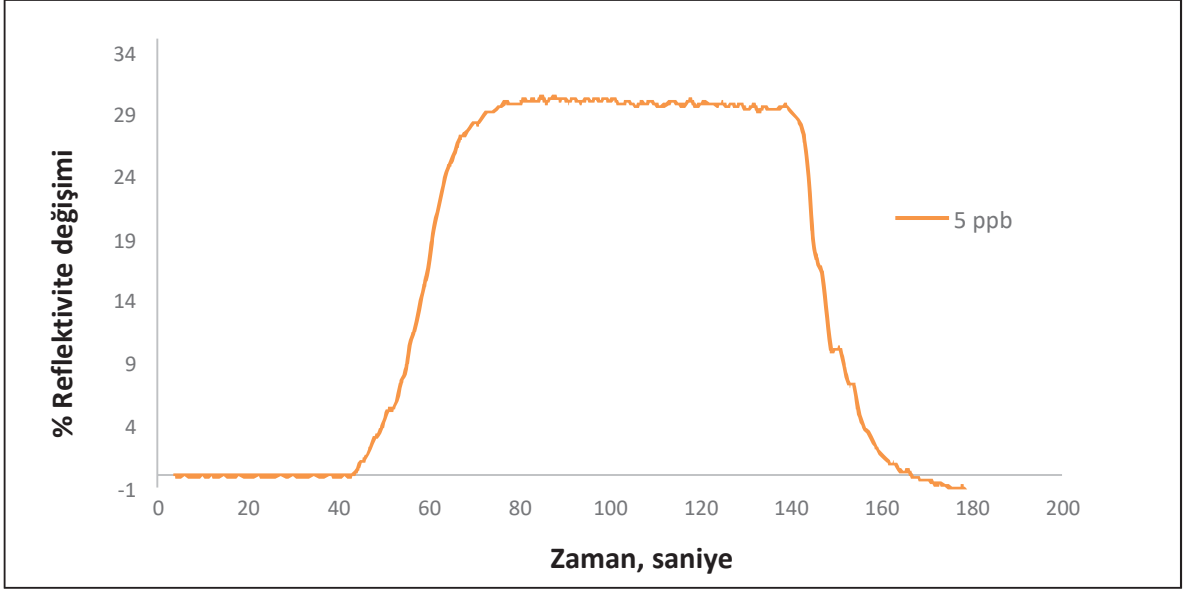
şekil 4.9.e. 0.5 ppb PEN-G konsantrasyonu için elde edilen sensorgram.



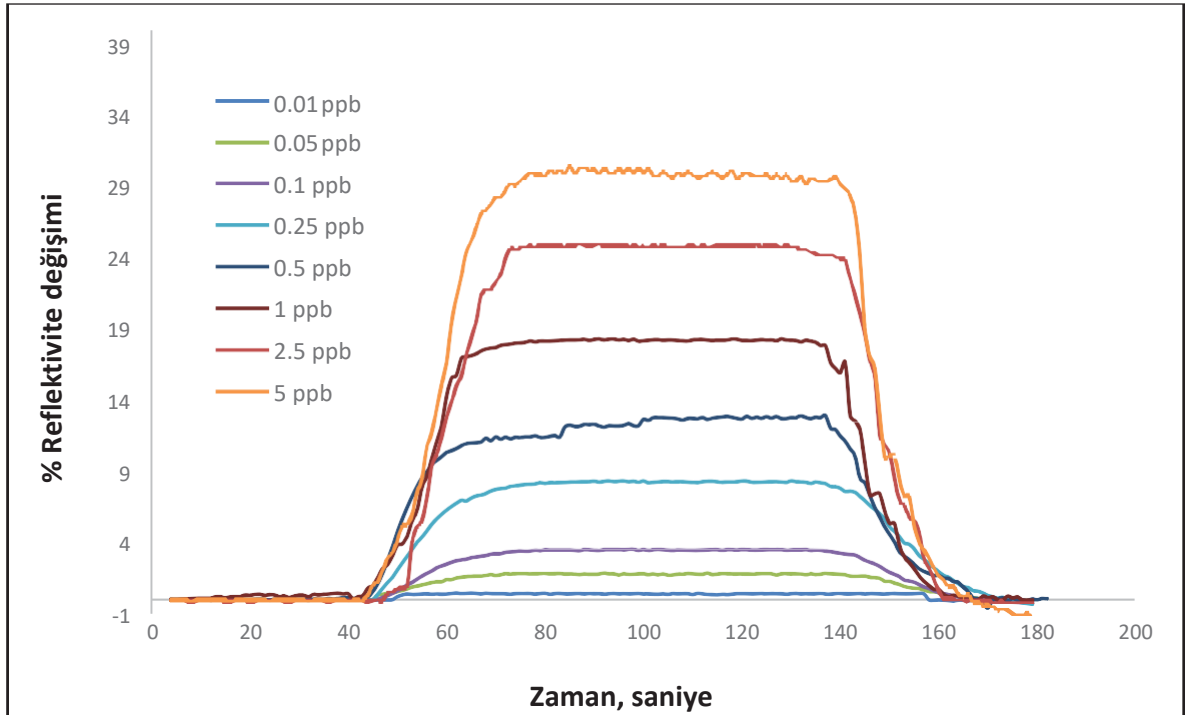
Şekil 4.9.f. 1 ppb PEN-G konsantrasyonu için elde edilen sensorgram.



Şekil 4.9.g. 2.5 ppb PEN-G konsantrasyonu için elde edilen sensorgram.



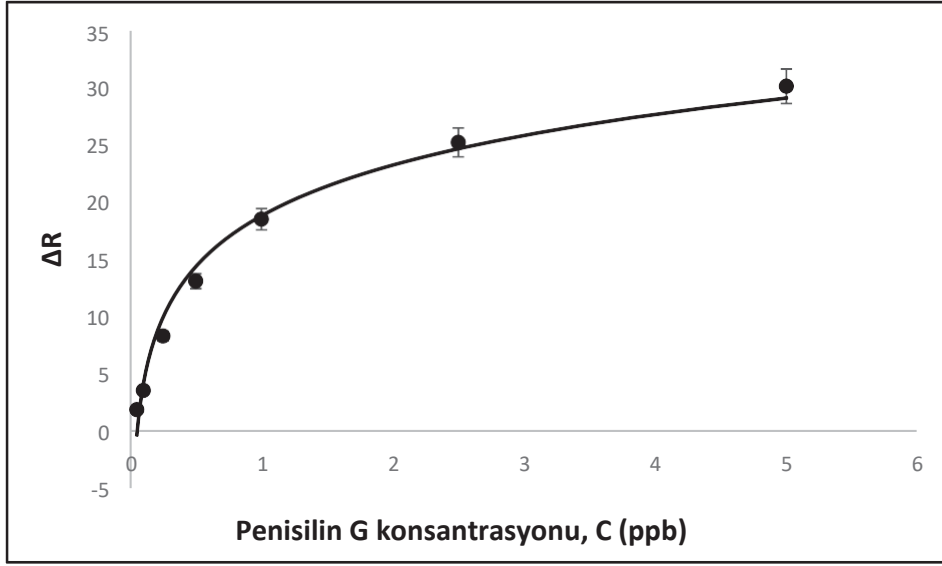
Şekil 4.9.h. 5 ppb PEN-G konsantrasyonu için elde edilen sensorgram.



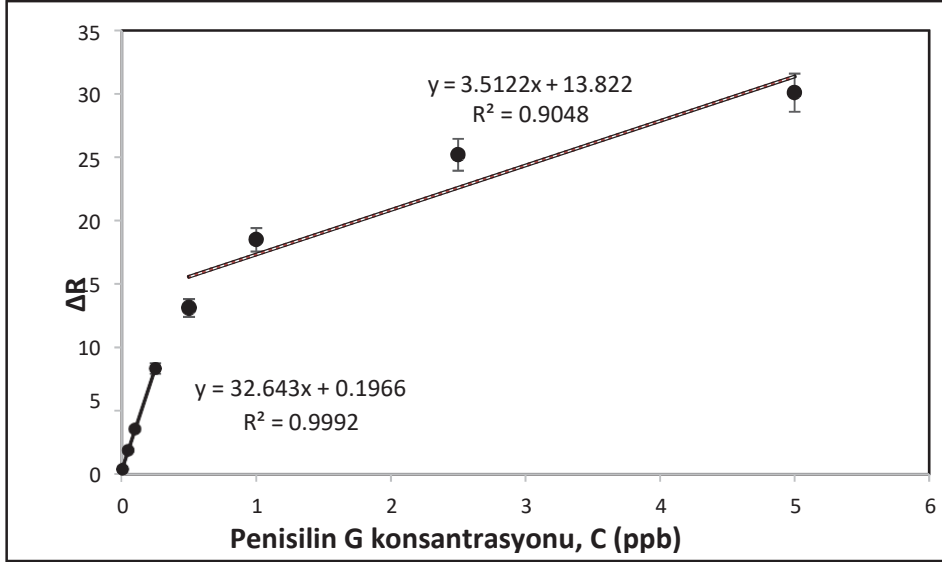
Şekil 4.10. Farklı derişimlerdeki PEN-G çözeltileri ve MIP-AuNPs nanosensör arasındaki etkileşimlerin zamana göre ΔR değerleri.

Şekil 4.10'da farklı derişimlerde PEN-G çözeltilerinin MIP-AuNPs SPR nanosensöre uygulanması ile elde edilen zamana karşılık yüzde kırılmayı (ΔR) gösteren grafikler (a) 0.01 ppb; (b) 0.05 ppb; (c) 0.1 ppb; (d) 0.25 ppb; (e) 0.5 ppb; (f) 1 ppb (g) 2.5 ppb (h) 5 ppb PEN-G konsantrasyonları için verilmiştir. Şekilden anlaşıldığı üzere ΔR değerinin PEN-G nin biyosensör yüzeyine uygulanmasıyla birlikte arttığı görülmektedir. Sensorgramlar elde edilirken, SPR sisteminden öncelikle denge tamponu, sonra farklı konsantrasyonlardaki PEN-G çözeltisi ve en son desorpsiyon çözeltisi geçirilmiştir.

Şekil 4.11 MIP-AuNPs SPR nanosensörün PEN-G için, derişim-yüzde kırılma doğrusallığını göstermektedir. Şekil 4.11 a ve 4.11.b' de görüldüğü gibi 0.01-0.25 ppb aralığındaki doğrunun denklemi ve doğrusallığı $y=32.643x+0.6395$, $R^2=0.9992$ iken 0.5-5 ppb PEN-G konsantrasyon aralığı için doğrunun denklemi ve doğrusallığı $y=3.5122x+5.7072$, $R^2 = 0.9048$ olarak hesaplanmıştır. İki farklı konsantrasyon aralığı için iki farklı doğru denkleminin olması, PEN-G moleküllerinin iki farklı bağlanma kinetiği gösterdiğini açıklamaktadır. Düşük konsantrasyonlar için çizilen doğrunun denkleminde elde edilen regresyon katsayısının değerinin yüksek olması düşük konsantrasyonlardaki bağlanmanın afinitesinin yüksek olduğunu göstermektedir. Diğer bir ifade ile; hazırlanan MIP-AuNPs SPR nanosensör, 0.01-0.25 ppb konsantrasyon aralığında % 99.92 doğrulukta ölçüm yapabilmektedir. Şekil 4.11.e de bütün PEN-G konsantrasyonlarına karşılık gelen SPR yanıtı ile ΔR arasındaki ilişki gösterilirken, Şekil 4.11.b de iki farklı PEN-G konsantrasyon aralığı (0.01-0.25 ve 0.5- 5 ppb) için elde edilen SPR yanıtı arasındaki ilişki gösterilmektedir.



(a)



(b)

Şekil 4.11. MIP-AuNPs nanosensörün farklı PEN-G konsantrasyonlarına verdiği SPR yanıtı, (a) Bütün PEN-G konsantrasyonlarına karşılık gelen SPR yanıtı ΔR arasındaki ilişki (b) iki farklı PEN-G konsantrasyon aralığı (0.01-0.25 ve 0.5-5 ppb) için verilen SPR yanıtı arasındaki ilişki.

4.4.1. Denge analizi

PEN-G nin farklı derişimlerin bağlanması ile elde edilen SPR yanıtının verdiği sinyal aşağıda belirtildiği gibi ifade edilmektedir.

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

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

Birinci denklemdede $d\Delta R /dt$ sinyalin değişim hızı, R ve R_{maks} bağlanma sinyali, C analit derişimi K bağlanma hız sabit oranını ifade etmektedir. bağlanma sabiti olan K_A , $\Delta R_{denge}/C$ 'ye karşı ΔR_{denge} grafiğinin çizilmesi ile hesaplanır. $1/K_A$ eşitliği kullanılarak ise ayrılma sabiti K_D hesaplanabilir.

4.4.2. Bağlanma kinetik analizi

Eşitlik 4.1 tekrar ifade edildiğinde 4.3 eşitliği elde edilir. Ayrıca bağlanmanın hız sabitlerinin hesaplanmasında eşitlik 4.4 den faydalanılır;

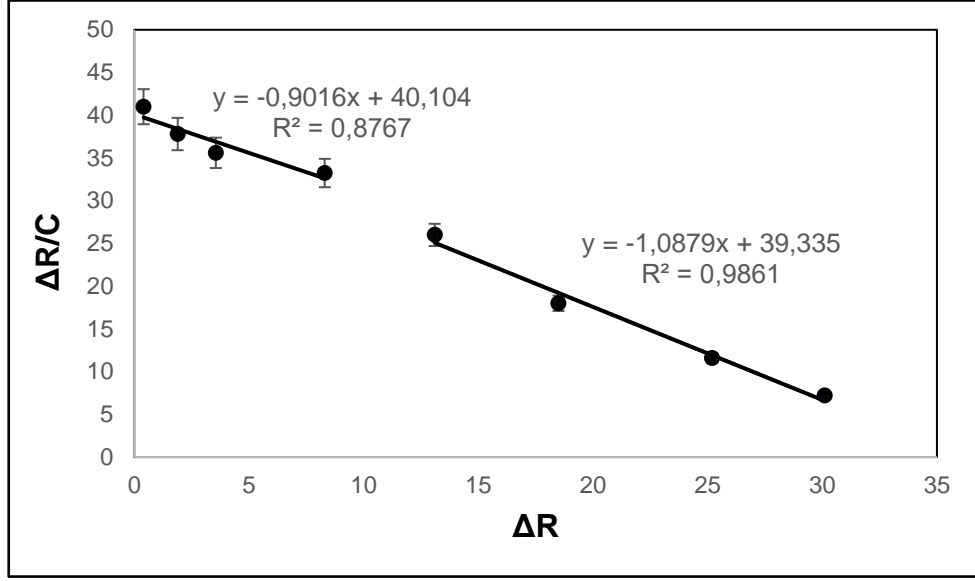
$$d\Delta R/dt = k_a C \Delta R_{maks} - (k_a C + k_d) \Delta R \quad (4.3)$$

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

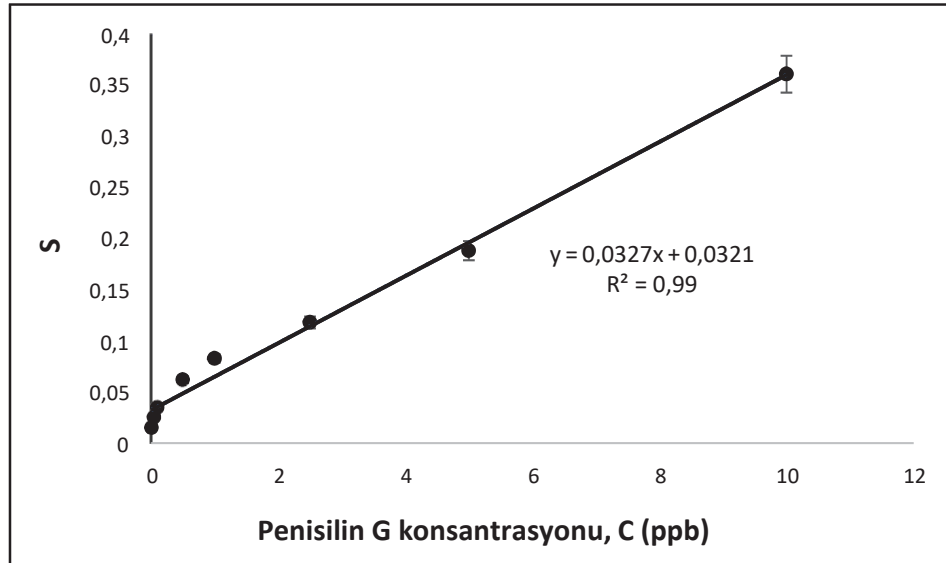
Bu eşitlikte k_a doğru eğimini k_d ise kesim noktasını ifade etmektedir. K_d 'nin hesaplanması $k_a C \gg k_d$ olduğunda doğruluk bakımından kesinlik oluşturmamaktadır. Bu noktada en kesin çözüm eşitlik 4.5 teki denklemdede ifade edildiği gibidir [65].

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

Şekil 4.12.a ve 4.12.b'de denge analizi ve bağlanma kinetik analizi için çizilen doğrular gösterilmektedir. ΔR_{maks} , k_a , k_d , K_A ve K_D değerleri Çizelge 4.2' te ifade edilmiştir.



(a)



(b)

Şekil 4.12. (a) Denge analiz yaklaşımı (Scatchard) (b) Bağlanma kinetik yaklaşımı ile kinetik hız sabitlerinin belirlenmesi.

Çizelge 4.2. Kinetik hız sabitleri

Denge Analizi (Scatchard)		Bağlanma Kinetik Analizi	
ΔR_{\max}	36.15±0.23	$k_a, (\text{ng.mL}^{-1})^{-1}.\text{s}^{-1}$	0.0327±0.0019
$K_A, (\text{ng.mL}^{-1})^{-1}$	1.0879±0.1156	k_d, s^{-1}	0.0321±0.0009
$K_D, \text{ng.mL}^{-1}$	0.9192±0.0142	$K_A, (\text{ng.mL}^{-1})^{-1}$	1.0186±0.0031
R^2	0.9861	$K_D, \text{ng.mL}^{-1}$	0.4230±0.0023
		R^2	0.9900

4.4.3. Denge izoterm modelleri

MIP-AuNPs nanosensörün PEN-G ile etkileşim mekanizmasının belirlenmesi amacıyla Scatchard, Langmuir; Freundlich ve Langmuir-Freundlich adlarıyla farklı izoterm modelleri oluşturulmuştur. Eşitlik 4.6, Eşitlik 4.7, Eşitlik 4.8 ve Eşitlik 4.9 sırası ile Scatchard; Langmuir; Freundlich ve Langmuir-Freundlich izotermelerinin denklemlerini göstermektedir.

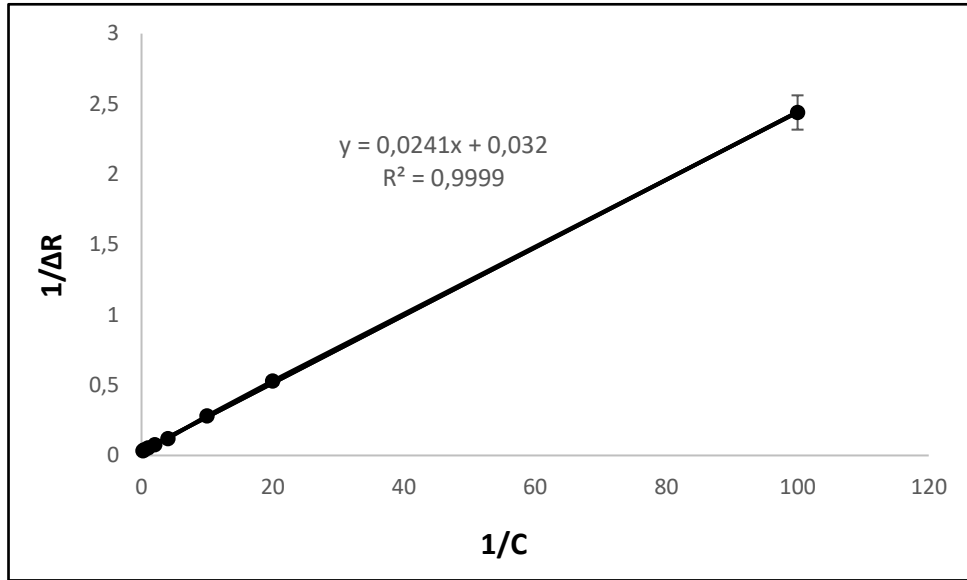
$$\text{Scatchard; } \Delta R_{\text{denge}}/[C]=K_A(\Delta R_{\text{maks}}-\Delta R_{\text{denge}}) \quad (4.6)$$

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

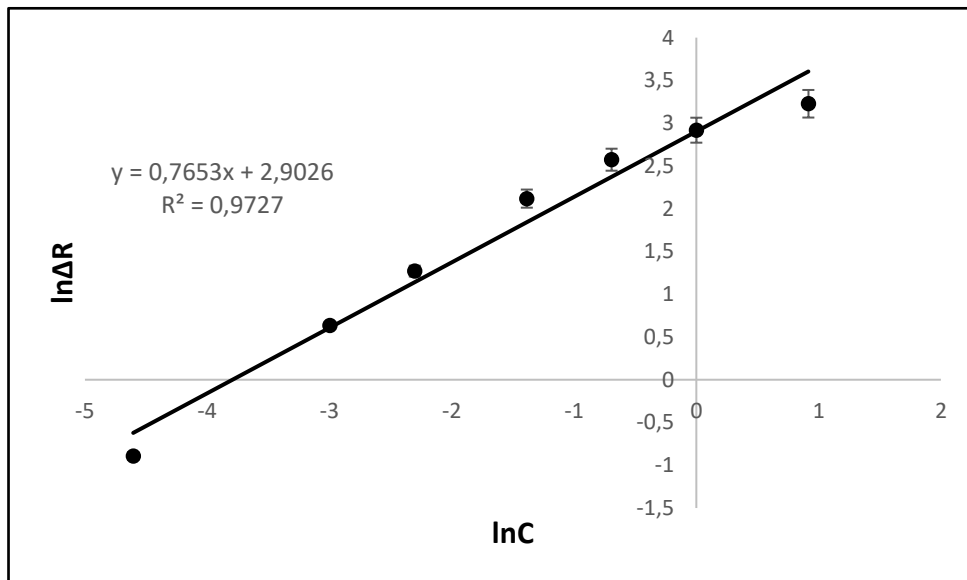
$$\text{Freundlich; } \Delta R=\Delta R_{\text{maks}}[C]^{1/n} \quad (4.8)$$

$$\text{Langmuir-Freundlich; } \Delta R=\{\Delta R_{\text{maks}}[C]^{1/n}/K_D+[C]^{1/n}\} \quad (4.9)$$

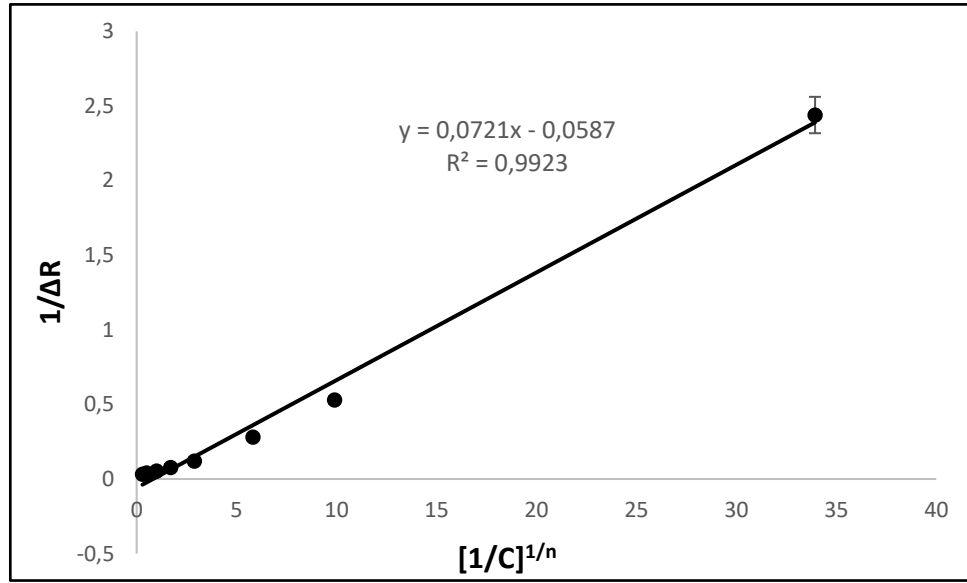
Şekil 4.13 incelendiğinde PEN-G adsorpsiyonunu için en uygun modellemenin en büyük regresyon katsayısına sahip Langmuir adsorpsiyon modeli olduğu tespit edilmiştir (Regresyon katsayısı = 0.9999). Modellemelere ilişkin sonuçlar Çizelge 4.3'de ifade edilmiştir. Bağlanmanın hızını belirleyen hız sabitleri eşitlik 4.4 ile hesaplanmıştır.



(a)



(b)



(c)

Şekil 4.13. (a) Langmuir (b) Freundlich (c) Langmuir- Freundlich adsorpsiyon modelleri.

Çizelge 4.3. Denge bağlanma izoterm parametreleri.

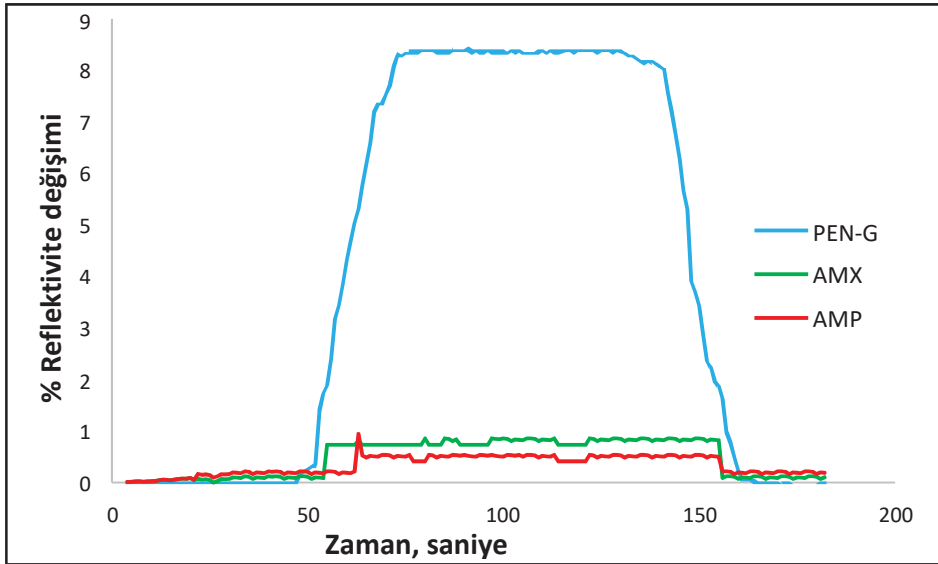
Langmuir		Freundlich		Langmuir-Freundlich	
ΔR_{\max}	31.25 ± 0.29	ΔR_{\max}	18.30 ± 0.09	ΔR_{\max}	17.03 ± 0.85
$K_A, (\text{ng.mL}^{-1})^{-1}$	1.3278 ± 0.0346	$1/n$	0.7653 ± 0.0124	$K_A, (\text{ng.mL}^{-1})^{-1}$	0.8141 ± 0.0408
$K_D, \text{ng.mL}^{-1}$	0.7531 ± 0.0015	R^2	0.9727	$K_D, \text{ng.mL}^{-1}$	1.2282 ± 0.0391
R^2	0.9999			R^2	0.9923

4.5. Seçicilik Çalışmaları

Çalışma kapsamında düşük maliyetle PEN-G tespiti için hassas ve seçici SPR tayin yöntemi geliştirilmiş ve uygulanmıştır. Bu amaçla AuNPs'e sülfhidril grubu sağlayıcısı sistein amino asitini içeren MAC monomeri ve hidrofobik fonksiyonel fenilalanin grubu tedarikçisi MAPA monomeri kullanılmıştır. Amino asit bazlı yeniden kullanılabilir MIP-

AuNPs nanosensörün, su numunelerindeki PEN-G antibiyotiğini pikomolar konsantrasyon düzeyinde tayin edebildiği tespit edilmiştir.

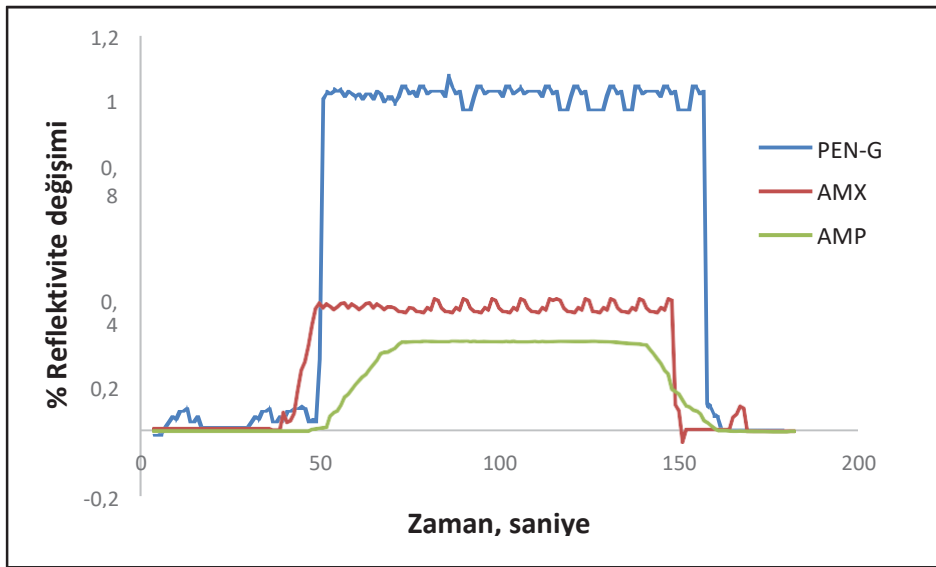
Bir tanıma elemanı olarak görev yapan MIP'ler, boyut ve şekil olarak şablon moleküllere benzeyen baskılanmış bölgeler oluşturmak için kullanılır. Bu baskılanmış bölgeler hedef molekülü seçici tanıyarak hedef molekülün yeniden bağlanması aşamasında verimliliği artırır [83]. Şekil 4.14'de gösterildiği gibi, MIP-AuNPs nanosensörün PEN-G antibiyotiğini seçici tayinini incelemek için, AMX ve AMP gibi bazı yapısal analogların varlığında yarışmacı adsorpsiyon çalışmaları yapıldı. Bu amaçla, AMX (0.25 ppb) ve AMP çözeltileri (0.25 ppb), MIP-AuNPs nanosensörü ile test edildi. Tablo 3'te gösterilen, MIP-AuNPs SPR nanosensörün AMX ve AMP için seçicilik katsayılarının sırasıyla 9.87 ve 16.78 olarak hesaplandığı tespit edildi. Şekil 4.14 incelendiğinde MIP-AuNPs SPR nanosensörün verdiği cevabın sersogramı incelendiğinde, AMX ve AMP için non-spesifik bağlanmaların olduğu ve bunun düşük ΔR sinyal yanıtları ile doğrulandığı gözlenmiştir. Sonuç olarak MIP-AuNPs SPR nanosensörün, PEN-G antibiyotiğini seçici tayin ettiği görülmektedir. Şekil 4.14 MIP- AuNPs SPR nanosensörün AMX ve AMP için verdiği SPR sinyal yanıtlarının zamana karşı ΔR cevaplarının grafiklerinin karşılaştırılmasını göstermektedir.



Şekil 4.14. MIP-AuNPs SPR nanosensörün 0.25 ppb PEN-G, AMX ve AMP çözeltileri için verdiği SPR sinyal yanıtlarının zamana karşı ΔR değerleri.

4.6. MIP-AuNPs SPR nanosensörün baskılama etkinliğinin belirlenmesi

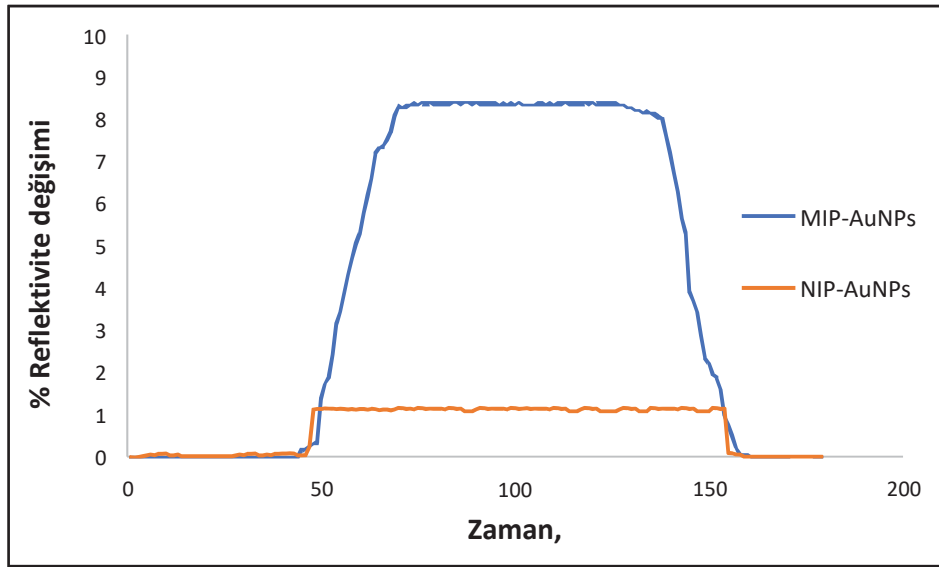
MIP-AuNPs nanosensörünün baskılama verimliliği PEN-G kullanılmadan hazırlanan NIP-AuNPs nanosensör ile gösterilmiştir. NIP-AuNPs nanosensörün seçicilik katsayısı aynı şekilde AMX ve AMP (0.25 ppb) çözeltileri için hesaplandığında, NIP-AuNPs nanosensörün PEN-G için seçiciliğinin AMX e göre 2.74 kat, AMP ye göre 3.70 kat daha fazla olduğu görüldü. Şekil 4.15 incelendiğinde; NIP-AuNPs nanosensörün sırası ile AMX ve AMP çözeltileri için verdiği sinyal yanıtları görülmektedir.



Şekil 4.15. NIP-AuNPs SPR nanosensörün 0.25 ppb PEN-G, AMX ve AMP çözeltileri için verdiği SPR sinyal yanıtlarının zamana karşı ΔR değerleri.

MIP-AuNPs nanosensörünün baskılama verimliliği, NIP-AuNPs nanosensörün PEN-G tayini için verdiği sensör cevabı ile karşılaştırılmasıyla incelendi. Bu amaçla hem MIP-AuNPs nanosensör hemde NIP-AuNPs nanosensör 0.25 ppb PEN-G ile etkileştirildi. Şekil 4.16 PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs nanosensörünün ve PEN-G baskılanmamış NIP-AuNPs nanosensörün 0.25 ppb PEN-G için verdiği sinyal cevaplarının % Reflektivite-Zaman grafiklerinin karşılaştırılmasını göstermektedir. Şekil 4.16 grafiği incelendiğinde; NIP-AuNPs nanosensörün, PEN-G ile kayda değer bir etkileşime girmediği ve sinyal şiddetinin düşük olduğu tespit edilmiştir. PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs ve baskılanmamış NIP-AuNPs SPR sensörler karşılaştırıldığında; PEN-G için verilen sinyal yanıtının

8.39'dan 1.07'ye düştüğü görülmektedir. PEN-G için MIP-AuNPs ve NIP-AuNPs nanosensörlerin bağıl seçicilik değerleri AMX ile kıyaslandığında 3.60 kat, AMP ile kıyaslandığında 4.53 kat fazla bulunmuştur. Baskılamanın etkinliği ise, baskılama faktörü ise, $k_{MIP}/k_{NIP}=7.83$ olarak hesaplanmış, elde edilen sonuç baskılama işleminin etkin bir şekilde başarıldığını göstermektedir. Çizelge 4.5, MIP-AuNPs ve NIP-AuNPs nanosensörlerin AMX ve AMP için gösterdiği seçicilik ve bağıl seçicilik katsayılarının tablo halinde özetlenmesidir.



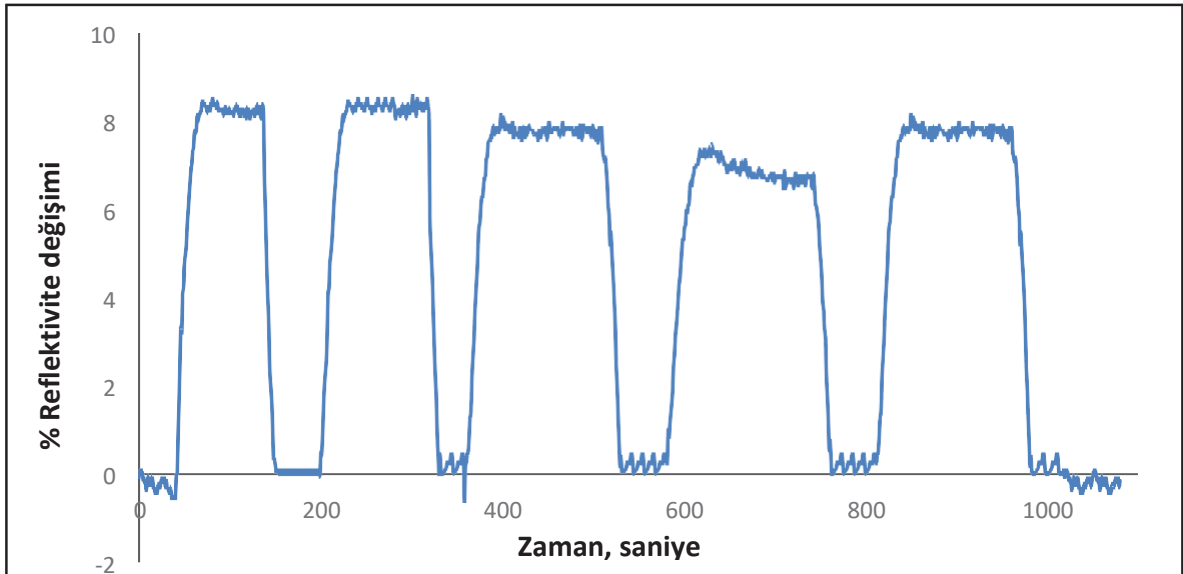
Şekil 4.16. MIP-AuNPs ve NIP-AuNPs SPR nanosensörün 0.25 ppb PEN-G çözeltisi için verdiği SPR sinyal yanıtlarının zamana karşı ΔR değerleri.

Çizelge 4.4. MIP-AuNPs ve NIP-AuNPs nanosensörlerin PEN-G için seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları.

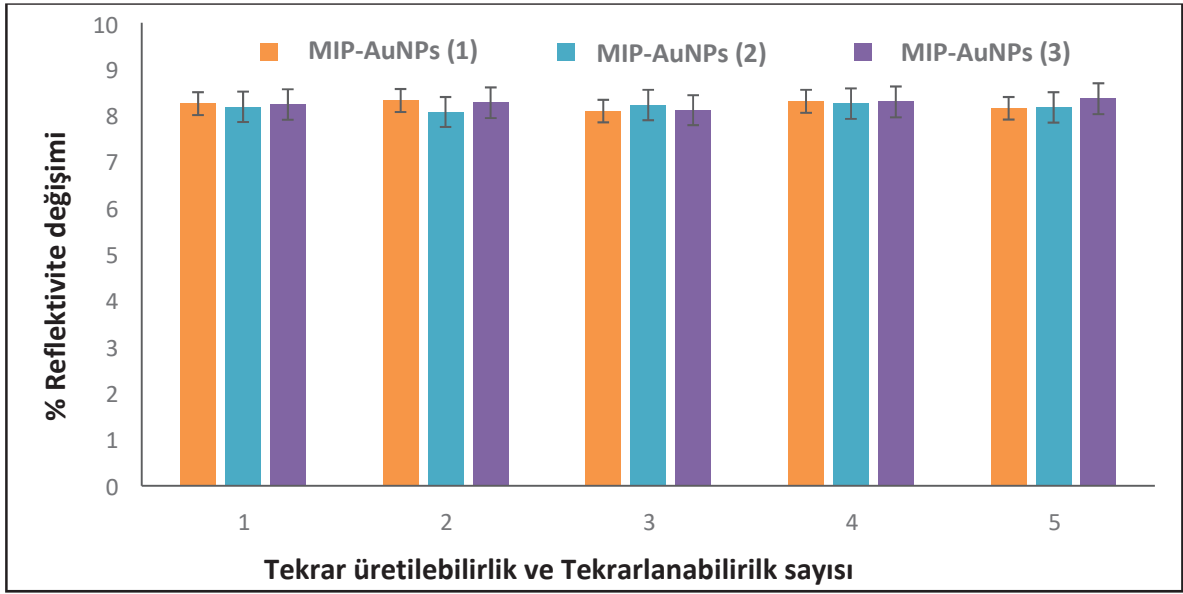
	MIP-AuNPs		NIP-AuNPs		
	ΔR	k	ΔR	k	k'
PEN-G	8.39	-	1.07	-	-
AMX	0.85	9.87	0.39	2.74	3.60
AMP	0.50	16.78	0.27	3.70	4.53

4.7. MIP-AuNPs SPR nanosensörünün tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi

Biyolojik moleküllerin sensör sistemlerinde tanıma elemanı olarak kullanımı, rejenerasyon aşamasındaki denatürasyonları ve üç boyutlu yapıları nedeniyle sınırlıdır. Kararlı polimerik yapıları nedeniyle yeniden kullanılabilirlik kapasitesine sahip moleküler baskılı SPR nanosensörler, zorlu çevre koşullarına karşı dayanıklıdır. MIP-AuNPs nanosensör sisteminin tekrarlanabilirlik çalışmaları 0.25 ppb PEN-G çözeltisinin SPR sistemine beş tekrarlı uygulanmasıyla incelendi ve sensör yanıtı Şekil 4.17'de gösterildiği gibi %Reflektivite değişimi-Zaman grafiği olarak çizildi. Önerilen yöntemin tekrarlanabilirlik çalışmaları kesinlik çalışmaları ile belirlendi. MIP-AuNPs nanosensörünün sinyal yanıtı tekrarlanabilirlik çalışmaları, gün içi testler için (üç grup halinde beş tekrarlı) istatistiksel olarak değerlendirildi ve tekrarlanabilirliğin doğruluğu, yüzde görel standart sapma (%RSD) değeri hesaplanarak incelendi. %RSD olarak ifade edilen gün içi deneylerin sonuçlarının, <1.1'den daha düşük olarak rapor edilmesi yüksek tekrarlanabilirliğe işaret etti. Çizelge 4.6 ve Çizelge 4.7 sırası ile, 0.25 ppb konsantrasyonunda PEN-G çözeltisi için tekrarlanabilirlik çalışmaları için yapılan 5 ölçümün sonuçlarını ve gün için kesinlik çalışmaları (Şekil 4.18) için aynı konsantrasyonda 3 kez gerçekleştirilen ölçümün sonuçlarını göstermektedir.



Şekil 4.17. MIP-AuNPs nanosensörünün yanıtının 0.25 ppb PEN-G çözeltisi için tekrarlanabilirlik çalışmaları.



Şekil 4.18. Farklı partiler ile hazırlanmış PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs nanosensörü için gün içi deneyler; 0.25 ppb PEN-G analizi için kullanılan her üç parti şeklinde hazırlanmış sensör için beş tekrarlı analiz.

Çizelge 4.5. Tekrarlanabilirliği gösteren kesinlik değerleri

Konsantrasyon (ppb)	ΔR	İstatiksel Analiz
0.25	8,01	
0.25	8,11	Ortalama-8,04
0.25	7,98	STD-0,08
0.25	8,15	% RSD-1,008
0.25	7,97	

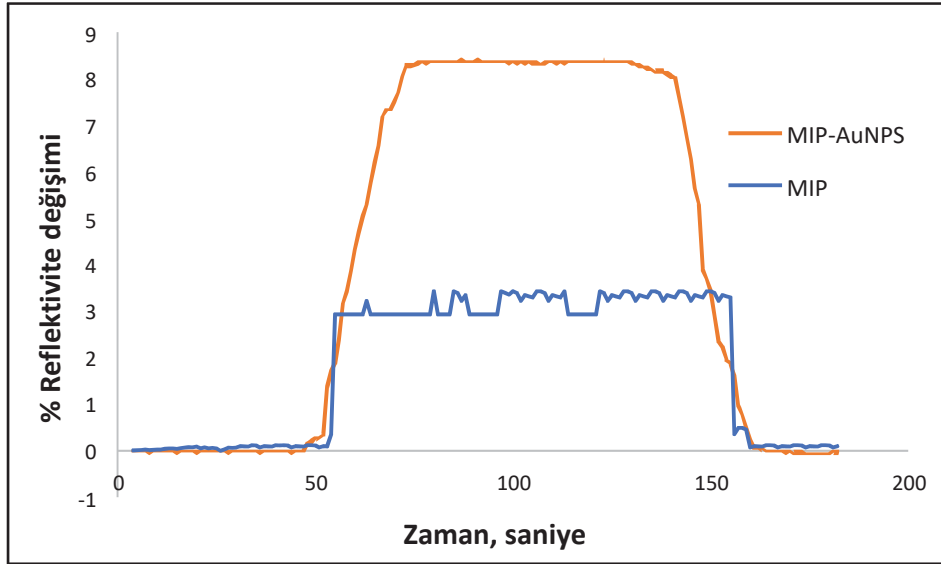
Çizelge 4.6. Gün içi kesinlik

Konsantrasyon (ppb)	ΔR	ΔR	ΔR	Ortalama %RSD
0.25	8,01	7,91	7,92	
0.25	8,11	7,88	7,93	
0.25	7,98	7,94	7,90	
0.25	8,15	7,92	7,92	
0.25	7,97	7,93	7,93	
% RSD	1,008	0,290	0,154	0,484

4.8. AuNPs'in SPR nanosensörünün hassasiyetini artırıcı etkisi

İletken monomerler, grafen, karbon nanotüpler (CNT'ler), AuNPs ve benzerleri, sinyal yanıtını artırmak amacı ile yaygın olarak kullanılır. MIP-AuNPs nanosensörü, beklenen algılama mekanizması ile tutarlı olarak artan PEN-G konsantrasyonuna artan bir SPR açısı yanıtı verdi. Ayrıca MIP-AuNPs nanosensör ile PEN-G tayininde kullanılacak, AuNPs eklenmeden hazırlanan MIP nanosensör karşılaştırıldığında, AuNPs'in sinyal şiddetini arttırmada etkili olduğu gösterilmiştir.

Bu çalışmada, moleküler baskılama tekniği ile seçici PEN-G tayini için AuNPs ile modifiye edilmiş amino asit bazlı monomerler kullanılarak yeni bir SPR nanosensörü geliştirilmiştir. AuNPs'lerin sinyal yanıtı artırıcı etkisi, PEN-G tayini için kullanılan MIP- AuNPs nanosensörünün hassasiyetini artırır. Şekil 4.19, sırasıyla MIP-AuNP'lere ve MIP nanosensörlerine uygulanan 0.25 ppb PEN-G çözeltileri için zamana karşı ΔR değerlerini gösterir. Şekilde görüldüğü üzere, AuNPs tarafından artırılmış sinyal yanıtı gözlemlenmektedir.



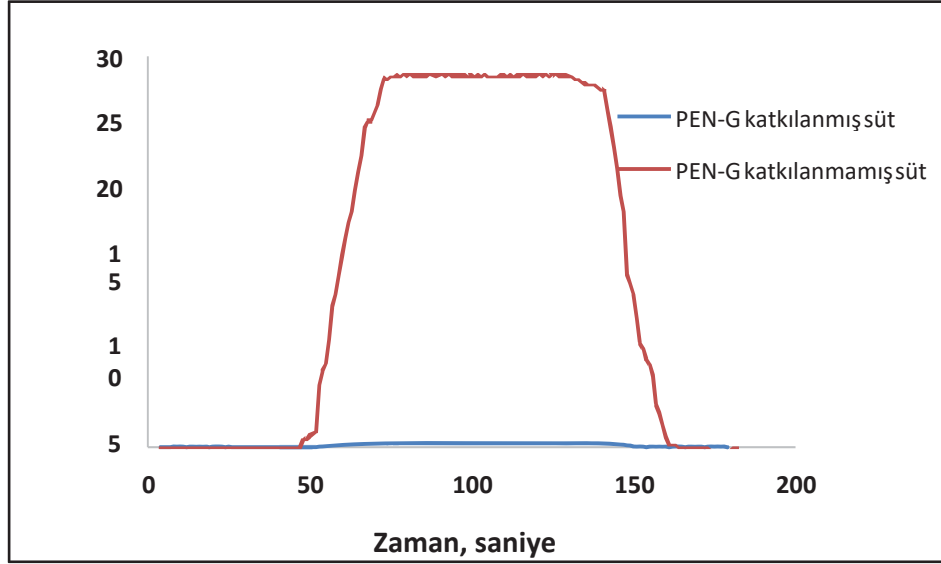
Şekil 4.19. AuNPs'in PEN-G için sinyal yanıtını artırıcı etkisi. PEN-G konsantrasyonu:0.25 ppb.

4.9. Süt örneğinden Penisilin-G tayini

PEN-G; β -laktam grubu antibiyotikler içerisinde yer alır ve süt ineklerinde görülen mastitis (meme iltihabı) gibi bakteriyel enfeksiyonlardan korunmada ve tedavide sıklıkla tercih edilen antibiyotiktir [9]. Parenteral yani damar yoluyla verilmiş olan PEN-G'nin %60-90'lık kısmı idrar yoluyla 6 saatlik süre sonunda uzaklaştırılmasına rağmen, 90 saat ya da daha uzun süre zarfında süt ineklerinin memelerinde antibiyotik kalıntılarına rastlanılmaktadır. Başta mastitis olmak üzere sütün ana üreticisi olan süt inekleri enfeksiyon hastalıkları açısından risk altında olduklarından antibiyotik tüketimi şarttır. İstatistiklere ve son araştırmalara göre, Mastitis'i kontrol etmek için ilaçların yanlış kullanılması, sütte ilaç kalıntılarının varlığının ana kaynağıdır [78]. Sütte ilaç kalıntı konsantrasyonunun 1969 yılında FAO/WHO tarafından belirlenen limitin altında olması gerektiği kuvvetle belirtilmektedir. Veteriner ilaçları için maksimum kalıntı limiti birkaç kez değiştirilmiş olup sürekli olarak yeni çıkan ilaçlar temin edilmektedir. Süt ve süt ürünleri halk arasında sağlıklı ve kapsamlı bir besin maddesi olarak kabul edildiğinden, bu görüşler lehinde girişimlerde bulunulması önemlidir [79].

MIP-AuNPs nanosensörü ile PEN-G'nin seçici tayini üzerindeki matris etkisi, gerçek bir örnek olarak seçilen süt çözeltisi için incelendi. PEN-G antibiyotiğini içeren süt numunesi çözeltisi, bilinen bir PEN-G konsantrasyonunun eklenmesiyle hazırlandı ve bir MIP-AuNPs nanosensöre uygulandı. Uygulama işleminden önce, bilinen bir PEN-G konsantrasyonuna sahip inek sütü numunesine ön-işlem uygulandı. Bu amaçla sütü çöktürerek proteinden arındırmak için 20 dakika boyunca sürekli karıştırarak asetonitril ilave edildi [80]. Elde edilen karışımı süzmek için bir filtre kağıdı (Whatman, 125 mm) kullanıldı ve süpernatant geri kazanıldı. Geri kazanılan süpernatant, herhangi bir askıda kalan maddeyi uzaklaştırmak için MSE 869-Minor santrifüj kullanılarak 30 dakika boyunca 10.000 rpm'de santrifüjlendi. Hazırlanan MIP-AuNPs SPR nanosensör, PEN-G'yi süt numunesinde bulunan diğer moleküllerden ayırt ederek, spesifik ve submikromolar hassasiyetle PEN-G'yi tayin etmek için kullanıldı. Uygulanan yöntem, PEN-G'nin konsantrasyonunun 5 ppb olacak şekilde eklendiği süt numunesindeki PEN-G miktarını izlemek için kullanıldı. PEN-G seviyesini belirlemek için, MIP-AuNPs nanosensörü, PEN-G eklenmiş süt numunesi çözeltisi ile etkileştirilmesiyle ΔR değerinin 28.54 olduğu belirlendi. Bu sonucun, 5 ppb PEN-G içeren

sulu çözelti uygulanarak elde edilen sinyal değerinden daha düşük sinyal şiddeti ($\Delta R=30.10$) içerdiği kaydedildi. Bunun nedeni, süt numunelerinde doğal olarak bulunan moleküllerin sterik bir etki sergilemesi veya yarışmacı bir ajan gibi davranmasıdır. 5.0 ppb PEN-G katkılı süt numunesinin sensorgramı Şekil 4.20 de gösterilmiştir.



Şekil 4.20. MIP-AuNPs nanosensörün PEN-G katkılı (5 ppb) ve katkısız süt örneği için sinyal yanıtı.

Bu çalışma, hem sulu çözelti hem de süt numunelerinden seçici PEN-G tayini için MIP tabanlı bir SPR nanosensör sistemi tasarlamayı ve geliştirmeyi amaçlamaktadır. AuNPs kullanılarak etiketsiz ve yeniden kullanılabilir işlevselleştirilmiş nanomalzeme tabanlı SPR nanosensör, herhangi bir referans malzemeye ihtiyaç duymadan karmaşık matris ortamında PEN-G yi tanıma yeteneğine sahip olacak şekilde geliştirilmiştir. Bu amaçla, tek bir modda hem hidrofobik matris hem de fonksiyonel grup sağlayıcı içeren ikili yeteneğe sahip amino asit bazlı bir MIP-AuNPs nanosensör hazırlandı ve PEN-G'yi başka bir uzatıcı kol, fonksiyonel monomer yada herhangi bir ligand immobilizasyonu gibi karmaşık ekstra prosese ihtiyaç duymadan ilk kez tespit etmek için kullanıldı.

MIP, hedef moleküllerin spesifik olarak tanınması için baskılama boşluklarına sahip oldukça çekici fonksiyonel malzeme olarak kullanılır. Enzimler, antikolar, nükleik asitler, aptamerler ve tam hücreler gibi geleneksel tanıma elemanlarıyla karşılaştırıldığı zaman,

MIP'lerin sentez yöntemleri daha ucuz, daha basit, daha hızlı ve çeşitli tayin ortamlarında önemli stabiliteye sahip olduğu görülmüştür. PEN-G'nin seçici tanınması için afinite malzemeleri biyoteknoloji alanında büyük önem taşımaktadır. Fenilalanin bölgesi tarafından çok sayıda bağlanma yeri ile PEN-G molekülüne bağlanan MAPA, diğer elektrokimyasal sensörlere kıyasla PEN-G baskılı MIP-AuNPs nanosensörüne daha düşük tayin limiti ve daha yüksek hassasiyet sağlar [15,16,18,20,21,23-25,28]. Birkaç elektrokimyasal sensörün literatürde daha iyi [22,26] tayin limit değerlerine sahip olduğu bilinmesine rağmen, MIP-AuNPs nanosensörü, optik tabanlı sensörlere kıyasla daha düşük tespit limit değerleri göstermektedir (Çizelge 4.8) [31,32,34,37]

Wang ve arkadaşları penisilinin düşük konsantrasyonlarını tespit etmek için tayin elemanı olarak penisilnaz (Pen X)-eşkenar dörtgen gözenekli karbon kullanan bir elektrokimyasal sensör tasarladı [15]. Baezzat ve arkadaşları ise bir karbon iyonik sıvı Elektrot ve TiO₂ Nano Parçacıklar (NP'ler)/İyonik Sıvı (IL) (oktilpiridinyum iyodür) kullanarak PEN-G'nin tayini için yeni bir sensör tasarladı [16]. Welden ve iş arkadaşları, potansiyometrik sensör (LAPS) kullanarak penisilini tayin ettiler [17]. Bir alan etkili cihaz platformu kullanılarak film oluşturan grafen oksit ve polianilin bazlı biyosensör, Oliveira ve iş arkadaşları tarafından tasarlandı [18]. Pen X adsorpsiyon taşıyıcısı olarak manyetik mezo gözenekli içi boş karbon mikro kürelere (MHM) dayalı yeni bir tür elektrokimyasal sensör, Wang ve arkadaşları tarafından penisilin hızla saptanması için hazırlandı [19]. Yu ve arkadaşları tarafından sütteki Pen-G kalıntısının kantitatif tayini için katlanan tip elektrokimyasal aptasensör geliştirilmiştir [20]. Grafen/tionin (GO/TH) kompozitine dayalı spesifik bir elektrokimyasal reseptör sensörü, Wang ve arkadaşları tarafından süt örneklerinde PEN-G tayini için kullanılmıştır [21]. İki katmanlı bir lipid membran tarafından desteklenen beta-laktamaz ve fullerene dayalı bir elektrokimyasal PEN-G biyosensör, Zhang ve diğerleri tarafından geliştirilmiştir [22]. Xiu ve arkadaşları tarafından kobalt bazlı mezo gözenekli karbon malzeme (Co@C) hazırlandı ve karboksil işlevselleştirmesinden sonra COOH-Co@C, elde edildi. Daha sonra, PEN-X ve PEN-G'yi [23] tayin etmek için kovalent bağlama ile taşıyıcı malzeme üzerinde immobilize edildi. Sığır sütü örneklerindeki PEN-G'nin elektrokimyasal tespiti için Salihu ve arkadaşları nikel nanopartikül modifiye elektrod kullandı [24]. Li ve arkadaşları elektrokimyasal biyosensörler olarak multisegment nanotel/nanopartikül hibrit diziler hazırlamış ve bunları penisilinin tayininde kullanmışlardır [25]. Mohammad ve arkadaşları deneyde indirgenmiş grafen oksit (RGO) ve altın

nanoparçacıklar kullanarak impedimetrik aptasensör hazırlamış ve Penisilin G yi yüksek hassasiyetle tayin etmişlerdir [26]. Nanoyapılı karbon malzemeye (NSCM) dayalı kimyasal dirençli sensörler, geleneksel sensörlere kıyasla yüksek hassasiyetleri, düşük maliyetleri ve basit yapıları nedeniyle farklı analitlerin tespiti için popülerdir [27]. Jablonski ve arkadaşları Al-P-Si-SiO₂-Ta₂O₅-TMV modifiyeli EIS sensörü üretmiş ve Penisilin G tespiti için kullanmışlardır [28]. Schol ve arkadaşları CNT'ler/enzim-lipid LB filmleri geliştirerek Penisilin G'yi tespit etti [29]. Penisilin floresan bazlı bir fiber optik biyosensör ile tayini Xie ve arkadaşları [30] tarafından geliştirilmiştir. Celili ve arkadaşları ikili floroforlar olarak farklı renkli karbon noktaları (CD'ler) ve bir reseptör (B/YCDs@mMIP) olarak mezo gözenekli yapıyı moleküler olarak baskılanmış bir polimer içeren floresan sensör hazırlamış ve sütteki PEN-G tespiti için kullanmışlardır [31]. Amin bağlanmış cam ve dendritik platin nanoparçacıklar kullanılarak sütteki PEN- G kalıntısı kolorimetrik yöntem ile Kwon ve arkadaşları [32] tarafından gerçekleştirilmiştir. PEN-G'nin kolorimetrik tayini için penisilinaz ile fonksiyonlandırılmış iki boyutlu fotonik kristal hidrojel (2DPPCH) biyosensörü geliştirilmiştir [33]. Aghamirzaei ve grubu altın nanopartiküller ile bir konjuge antikor kullanarak beta- laktam antibiyotik olan penisilini tespit etti. Bu amaçla, penisilin kolorimetrik tespiti için Çin marul yaprağı ekstraktından (indirgeyici olarak) sentezlenen altın nanopartiküller kullanıldı. Sonuçlar, antikorun incelenen penisilin 1 nM konsantrasyonuna duyarlı olduğunu gösterdi [34]. Cacciatore ve arkadaşları penisilin bağlayıcı proteini kullanarak sütte β-laktam antibiyotiklerin tespiti için bir optik biyosensör geliştirdi [37] ve 5.2 µg/kg LOD değeri ile tayin etti.

Bu çalışmada, MIP-AuNPs nanosensörünün duyarlılığı ve seçiciliği, AuNPs'in SPR sinyal artırıcı etkisi ve PEN-G moleküllerinin baskılanmasıyla arttırıldı. MIP-AuNPs nanosensör, ekstra uzatıcı kol veya ligand immobilizasyonu gerekmeden PEN-G'yi tayin etmek için kullanılmıştır. PEN-G'nin, AMX ve AMP için sırasıyla 4.45 ve 3.12 olarak belirlenen yüksek bir bağıl seçicilik değeri ile moleküler baskılama yöntemiyle benzer moleküllerinden seçici olarak saptandığı kanıtlanmıştır.

Çizelge 4.7. Penisilin G tayini için kullanılan sensörler.

Malzeme	Metod	LOD	Ref.
Pen X-rhombus gözenekli karbon	elektrokimyasal	$2.68 \times 10^{-7} \text{ mg mL}^{-1}$	[15]
TiO ₂ Nano-Partikül (NPs)/Iyonik Sıvı (IL) (oktilpiridinyum iyodür)	elektrokimyasal	2.09 nM	[16]
n-Si/SiO ₂ /Si ₃ N ₄	elektrokimyasal	-	[17]
polianilin:poli(2-akrilamido-2-metil-1-propan-sülfonik asit) (PANI:PAAMPSA)	elektrokimyasal	$10 \times 10^{-6} \text{ M}$	[18]
magnetic hollow carbon microspheres (MHM)	elektrokimyasal	$2.655 \times 10^{-7} \text{ mg mL}^{-1}$	[19]
Tiyollenmiş ve MB-modifiye aptamerler	elektrokimyasal	1.7 nM	[20]
Grafen/Tiyonin	elektrokimyasal	$0.06 \mu\text{g L}^{-1}$	[21]
beta-Laktamaz bağlı fulleren (C-60) destekli iki tabakalı lipid membran (C-60-s-BLM)	elektrokimyasal	0.6 ng L^{-1}	[22]
Co@C/penisilinaz	elektrokimyasal	0.64 ng mL^{-1}	[23]
NiNPs/APTES	elektrokimyasal	$0.00031 \mu\text{M}$	[24]
Au(L-sistein)-Pt(penisilinaz) nanokablo	elektrokimyasal	$10.5 \mu\text{M}$	[25]
GNP/RGO/PGE	elektrokimyasal	0.8 fM	[26]
MWCNT	elektrokimyasal	-	[27]
Al-p-Si-SiO ₂ -Ta ₂ O ₅ -TMV	elektrokimyasal	$50 \mu\text{M}$	[28]
CNTs/enzim-lipid LB film	elektrokimyasal	-	[29]
penisilinaz	floresan	-	[30]
B/YCDs@mMIPs	floresan	0.34 nM	[31]
platin-nanopartikül	kolorimetrik	1 ng mL^{-1}	[32]
penisilinaz fonksiyonlu fotonik kristal hidrojel	kolorimetrik	-	[33]
Altın nanopartiküller ile konjuge antikor	LSPR	1 nM	[34]

penisilin-bağlı protein 2x	SPR	5.2 µg kg ⁻¹	[37]
MIP-AuNPs	SPR	0.0017 ppb	[Bu çalışma]

4.10. PEN-G tayininin validasyon çalışmaları

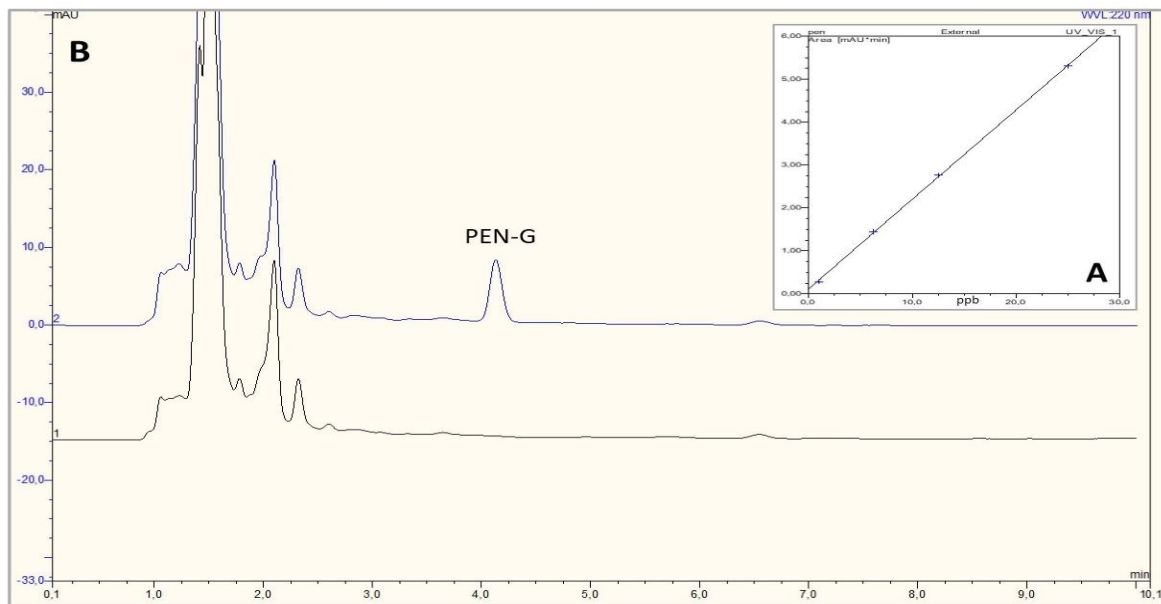
Penisilinler ve sefalosporinler gibi beta-laktam antibiyotikler, insan enfeksiyonlarının tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu antibiyotiklere yiyecek ve su yoluyla sürekli istenmeyen maruziyetin, insanlarda yüksek morbidite ve mortaliteye neden olan antibiyotiğe dirençli bakterilerin patogenezini desteklediği bilinmektedir. Günümüzde veterinerlik endüstrisinde, çiftlik hayvanlarının büyümesini ve tedavisini teşvik etmek için dünya çapında ayırım gözetmeksizin çeşitli tiplerde antibiyotikler kullanılmaktadır. Süt hayvanlarının sütüne değişmeden geçen önemli miktarda antibiyotik insan sağlığına ciddi zararlar vermektedir. Halk sağlığı risklerini ve mali kayıpları önlemek için gıda sektörü ve ilgili makamlar tarafından gıdalarda ilaç kalıntısı izleme ve kontrol programları yürütölmektedir. Sütte antibiyotik kalıntılarını tespit eden birkaç tarama testi ticari olarak mevcuttur. Maksimum kalıntı limitlerinde (MRL) veya üzerindeki penisilin veya sefalosporinlerin varlığı çeşitli yöntemler ile gösterildi.

Günümüzde, PEN-G tayini için HPLC, kapiler elektroforez, spektrofotometre ve elektrokimyasal yöntemler gibi geleneksel teknikler kullanılmaktadır. Ayrıca, spektroskopi ile birleştirilmiş bir çok gelişmiş tayin yöntemi vardır. Bu metodolojiler yüksek hassasiyet ve seçiciliğine sahip olmalarına rağmen, uzun ve karmaşık numune hazırlama süreçleri gerektirmesi, maliyetli olması, uzun analiz süreleri, karmaşık cihazlar gerektirmesi ve yüksek vasıflı personel ihtiyacı gibi dezavantajları vardır. Aynı şekilde, süt ürünlerindeki antibiyotik kalıntılarını anında tespit etmek çözölməsi gereken zorluklardan biri olarak kaldı. Son zamanlarda antibiyotiklerin gıda ve suda hızlı ve yerinde tespiti için bir optik temelli biyosensöler geliştirilmiş ve test edilmiştir.

Sensörler, bazı nanomalzeme veya polimeri kullanarak deteksiyon sınırını düşürme, spesifik ve seçici olma avantajına sahiptir [84]. SPR tekniği, bir metal film üzerinde meydana gelen çeşitli işlemlere karşı oldukça hassastır ve yüzeyde meydana gelen moleküler bağlanma işlemlerini incelemek için güçlü bir etiketsiz yöntem olarak ortaya çıkmıştır. Bu araştırma ile, SPR tabanlı PEN-G tayini için basit, etkili, hassas, toksik olmayan, çevre dostu bir yöntem rapor edilmiştir. Deneyler, sensör çipine PEN-G antibiyotiğinin baskılanmasından sonra yapıldı. Farklı konsantrasyonlarda PEN-G çözeltileri hazırlayarak

ve SPR çip sisteminden geçirilerek 3 dakika boyunca rezonans açısındaki kayma ölçüldü. Ayrıca, sensör çipine PEN-G baskılandıktan sonra, reaksiyon sırasında rezonans açısındaki kaymayı ölçtük. Rezonans açısındaki kayma, SPR nanosensörü ile reaksiyona giren PEN-G'yi saptamak için ölçülmüştür. MIP-AuNPs nanosensörü tarafından süt numunelerindeki PEN-G'nin seçici olarak tayin edilmesi, HPLC sistemi kullanılarak doğrulandı. MIP-AuNPs nanosensörü tarafından PEN-G tayininin validasyonu, HPLC analizleri ile gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon eğrisi için 1, 6.25, 12.5, 25 ppb konsantrasyonlarında PEN-G çözeltileri hazırlanarak HPLC sistemine verildi. PEN-G antibiyotiğini içeren süt numunesi çözeltisi, PEN-G antibiyotiği eklenerek hazırlandı ve ters fazlı C18 kolonu ile analiz edildi.

PEN-G'nin stok olarak hazırlanan çözeltisi, 10 mM amonyum asetat:asetonitril (75:25, h/h) karışımı içinde 1 mg.mL⁻¹ konsantrasyonunda hazırlandı. Kalibrasyon için kullanılan çözeltiler hazırlanan stok çözeltinin asetat:asetonitril (75:25, h/h) karışımı ile seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. HPLC sistemi kullanılarak 220 nm'de yapılan analizler ile PEN-G miktarı izokratik elüsyon sistemi ile belirlendi. Mobil faz olarak, 10 mM amonyum asetat ve asetonitril çözeltisinin (75:25, h/h) karışımı kullanıldı. 5 ppb konsantrasyonda olacak şekilde PEN-G eklenmiş süt çözeltisindeki PEN-G miktarının, SPR tarafından tahmin edilen sonuçlarla doğru orantılı olduğu tespit edildi. Kalibrasyon eğrisinin kromatogramı ve 5 ppb PEN-G katkılanmış süt numunesi Şekil 4.21' de gösterilmiştir.



Şekil 4.21. PEN-G'nin HPLC ile analizi A) 1.0-25 ppb PEN-G çözeltisi için kalibrasyon eğrisi B) 5 ppb PEN-G katkılanmış ve katkılanmamış süt örneği.

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

- Çalışma kapsamında PEN-G tayininde kullanılan MIP-AuNPs SPR nanosensör sinyal artırıcı AuNPs'in eklenmesiyle hazırlanmıştır. Tayin limitini düşürerek hassasiyeti artırmak için eklenen AuNPs'in konsantrasyonunu belirlemek amacı ile öncelikle AuNPs'in boyut dağılımı Nano Zetasizer boyut analizörü kullanılarak ölçülmüştür. Düşük polidispersite indeks değerinden (PDI=0.116) homojen bir ortalama boyut dağılımına sahip monodispers AuNPs'in elde edildiği ve AuNPs'in ortalama boyutu üç kez (n=3) tekrarlanan ölçümler sonucunda 23.88 nm olarak belirlendi. AuNPs'in konsantrasyonu, zeta boyut analizi ile belirlenen ortalama AuNPs'in ortalama boyutu kullanılarak $3,3 \times 10^{-7}$ M olarak hesaplandı.
- PEN-G tayini için hazırlanan MIP-AuNPs SPR nanosensör için kullanılan MAC monomeri, AuNPs ile MAC-AuNPs ön-kompleks yapıcı, MAPA ise hedef molekül PEN-G ile MAPAPEN-G ön-kompleks yapıcı olarak fonksiyonel monomer olarak kullanılmıştır. MAC-AuNPs ve MAPAPEN-G ön-komplekslerin oluşumu UV-VIS spektrofotometre ve FTIR-ATR spektrometre ile doğrulandı.
- MAC-AuNPs'in ön kompleksinin spektrofotometrik ölçümleri incelendiğinde, AuNPs ile MAC monomerin kompleksleşmesi dalga boyu kayması ile doğrulanmaktadır. Aynı şekilde UV-VIS spektrofotometrede görüldüğü üzere, fonksiyonel MAPA monomeri ve kalıp PEN-G molekülünün kompleksleşmesi ise MAPA monomerine ait 280 nm de görülen omuzun MAPAPEN-G kompleksleşmesinden sonra yok olmasıyla doğrulanmıştır.
- MAC monomeri ile AuNPs'in kompleksleşerek MAC-AuNPs ön-kompleks oluşturması FTIR-ATR spektroskopisi ile doğrulanmıştır. MAC monomerinin amid I ve amid II bantlarına ait karakteristik titreşim bantları sırasıyla 1452 cm^{-1} ve 1523 cm^{-1} 'de görülürken, -OH grubuna ait bant ise 3347 cm^{-1} 'de gözlenmektedir. Karboksilik asite ait (C=O) gerilme bandı 1726 cm^{-1} 'de iken -SH grubuna ait gerilme bandı ise 2867 cm^{-1} 'de görülmektedir. MAC-AuNPs ön kompleksine ait spektrumda -SH gerilme bantlarının olmaması, AuNPs'in MAC monomerindeki sistein grubu ile koordinasyon yaptığını göstermektedir.

- MAPA monomerine ve MAPAPEN-G ön-kompleksine ait FTIR-ATR spektrumu incelendiğinde ise MAPA monomerindeki benzen halkasının 2950 cm^{-1} 'deki $\text{C}=\text{C}$ grubuna ait bandın 2975 cm^{-1} 'e kayması, 1652 cm^{-1} 'deki bandın 1661 cm^{-1} 'e kayması ve 1615 cm^{-1} 'deki bandın şiddetinin azalması MAPAPEN-G ön-kompleksin oluşuğunu doğrulamaktadır.
- MIP-AuNPs SPR nanosensörü hazırlanmak için, MAC-AuNPs ve MAPAPEN-G ön-komplekslerden, hidrofilik monomer HEMA, çapraz bağlayıcı EDMA ve AIBN başlatıcısı varlığında nanofilm elde edilmiştir.
- Kalıp molekül PEN-G'nin, MIP-AuNPs SPR nanosensörden uzaklaştırılması için metanol:asetik asit karışımı (80:20, v/v%) desorpsiyon çözeltisi olarak kullanılmıştır.
- PEN-G baskılanmamış NIP-AuNPs SPR nanosensör, kalıp molekül PEN-G eklenmeden, MIP-AuNPs SPR nanosensör hazırlanması için kullanılan reçete kullanılarak hazırlanmıştır.
- Çalışma kapsamında, AuNPs ile modifiye edilmiş amino asit bazlı monomerler kullanılarak hazırlanan SPR nanosensörünün duyarlılığını artırmak için deneysel bir metodoloji geliştirildi. Deteksiyon limitini düşürmek için polimer karışımına sinyal artırıcı olarak eklenen AuNPs'in etkisini görmek amacıyla üretilen MIP nanosensör, MIP-AuNPs SPR nanosensör hazırlanırken kullanılan reçete ile hazırlanmış, sadece AuNPs eklenmemiştir.
- PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs ve PEN-G baskılanmış ama AuNPs eklenmemiş MIP ve PEN-G baskılanmamış NIP-AuNPs SPR nanosensörlerin fonksiyonel grup karakterizasyonları FTIR-ATR ile gerçekleştirilmiştir.
- MIP-AuNPs ve MIP, NIP-AuNPs SPR nanosensörlerinin FTIR-ATR spektrumu karşılaştırıldığında, polimerik yapıya PEN-G molekülü ve AuNPs girdiği tespit edilmiştir. Hazırlanan MAC-AuNPs ön-kompleksinin, MIP-AuNPs nanosensörünün polimerik yapısına başarıyla dahil olduğu FTIR-ATR spektrumu ile doğrulanmıştır. FTIR-ATR spektrumu incelendiğinde 1643 cm^{-1} ve 1596 cm^{-1} dalga sayılarında görülen amid I ve amid II bantları PEN-G molekülünün yapıya entegre olarak baskılama işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.

- MIP-AuNPs ve NIP-AuNPs SPR nanosensörlerin yüzey özellikleri ise AFM, Ellipsometre ve Temas açısı ölçümleriyle karakterize edilmiştir.

- PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs nanosensörünün yüzey derinliği AFM görüntüleri ile 51.37 ± 2.46 nm olarak tespit edilirken, baskılanmamış NIP-AuNPs nanosensörün yüzey derinliği 70.68 ± 1.39 nm olarak tespit edilmiştir. MIP-AuNP'ler ve NIP-AuNPs nanosensörlerin yüzey derinlik değerleri arasındaki fark baskılama işleminin başarıyla gerçekleştirildiğini göstermektedir.

PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs ve baskılanmamış NIP-AuNPs SPR nanosensörlerin ortalama yüzey kalınlığı elipsometre cihazı kullanılarak ölçülmüştür. MIP-AuNPs ve NIP-AuNPs SPR nanosensörler için hesaplanan ortalama kalınlık değerleri sırası ile 77.5 ± 0.4 ve 66.5 ± 0.2 nm'dir.

PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs ve baskılanmamış NIP-AuNPs SPR nanosensörlerin yüzey ıslanabilirlikleri hidrofilik özelliklerinin temas açısı ölçülerek tespit edilmiştir. Su temas açısı ölçümlerinden görüldüğü gibi PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs SPR nanosensör yüzeyin temas açısı değeri $76.6^\circ \pm 0.5$ olarak kaydedilirken, baskılanmamış NIP-AuNPs SPR nanosensör için su temas açısı $70.2^\circ \pm 0.7$ dir. PEN-G baskılanması sonucu temas açısının artmış olmasının sebebi moleküler baskılama ile PEN-G'nin MAPA'ya koordinasyonu sonucunda yüzeyin hidrofobikliğin artmış olmasıdır.

- MIP-AuNPs, MIP ve NIP-AuNPs SPR nanosensörler hazırlandıktan sonra farklı konsantrasyonlardaki PEN-G çözeltisi için verilen sinyal yanıtının karşılaştırılabilmesi amacı ile MIP-AuNPs SPR nanosensör ile kinetik çalışmalara geçilmiştir.

MIP-AuNPs SPR nanosensöre farklı derişimlerde hazırlanmış PEN-G çözeltileri uygulanmıştır. Derişimlerin artması ile birlikte sensör yanıtı olan ΔR değerlerinde de bir artış görülmüştür. Bunun muhtemel nedeni nanosensör yüzeyi ile çözelti arasındaki sürücü güç olan derişim farkının artmasıdır. Derişimin artmasıyla sensör yanıtı ΔR değerlerinin arttığı, ΔR 'ye karşılık zaman grafikleri çizildiğinde açık bir şekilde görülmektedir.

- MIP-AuNPs SPR nanosensör PEN-G nin iki farklı konsantrasyon aralığı için iki farklı

bağlanma davranışı göstermektedir. 0.01-0.25 ppb derişim aralığında alınan veriler değerlendirilip, MIP-AuNPs SPR nanosensörün PEN-G için, derişim-yüzde reflektivite değişimi doğrusallığı incelendiğinde doğrunun denklemi ve doğrusallığı $y=32.643x+0.6395$; $R^2 =0.9992$ olarak kaydedilirken 0.5-5 ppb derişim aralığı için $y=3.5122x+5.7072$; $R^2 = 0.9048$ olarak hesaplanmıştır. İki farklı konsantrasyon aralığı için iki farklı doğru denkleminin olması, PEN-G moleküllerinin iki farklı bağlanma kinetiği gösterdiğini açıklamaktadır. Kinetik analizlerde düşük konsantrasyonlar için ΔR 'ye karşılık zaman grafikleri çizildiğinde elde edilen doğru denkleminin yüksek regresyon katsayısı düşük konsantrasyonlardaki bağlanmanın yüksek afinite ile gerçekleştiğini göstermektedir. Başka bir deyişle; hazırlanan MIP-AuNPs SPR nanosensör, 0.01-0.25 ppb konsantrasyon aralığında %99.92 doğrulukta ölçüm yapabilmektedir.

- Langmuir adsorpsiyon izoterm modelinin hazırlanan MIP-AuNPs SPR nanosensörün PEN-G tayini için model olduğu görülmüştür. 31.25 olarak hesaplanan ΔR_{maks} değerinin deneysel bulunan ΔR_{maks} değerinin değerine (30.10) oldukça yakın olduğu tespit edilmiştir. Langmuir denkleminde hesaplanan bağlanma ve ayrılma sabitleri olan K_A ve K_D değerleri sırasıyla 1.3278 ve 0.7531 olarak hesaplanmıştır.
- PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs SPR nanosensörün PEN-G tayini için seçiciliğini tespit etmek amacıyla, PEN-G ye şekil ve büyüklük bakımından benzeyen yarışmacı moleküller olan AMX ve AMP antibiyotikleri kullanılmış ve MIP-AuNPs SPR nanosensörün verdiği sinyalin cevabı incelenmiştir.

Hazırlanan PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs SPR nanosensörün ve baskılanmamış NIP-AuNPs SPR nanosensörün PEN-G'ye karşı seçiciliğinin belirlenmesi için yarışmalı adsorpsiyon çalışmaları AMX ve AMP antibiyotiklerin çözeltileri uygulanarak gerçekleştirilmiştir. PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs SPR nanosensörün PEN-G için verdiği sinyal yanıtı ΔR : 8.39 iken, aynı derişimlerde hazırlanan AMX ve AMP çözeltilerine verdiği sinyal değeri sırasıyla 0.85 ve 0.50'dir. Bu sonuçlara göre hazırlanan PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs SPR nanosensörün PEN-G'yi AMX göre 9.87, AMP'ye göre 16.78 kat hassas tayin edebildiği tespit edilmiştir. Bu duyarlılığın muhtemel sebebi kalıp moleköl olan PEN-G'nin üç boyutlu yapısının moleköler baskılanmış yapıdaki kalıcı belleğe aktarılmasından ileri gelmektedir.

Baskılamanın PEN-G'nin seçici tayinine olan etkisi, PEN-G baskılanmamış NIP-AuNPs SPR nanosensörün PEN-G ve yarışmacı ajan olarak kullanılan AMX ve AMP yi tayin ederken hesaplanan seçicilik katsayıları ile belirlenmiştir. PEN-G baskılanmış MIP-AuNPs SPR nanosensör PEN-G yi, PEN-G baskılanmamış NIP-AuNPs SPR nanosensörün PEN-G' yi AMX ve AMP ye göre sırası ile 3.60 ve 4.53 kat daha seçici tayin etmiştir.

- Baskılamanın PEN-G'nin seçici tayinine olan etkisi, PEN-G baskılanmamış NIP- AuNPs SPR nanosensörün PEN-G'yi tayin ederken verdiği SPR sinyalinin %Reflektivite değişimi olarak ölçülmesiyle hesaplanmıştır. PEN-G'nin baskılanmış MIP-AuNPs SPR nanosensör ve, PEN-G baskılanmamış NIP-AuNPs SPR nanosensör karşılaştırıldığında, sinyal yanıtının 8.39'dan 1.07'ye düştüğü tespit edilmiştir. Baskılama faktörünün $\Delta R_{MIP}/\Delta R_{NIP}=7.83$ olarak hesaplanması baskılama işleminin etkin bir şekilde başarıldığını göstermektedir.
- MIP-AuNPs nanosensörünün PEN-G tayini için verdiği sinyal yanıtı tekrarlanabilirlik çalışmaları, gün içi testler için (üç grup halinde beş tekrarlı) istatistiksel olarak değerlendirildi ve tekrarlanabilirliğin doğruluğu, yüzde görel standart sapma (%RSD) değeri hesaplanarak incelendi. %RSD olarak ifade edilen gün içi deneylerin sonuçlarının, <1.1'den daha düşük olarak rapor edilmesi hazırlanan MIP-AuNPs nanosensörünün PEN-G tayininde verdiği sensör yanıtında kayda değer düşüş olmadığını göstermektedir.
- PEN-G tayini için MIP-AuNPs nanosensörün hassasiyetini artırmak için kullanılan AuNPs'in etkisi, AuNPs eklenmeden hazırlanan MIP nanosensörle tayin edilmiştir. Aynı konsantrasyon için MIP-AuNPs nanosensörün verdiği sinyal yanıtı 8.39 iken, MIP nanosensörün verdiği cevap 2.93 olup, AuNPs hassasiyeti 2.86 kat artırmıştır.
- PEN-G'nin süt örneği içindeki miktarı, süt içerisinde bulunan bileşenlerin seçici PEN- G tayini üzerindeki matris etkisi incelenerek bulunmuştur. Bu amaçla PEN-G'nin süt örneği içindeki miktar tayini için MIP-AuNPs nanosensör kullanılmış olup, bilinen PEN-G konsantrasyonuna sahip olabilecek şekilde PEN-G'nin süt örneğine eklenmesiyle hazırlandı. PEN-G seviyesini belirlemek için, MIP-AuNPs nanosensörü,

PEN-G eklenmiş (5 ppb olacak şekilde) süt numunesi çözeltisi ile etkileştirildi ve ΔR değerinin 28.54 olduğu belirlendi. Bu sonucun, 5 ppb PEN-G içeren sulu çözelti uygulanarak elde edilen sinyal değerinden daha düşük sinyal şiddeti ($\Delta R=30.10$) içerdiği tespit edildi. Süt numunelerinde doğal olarak bulunan moleküllerin sterik bir etki sergilemesi veya yarışmacı bir ajan gibi davranmasının düşük sinyal yanıtına sebep olduğu tespit edildi.

- MIP-AuNPs nanosensörün verdiği SPR sinyal yanıtlarının doğrulanması için HPLC sistemi kullanıldı. Bu amaçla süt numunelerindeki PEN-G'nin seçici olarak tayin edilmesi, HPLC sistemi ile valide edildi. MIP-AuNPs nanosensörü tarafından PEN-G tayininin validasyonu, HPLC analizleri ile gerçekleştirilmiştir. Öncelikle kalibrasyon eğrisi için 1, 6.25, 12.5, 25 ppb konsantrasyonlarında PEN-G çözeltileri hazırlanarak HPLC sistemine verildi. PEN-G antibiyotiğini içeren süt numunesi çözeltisi, PEN-G antibiyotiği eklenerek hazırlandı ve ters fazlı C18 kolonu ile analiz edildi. 5 ppb konsantrasyonda olacak şekilde PEN-G eklenmiş süt çözeltisindeki PEN-G miktarının, SPR tarafından ölçülen sonuçlarla doğru orantılı olduğu tespit edildi.

6. KAYNAKLAR

- [1] B. Chen, M. Ma, X. Su, *Analytica Chimica Acta* **2010**, 674, 89–95.
- [2] Council Regulation No. 37, Official Journal of the European Communities, L 15 **2010**, pp. 1-72.
- [3] O. G. Nagel, M. C. Beltrán, M. P. Molina, R. L. Althaus, *Small Ruminant Research* **2012**, 102, 26–31.
- [4] G. Van Royen, P. Dubruel, S. Van Weyenberg, E. Daeseleire, *Journal of Chromatography B* **2016**, 1025, 48–56.
- [5] M. Martínez-Huelamo, E. Jiménez-Gámez, M. P. Hermo, D. Barrón, J. Barbosa, *Journal of Separation Science* **2009**, 32, 2385–2393.
- [6] F. A. Ibrahim, J. J. M. Nasr, *Analytical Methods* **2014**, 6, 1523.
- [7] Z. Huang, X.-D. Pan, B.-F. Huang, J.-J. Xu, M.-L. Wang, Y.-P. Ren, *Food Control* **2016**, 66, 145–150.
- [8] A. Pollap, J. Kochana, *Biosensors* **2019**, 9, 61.
- [9] A. Pennacchio, A. Varriale, A. Scala, V. M. Marzullo, M. Staiano, S. D'Auria, *Food Chemistry* **2016**, 190, 381–385.
- [10] M.-Y. Piñero, R. Bauza, L. Arce, M. Valcárcel, *Talanta* **2014**, 119, 75–82.
- [11] A. Poghosian, M.H. Abouzara, A. Razavi, M. Bäcker, N. Bijnens, O.A. Williams, K. Haenen, W. Moritz, P. Wagner, M.J. Schöning, *Electrochimica Acta* **2009**, 54 5981–5985.
- [12] A.-Y. Lee, N.-R. Ha, I.-P. Jung, S.-H. Kim, A.-R. Kim, M.-Y. Yoon, *Analytical Biochemistry* **2017**, 531, 1–7.
- [13] L. M. Gonçalves, W. F. A. Callera, M. D. P. T. Sotomayor, P. R. Bueno, *Electrochemistry Communications* **2014**, 38, 131–133.
- [14] T. Kharewal, N. Verma, A. Gahlaut, V. Hooda, *Biotechnology Letters* **2020**, 42, 1829–1846.
- [15] H. Wang, L. Wang, Y. Xiu, S. Zhang, S. Wang, X. Niu, *Journal of Food Science* **2021**, 86, 3505–3516.

- [16] M. R. Baezzat, Z. Pourghobadi, R. Pourghobadi, *Materials Chemistry and Physics* **2021**, 270, 124641.
- [17] R. Welden, M. Jablonski, C. Wege, M. Keusgen, P. H. Wagner, T. Wagner, M. J. Schöning, *Biosensors*, **2021**, 11, 171.
- [18] D. A. Oliveira, D. Molinnus, S. Beging, J. R. Siqueira, M. J. Schöning, *physica status solidi (a)* **2021**, 218, 2000747.
- [19] L. Wang, Y. Xiu, B. Han, L. Liu, X. Niu, H. Wang, *Journal of Food Science* **2020**, 85, 2435–2442.
- [20] Z. Yu, P. Cui, Y. Xiang, B. Li, X. Han, W. Shi, H. Yan, G. Zhang, *Microchemical Journal* **2020**, 157, 105077.
- [21] L. Wang, L. Zhang, Y. Wang, Y. Ou, X. Wang, Y. Pan, Y. Wang, L. Huang, G. Cheng, S. Xie, et al., *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, 21, 3306.
22. Y. Zhang, *Int. Journal of Electrochemical Science* **2020**, 12007–12014.
- [23] Y. Xiu, R. Luo, B. Han, L. Liu, H. Wang, *Food Analytical Methods* **2020**, 13, 617–628.
- [24] S. Salihu, N. A. Yusof, F. Mohammad, J. Abdullah, and H. A. Al-Lohedan, *Hindawi Journal of Nanomaterials* **2019**, 1784154, 1-11.
- [25] Z. Li, C. Liu, V. Sarpong, Z. Gu, *Biosensors and Bioelectronics* **2019**, 126, 632–639.
- [26] A. Mohammad-Razdari, M. Ghasemi-Varnamkhasti, Z. Izadi, A. A. Ensafi, S. Rostami, M. Siadat, *Microchimica Acta* **2019**, 186, DOI 10.1007/s00604-019-3510-x.
- [27] M. Moutab Sahihazhar, M. T. Ahmadi, M. Nouri, M. Rahmani, *Journal of Solid State Electrochemistry* **2019**, 23, 1641–1650.
- [28] A. Poghosian, M. Jablonski, C. Koch, T. S. Bronder, D. Rolka, C. Wege, M. J. Schöning, *Biosensors and Bioelectronics* **2018**, 110, 168–174.
- [29] F. A. Scholl, P. V. Morais, R. C. Gabriel, M. J. Schöning, J. R. Siqueira, L. Caseli, *ACS Applied Materials & Interfaces* **2017**, 9, 31054–31066.
- [30] X. Xie, A. A. Suleiman, G. G. Guilbault, *Biotechnology and Bioengineering* **1992**, 39, 1147-1150.

- [31] R. Jalili, A. Khataee, M.-R. Rashidi, A. Razmjou, *Food Chemistry* **2020**, *314*, 126172.
- [32] D. Kwon, H. Yoo, H. Lee, S. Jeon, *Sensors and Actuators B: Chemical* **2018**, *255*, 552–556.
- [33] C. Wang, F. Xiao, Q. Chen, S. Wang, J. Zhou, Z. Wu, *The Analyst* **2021**, *146*, 502–508.
- [34] M. Aghamirzaei, M. S. Khiabani, H. Hamishehkar, R. R. Mokarram, M. Amjadi, *Journal of Applied Spectroscopy* **2021**, *88*, 233–241.
- [35] Y. Saylan, F. Yılmaz, A. Derazshamshir, E. Yılmaz, A. Denizli, *Journal of Molecular Recognition* **2017**, *30*, e2631.
- [36] F. Fathi, M.-R. Rashidi, Y. Omid, *Talanta* **2019**, *192*, 118–127.
- [37] G. Cacciatore, M. Petz, S. Rachid, R. Hakenbeck, A. A. Bergwerff, *Analytica Chimica Acta* **2004**, *520*, 105–115.
- [38] K. Zhang, H. Li, W. Wang, J. Cao, N. Gan, H. Han, *ACS Sensors* **2020**, *5*, 3721–3738.
- [39] O. Çakır, M. Bakhshpour, I. Göktürk, F. Yılmaz, Z. Baysal, *Journal of Molecular Recognition* **2021**.
- [40] Seyda ERGIN KAYA, Ayhan FILAZI, Determination of Antibiotic Residues in Milk Samples. *Kafkas Uni. Vet. Fak. Derg.* 16 (Suppl-A): **2010**, S31-S35.
- [41] Paniel, N., Istamboulié, G., Triki, A., Lozano, C., Barthelmebs, L., & Noguier, T. Selection of DNA aptamers against penicillin G using Capture-SELEX for the development of an impedimetric sensor. **2017** *Talanta*, *162*, 232–240.
- [42] Junza, A., Dorival-García, N., Zafra-Gómez, A., Barrón, D., Ballesteros, O., Barbosa, J., & Navalón, A. **2014**, *Journal of Chromatography A*, *1356*, 10–22.
- [43] Babington R, Matas S, Marco MP, Galve R. Current bioanalytical methods for detection of penicillins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2012**, *403*(6):1549-1566.
- [44] K. Kivirand, M. Kagan, T. Rinken, Biosensors for the detection of antibiotic residues in milk, T. Rinken (Ed.), Biosensors – Micro and Nanoscale Applications, *IntechOpen*, **2015**, pp. 425-456.

- [45] Available online: https://ec.europa.eu/food/safety/chemical-safety/residues-veterinary-medicinal-products_en (02.11.2021)
- [46] Kantiani, L., Farré, M., Barceló, D., & Barceló, D. Analytical methodologies for the detection of β -lactam antibiotics in milk and feed samples. *Trac Trends in Analytical Chemistry*, **2009**, 28(6), 729–744.
- [47] Bishop, J. R., Bodine, A. B., O'Dell, G. D., & Janzen, J. J. Retention Data for Antibiotics Commonly Used for Bovine Infections. *Journal of Dairy Science*, **1984**, 67(2), 437–440.
- [48] Bishop, J. R., Bodine, A. B., O'Dell, G. D., & Janzen, J. J. **1985**, Quantitative Assay for Antibiotics Used Commonly in Treatment of Bovine Infections. *Journal of Dairy Science*, 68(11), 3031–3036.
- [49] Riediker, S., & Stadler, R. H. **2001**, Simultaneous Determination of Five β -Lactam Antibiotics in Bovine Milk Using Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 73(7), 1614–1621.
- [50] Cámara, M., Gallego-Picó, A., Garcinuño, R. M., Fernández-Hernando, P., Durand-Alegría, J. S., & Sánchez, P. J. **2013**. An HPLC-DAD method for the simultaneous determination of nine β -lactam antibiotics in ewe milk. *Food Chemistry*, 141(2), 829–834.
- [51] Kim, J.-I., Park, J.-M., Noh, J.-Y., Hwang, S.-J., Kang, M.-J., & Pyun, J.-C. **2016**, Analysis of benzylpenicillin in milk using MALDI-TOF mass spectrometry with top-down synthesized TiO₂ nanowires as the solid matrix. *Chemosphere*, 143, 64–70.
- [52] Holstege, D. M., Puschner, B., Whitehead, G., & Galey, F. D. **2002**, Screening and Mass Spectral Confirmation of β -Lactam Antibiotic Residues in Milk Using LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(2), 406–411.
- [53] Liu, W.-L., Wu, C.-Y., Li, Y.-T., & Huang, H.-Y. **2012**, Penicillin analyses by capillary electrochromatography-mass spectrometry with different charged poly(stearyl methacrylate–divinylbenzene) monoliths as stationary phases. *Talanta*, 101, 71–77.
- [54] Turner, A. P. F. **2013**. Biosensors: sense and sensibility. *Chemical Society Reviews*, 42(8), 3184.

- [55] Justino, C. I. L., Freitas, A. C., Pereira, R., Duarte, A. C., & Rocha Santos, T. A. P. **2015**. Recent developments in recognition elements for chemical sensors and biosensors. *Trac Trends in Analytical Chemistry*, 68, 2–17.
- [56] Xiao, F., Li, G., Wu, Y., Chen, Q., Wu, Z., & Yu, R. **2016**. Label-Free Photonic Crystal-Based β -Lactamase Biosensor for β -Lactam Antibiotic and β -Lactamase Inhibitor. *Analytical Chemistry*, 88(18), 9207–9212.
- [57] Gustavsson, E., Degelaen, J., Bjurling, P., & Sternesjö, Å. **2004**. Determination of β -Lactams in Milk Using a Surface Plasmon Resonance-Based Biosensor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(10), 2791–2796.
- [58] Chen, L., Wang, X., Lu, W., Wu, X., & Li, J. **2016**. Molecular imprinting: perspectives and applications. *Chemical Society Reviews*, 45(8), 2137–2211.
- [59] Saylan, Y., Yilmaz, F., Özgür, E., Derazshamshir, A., Yavuz, H., & Denizli, A. **2017**. Molecular Imprinting of Macromolecules for Sensor Applications. *Sensors*, 17(4), 898.
- [60] Liu, J.; Yang, K.; Deng, Q.; Li, Q.; Zhang, L.; Liang, Z.; Zhang, Y., **2011**. Preparation of a new type of affinity materials combining metal coordination with molecular imprinting. *Chemical Communications*, 47(13): 3969-3971.
- [61] Wulff, G., Molecular Imprinting in Cross-Linked Materials with the Aid of Molecular Templates— A Way towards Artificial Antibodies. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 34(17): 1812-1832. **1995**.
- [62] Yilmaz, E.; Haupt, K.; Mosbach, K., The Use of Immobilized Templates—A New Approach in Molecular Imprinting. *Angewandte Chemie International Edition*, 39(12): 2115-2118. **2000**.
- [63] Bo Liedberg, Claes Nylander, Ingemar Lundström, Biosensing with surface plasmon resonance — how it all started, *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 10, Issue 8, **1995**, Pages i-ix, ISSN 0956-5663.
- [64] Homola, J., & Piliarik, M. Surface Plasmon Resonance (SPR) Sensors. In Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors, pp. 45–67. *Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors*. **2006**.

- [65] Safran, V., Göktürk, I., Derazshamshir, A., Yılmaz, F., Sağlam, N., & Denizli, A. **2019**. Rapid sensing of Cu²⁺ in water and biological samples by sensitive molecularly imprinted based plasmonic biosensor. *Microchemical Journal*, 148, 141–150.
- [66] Bereli, N., Bakhshpour, M., Topçu, A. A., & Denizli, A. **2021**. Surface Plasmon Resonance-Based Immunosensor for Igm Detection with Gold Nanoparticles. *Micromachines*, 12(9), 1092. 67. [67] Akgönüllü, S., Armutcu, C., & Denizli, A., Molecularly imprinted polymer film based plasmonic sensors for detection of ochratoxin A in dried fig. *Polymer Bulletin*, **2021**.
- [68] Kawazumi, H., Gobi, V., Ogino, K., Maeda, H., Miura, N., Compact surface plasmon resonance (SPR) immunosensor using multichannel for simultaneous detection of small molecule compounds, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 108, 791–796, **2005**.
- [69] Špačková B, Wrobel P, Bocková M, Homola J. Optical biosensors based on plasmonic nanostructures: a review. *Proc IEEE* **2016**;104;2380–408.
- [70] Wei, T., Ren, P., Huang, L. et al. **2019**. *Food Chemistry* 300: 125176.
- [71] Kaushik, S., Tiwari, U.K., Deep, A., and Sinha, R.K. **2019**. *Scientific Reports* 9: 6987.
- [72] Saleh, S.M., Alminderej, F.M., Ali, R., and Abdallah, O.I. **2020**. *Spectrochimica Acta – Part A Molecular Biomolecular Spectroscopy* 229: 117971.
- [73] Kaya, T., Nagatoishi, S., Nagae, K. et al. **2019**. *PLoS One* 14: 1–16.
- [74] Wong, C.L., Dinish, U.S., Buddharaju, K.D. et al. **2014**. *Applied Physics A: Materials Science and Processing* 117: 687–692.
- [75] B.V. Enustun and J. Turkevich, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 3317–3328.
- [76] X. Liu, M. Atwater, J. Wang and Q. Huo, *Colloids Surf. B*, **2007**, 58, 3–7.
- [77] F. Yılmaz, Y. Saylan, S. Akgönüllü, D. Çimen, A. Derazshamshir, N. Bereli, A. Denizli, Surface plasmon resonance based nanosensors for detection of triazinic pesticides in agricultural foods, *New Pesticides and Soil Sensors* 18, **2017**, pp. 679–718.
- [78] WHO. Technical Report Series No. 430. **1969**.
- [79] A. Ramirez, R. Gutierrez, G. Diaz, C. Gonzalez, N. Perez, S. Vega, M. Noa, *J Chrom. B*, **2003**, 784, 315–322. M
- [80] Joshua M. Sila, Peterson M. Guto, Immaculate N. Michira, Francis B. Mwaura, Edward K. Muge, Electrochemical Determination of Penicillin G in Cow Milk and pharmaceuticals in SDS/Acetate buffer, *Int. J. Electrochem. Sci.*, 16, **2021**.

- [81] Kroger, S., Piletsky, S., Turner, A.P.F., Biosensors for marine pollution research, monitoring and control, *Marine Pollution Bulletin*, 45, 24–34, **2002**.
- [82] Homola, J., Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species, *Chemical Reviews*, 108, 462-493, **2008**.
- [83] Y. Saylan, S. Akgönüllü, D. Çimen, A. Derazshamshir, N. Bereli, F. Yılmaz, A. Denizli, *Sensors and Actuators B: Chemical* **2017**, 241, 446–454.
- [84] M. David, M. Florescu, C. Bala, *Biosensors*, **2020**, 10, 112.

EKLER

EK 1 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu

