

**KURKUMİN TAYİNİNE YÖNELİK YÜZEY PLAZMON  
REZONANS TEMELLİ NANOSENSÖRLERİN  
HAZIRLANMASI**

**PREPARATION OF SURFACE PLASMON RESONANCE  
BASED NANOSENSORS FOR CURCUMIN DETECTION**

**ŞEBNEM ÇIKRIK**

**PROF. DR. ADİL DENİZLİ**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2021

**Ansızın kaybettiğim, çok sevdiğim canım babam**

**ŞEFİK AÇIKBAŞ'ın anısına...**

## ÖZET

# KURKUMİN TAYİNİNE YÖNELİK YÜZEY PLAZMON REZONANS TEMELLİ NANOSENSÖRLERİN HAZIRLANMASI

**ŞEBNEM ÇIKRIK**

**Doktora, Biyomühendislik Bölümü**

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

**Eş Danışman: Doç. Dr. Nilay BERELİ**

**Aralık 2021, 107 sayfa**

Bitkisel kaynaklı bileşenler alternatif ve tamamlayıcı tıpta en çok kullanılan ürünlerdendir. Hint safranı veya zerdeçal olarak bilinen *Curcuma longa* bitkisinden elde edilen kurkumin gerek antikanser gerekse antioksidan özelliğinden dolayı son yıllarda oldukça popüler hale gelmiştir. Özellikle çeşitli alanlardaki moleküler hedeflerle etkileşebilme yeteneğinden dolayı pek çok kanser türünde farklı mekanizmalarla kemoterapiyi destekleyici yönde etki göstermektedir. Ayrıca sağlık alanındaki olağanüstü etkilerinin yanısıra zerdeçal, dünya mutfağında kuru zerdeçal olarak pazarlanan önemli bir baharattır. Gerek sağlık alanında gerekse gastronomi alanında piyasada birçok zerdeçal içerikli ürünler bulunmaktadır. Fakat bu ürünlerde zerdeçal tozu diğer bazı *Curcuma* türlerinin tozlarının yanı sıra yabancı nişasta ve farklı baharatlar ile karıştırılabilmektedir. Bu durum ise halk sağlığını tehdit etmekte olup, ekonomik ve sosyal açısından da kaliteyi düşürmektedir. Dolayısıyla mevzuata ve izin verilen özelliklerine aykırı olarak zerdeçal içerikli ticari ürünlerin kontrolünün yapılması önem arz etmektedir.

Bu çalışmada yüzey plazmon rezonans spektroskopisi kullanılarak kurkumin tespiti için hassas ve hızlı yeni bir nanosensör yönteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla kurkumin baskılanmış ve baskılanmamış SPR nanosensörler hazırlanmıştır. Hazırlanan nanosensörlerin zeta boyut analizi, taramalı elektron mikroskobu, temas açısı, elipsometre, atomik kuvvet mikroskobu ve fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi ile karakterizasyon çalışmaları yapıldıktan sonra kinetik çalışmalara geçilmiştir.

Kinetik çalışmalarda yapılan ölçümler sonrasında çıkarılan sensogramlar ile  $(\%)\Delta R$  ile sembolize edilen kırılma yüzdesi değerleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre  $R^2$  değeri 0.99 olan doğrusal bir kalibrasyon grafiği çizilmiştir ve LOD 0.0012 mg/L LOQ değeri ise 0.0040 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca seçicilik çalışmalarında sunset yellow ve tartrazin boyar maddeleri ile tasarlanmış olan kurkumin baskılanmış nanosensörlerin özgülüğü ortaya konulmuştur. Piyasadan elde edilen gerçek örnek denemelerinde ise yapılan çalışmanın geri kazanım oranı diğer bir deyişle verimliliği de test edilmiştir. Böylelikle yüzdelik olarak hesaplanan geri kazanım oranlarının yüksekliği çalışmanın güvenilirliğini ortaya koymuştur. Ayrıca gerçek örneklerde kurkumin baskılı SPR nanosensörlerinin validasyon çalışmaları sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometrisi (LC-MS) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen tutarlı sonuçlar SPR nanosensörlerin hassas ve doğruluk payının yüksek olduğunu kanıtlamıştır. Tez kapsamında son olarak tekrar kullanılabilirlik çalışmalarında yapılan kinetik analizler sonucunda kırınım değerinin minimal düzeyde değişimi SPR nanosensörlerin gıda analizlerinde kullanılabilirliğini ortaya koymuştur. Bu çalışma ile kurkumin baskılanmış SPR nanosensörler ile hızlı, hassas, kolay ve uygun maliyetli bir analiz metodunun olduğu gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Hint safranı (Kirkumin), Yüzey Plazmon Rezonans, Nanosensör

## **ABSTRACT**

### **PREPARATION OF SURFACE PLASMON RESONANCE BASED NANOSENSORS FOR CURCUMIN DETECTION**

**ŞEBNEM ÇIKRIK**

**Doctor Degree, Department of Bioengineering**

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

**Co- Supervisor: Doç. Dr. Nilay BERELİ**

**December 2021, 107 pages**

Herbal ingredients are among the most used products in alternative and complementary medicine. Curcumin, which is obtained from *Curcuma longa* plant known as Indian saffron or turmeric, has become quite popular in recent years due to its anticancer and antioxidant properties. Because of its ability to interact with molecular targets in various fields, it has a supportive effect on chemotherapy with different mechanisms in many types of cancer. Moreover its extraordinary effects on health, turmeric is an important spice marketed as dry turmeric in the world cuisine. There are many products which are containing turmeric in the market, both in the field of health and gastronomy. However, turmeric powder can be mixed with foreign starch and different spices as well as powders of some other *Curcuma* types these products. This situation threatens public health and decreases the quality of economically and socially. Therefore, it is important to control commercial products which are containing turmeric produced in violation of the legislation and their permitted properties.

In this study, it was aimed to develop a sensitive and fast, new nanosensor method for the detection of curcumin using with surface plasmon resonance spectroscopy.

For this purpose, curcumin-imprinted and non-imprinted SPR nanosensors were prepared. After the characterization studies of the prepared nanosensors were carried out with zeta sizer analysis, scanning electron microscope, contact angle, ellipsometer, atomic force microscope and fourier transform infrared spectroscopy, kinetic studies were started.

The percent of refraction, symbolized by  $(\%)\Delta R$ , was determined by the sensograms obtained after the measurements made in the kinetic studies. According to the results obtained, a linear calibration graph with an  $R^2$  value of 0.99 was drawn and the LOD was calculated as 0.0012 mg/L and the LOQ value as 0.0040. In addition, in selectivity studies, the specificity of curcumin-imprinted nanosensors designed with sunset yellow and tartrazine dyes was demonstrated. In real samples were obtained from the market, the recovery rate of the work done, in other words, its efficiency was also tested. Thus, the high recovery rates calculated as percentages revealed the reliability of the study. In addition, validation studies of curcumin-imprinted SPR nanosensors in real samples were performed using with liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS). Consistent results have proven that SPR nanosensors are sensitive and highly accurate. The minimal variation of the diffraction value as a result of the kinetic analyzes carried out in the reusability studies within the scope of the thesis revealed the usability of SPR nanosensors in food analysis. In this study, it has been shown that there is a fast, sensitive, easy and cost-effective analysis method with curcumin imprinted SPR nanosensors.

**Keywords:** Indian saffron (Curcumin), Surface Plasmon Resonance, Nanosensor

## TEŞEKKÜR

Doktora sürecim boyunca bilgi, öneri ve tecrübeleriyle çalışmalarımaya yön veren, bilimsel katkıları ve desteğiyle yardımlarını esirgemeyen değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Adil Denizli'ye,

Doktora sürecim boyunca hem bilimsel hem de manevi olarak bilgisi ve anlayışı ile her zaman bana destek olan Sayın Doç. Dr. Nilay Bereli'ye,

Tezimin her aşamasında bilgi ve desteğiyle büyük emeği olan sevgili hocam Sayın Dr. Duygu Çimen'e,

Çalışma hayatımda bilgi ve tecrüberiyle yol gösteren ve manevi desteklerini esirgemeyen Gen İlaç ve Sağlık Ürünleri Ar-Ge müdürü Dr. Ecz. Serhat Kozlu'ya ve Mikrobiyoloji Şefi Arzu Erenlerçayı'na,

Her zaman yanımda olan canım arkadaşlarım Dr. Mitra Jalilzadeh, Özge Özgür, Muhammed Erkek, Dr. Selin Uysal, Dr. Soheil Malekghasemi, Zeynep Yıldırım, Merve Gürsoy, Aysu Özkan'a,

Beni yetiştiren, bugünlere gelmemde büyük emeği olan, sevgisini ve desteğini esirgemeyen annem Leman Açıkbaş'a ve canım aileme,

Sevgisi, sabrı ve her konuda güveni ile yanımda olan desteğini her zaman hissettiğim canım eşim Baran Çıkrık'a,

Sonsuz teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	2
2.1. Kurkumin ve Kimyasal Özellikleri .....	2
2.1.1. Biyo-aktivitesi ve Biyo-yararlılığı .....	5
2.1.2. Çözünürlüğü ve Çözelti Stabilitesi .....	5
2.1.3. Terapötik Etkileri.....	6
2.1.4. Günlük Doz ve Toksikite .....	10
2.1.5. Saklama Koşulları ve Kullanımı .....	11
2.2. Biyosensörler .....	11
2.2.1. Enzimatik sensörler .....	12
2.2.2. İmmüno-sensörler.....	13
2.2.3. Elektrokimyasal Sensörler .....	14
2.2.4. Optik Biyosensörler .....	14
2.2.4.1. Yüzey Plasmon Rezonans Sensörleri (SPR) .....	15
2.2.4.2. SPR Sensörlerin Avantajları ve Zorlukları .....	16
2.3. Nanoteknoloji ve Uygulama Alanları .....	17
2.4. Nanopartiküller ve Nanosensörler .....	18
2.5. Moleküler Baskılama.....	20
2.5.1. Moleküler Baskılamanın Aşamaları .....	21
2.5.2. Moleküler Baskılama Yöntemleri .....	22
2.5.2.1. Kovalent baskılama.....	22
2.5.2.2 Kovalent olmayan baskılama .....	22
2.5.3. Moleküler Baskılama Bileşenleri.....	23
2.5.3.1. Fonksiyonel monomerler.....	23
2.5.3.2. Hedef - Kalıp molekül.....	24
2.5.3.3. Çapraz bağlayıcılar .....	24
2.5.3.4. Çözücüler ve Başlatıcılar .....	24
2.5.4. Moleküler Baskılama Uygulama Alanları .....	25
2.6. Literatürde Yer Alan Diğer Çalışmalar.....	25



3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR .....	27
3.1. Kullanılan Kimyasallar .....	27
3.2. Kurkumin Baskılanmış ve Baskılanmamış Poli (HEMA-MATrp) SPR Nanosensörlerin Hazırlanması .....	27
3.2.1. Sensör Çip Yüzeyinin Modifikasyonu .....	27
3.2.2. Kurkumin-MATrp Çözeltilerinin Hazırlanması .....	28
3.2.3. Kurkumin Baskılanmış ve Baskılanmamış Nanopartiküllerin Hazırlanması .....	28
3.2.4. Kalıp Molekül Kurkuminin Desorpsiyonu .....	30
3.3. Kurkumin Baskılanmış poli(Hema-MATrp) Nanosensörlerinin Karakterizasyonu .....	30
3.3.1. Zeta Boyut Analizi .....	30
3.3.2. Elipsometre Ölçümleri .....	31
3.3.3. Temas Açısı Ölçümleri .....	32
3.3.4. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Ölçümleri .....	33
3.3.5. Atomik Kuvvet Mikroskopisi (AFM).....	34
3.3.6. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Spektrofotometre Analizi .....	34
3.4. SPR Nanosensörler ile Kinetik Analizler .....	34
3.5. Seçicilik Çalışmaları .....	35
3.6. Gerçek Örnek Denemesi .....	35
3.7. Tekrar Kullanılabilirlik.....	36
4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....	37
4.1. Kurkumin Baskılanmış ve Baskılanmamış Nanopartiküllü SPR Nanosensörler .....	37
4.1.1. Baskılanmış ve Baskılanmamış Kurkumin-poli(Hema-MATrp) SPR Nanosensörlerin Karakterizasyonları .....	37
4.1.1. Zeta Boyut Ölçümleri.....	37
4.1.1.2. Elipsometre Ölçümleri .....	39
4.1.1.3. Temas Açısı Ölçümleri .....	39
4.1.1.4 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Ölçümleri.....	41
4.1.1.5. Atomik Kuvvet Mikroskopisi (AFM) .....	41

4.1.1.6. FTIR Spektrofotometre Analizi .....	43
4.1.2. Kurkumin Baskılanmış poli(Hema-MATrp) SPR Nanosensörlerin Analizleri .....	44
4.1.2.1. Kurkumin-MATrp Oranının Belirlenmesi .....	44
4.1.2.2. SPR Nanosensörler ile Kinetik Analizler .....	45
4.1.2.3. Kurkumin Baskılanmış SPR Nanosensörler ile Denge Analizleri .....	47
4.1.2.4. Kurkumin Baskılanmış SPR Nanosensörler ile Bağlanma Kinetik Analizleri .....	48
4.1.2.5. Kurkumin Baskılanmış SPR Nanosensörler ile Denge İzoterm Analizleri .....	51
4.1.2.6. Kurkumin Baskılanmış SPR Nanosensörler ile Seçicilik Analizleri .....	54
4.1.2.7. Kurkumin Baskılanmış SPR Nanosensör ile Gerçek Örnek Analizleri .....	58
4.1.2.8. SPR Nanosensörlerin Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi...	62
5. YORUM .....	64
6. KAYNAKLAR .....	67
EKLER.....	77
EK 1 - Tezden Türetilmiş Yayınlar .....	77
EK 2 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu.....	78
ÖZGEÇMİŞ .....	79

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. Zerdeçal bitkisinin rizom ve toz halindeki görüntüsü (Kendi objektifimden).....	2
Şekil 2. 2. Curcumin [(1E,6E)-1,7-bis (4-hidroksi-3-metoksifenil)- 1,6-heptadien-3,5-dion] moleküler yapısı .....	2
Şekil 2. 3. Kurkumin ve türevlerinin moleküler yapısı .....	4
Şekil 2. 4. Kurkuminin terapötik etkilerinden birkaçı .....	7
Şekil 2.5. Biyosensörlerin çalışma prensipleri .....	12
Şekil 2.6. SPR sensörlerinin çalışma prensibinin şematik görüntüsü .....	16
Şekil 3.1. SPR nanosensör çip yüzey modifikasyonun şematik gösterimi.....	28
Şekil 3.2.Kurkumin baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) nanopartiküllerin polimerizasyon cihazındaki ve yıkama işlemi sonrasındaki görüntüleri.....	30
Şekil 3.3. Nano Zetasizer cihazı.....	31
Şekil 3.4. EP3-Nulling Elipsometre cihazı .....	32
Şekil 3.5. KRÜSS DSA100 Temas açısı ölçüm cihazı .....	33
Şekil 4.1. (A) Kurkumin baskılanmış (B) Kurkumin baskılanmamış nanopartiküllerin zeta boyut analizleri .....	38
Şekil 4.2. SPR nanosensörlerin elipsometri görüntüleri (A) Kurkumin baskılanmış ve (B) Kurkumin baskılanmamış .....	39
Şekil 4.3. (A1) Modifiye edilmemiş SPR çip yüzey, (A2) Allil merkaptan modifikasyonu sonrası SPR çip yüzeyi, (A3) Kurkumin baskılanmamış SPR çip yüzeyi ve (A4) Kurkumin baskılanmış SPR çip yüzeyleri temas açısı fotoğrafları.....	40
Şekil 4.4. Kurkumin baskılanmış nanopartiküllerin SEM görüntüsü .....	41
Şekil 4.5. (A1) Kurkumin baskılanmış SPR nanosensör yüzeyi, (A2) Kurkumin baskılanmamış nanosensör yüzeyi .....	42
Şekil 4.6. Kurkumin baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) nanopartiküllerin FTIR spektrumları. ....	43
Şekil 4.7. Kurkumin-MATrp UV taraması .....	44
Şekil 4.8. Kurkumin çözeltisi ile kurkumin baskılanmış SPR nanosensör arasındaki etkileşimlere dair sensogram grafiği (0.01-150 mg/L derişim aralığında).....	45

Şekil 4.9. Kurkumin çözeltisi ile kurkumin baskılanmış SPR nanosensör arasındaki kinetik analizlere ait sensorgramlar (0.01-1.0 mg/L derişim aralığı) .....	46
Şekil 4.10. Kurkumin derişimi ile kurkumin baskılanmış SPR nanosensördeki kırılma yüzdesi arasındaki kalibrasyon grafiği .....	46
Şekil 4.11. Scatchard denge analiz grafiği.....	48
Şekil 4.12. Bağlanma kinetiği grafiği.....	50
Şekil 4.13. Kurkumin baskılanmış SPR nanosenörlerde Langmuir izotermi .....	52
Şekil 4.14. Kurkumin baskılanmış SPR nanosenörlerde Freundlich izotermi ...	52
Şekil 4.15. Kurkumin baskılanmış SPR nanosenörlerde Langmuir-Freundlich izotermi.....	53
Şekil 4.16. (A) Kurkumin, (B) Sunset Yellow ve (C) Tartrazin moleküler yapısı .....	54
Şekil 4.17. Kurkumin (CUR), Sunset Yellow (SY) ve Tartrazin (TAR) çözeltileri ile kurkumin baskılanmış SPR nanosensörüne (MIP) ait sensogram.....	55
Şekil 4.18. Kurkumin (CUR), Tartrazin (TAR) ve Sunset Yellow (SY) çözeltileri ile kurkumin baskılanmamış SPR nanosensörüne (NIP) ait sensogram. ....	56
Şekil 4.19. Kurkumin (CUR), Tartrazin (TAR) ve Sunset Yellow (SY) çözeltilerinin MIP ve NIP senörlerine ait karşılaştırmalı grafiği.....	57
Şekil 4.20. Kurkumin baskılanmış SPR nanosensörler ile çay örneği sensogramı .....	60
Şekil 4.21. Kurkumin baskılanmış SPR nanosensörler ile toz kurkumin örneği sensogramı.....	60
Şekil 4.22. Kurkumin baskılanmış SPR nanosensörün aynı gün içerisinde art arda yapılan ölçümler sonucunda tekrarlanabilirliğini gösteren zamana karşı kırılma indisi grafiği (a: adsorpsiyon, b: desorpsiyon, c: rejenerasyon). ....	63
Şekil 4.23. Kurkumin baskılanmış SPR nanosensörün aylar içerisinde yapılan ölçümler sonucunda tekrarlanabilirliğini gösteren zamana karşı kırılma indisi grafiği.....	63

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Zerdeçalın temel besin öğeleri .....	3
Çizelge 2.2 Nanosensörler ve uygulama alanları .....	19
Çizelge 4.1. Kinetik hız sabitleri .....	50
Çizelge 4.2. Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich parametreleri .....	53
Çizelge 4.3. Kurkumin ve yarışmacı moleküllere ait seçicilikle ilgili parametreler .....	58
Çizelge 4.4. Kurkumin baskılanmış SPR sensörlerin çay ve toz kurkumin örneklerindeki sayısal veriler .....	59
Çizelge 4.5. Kurkumin saptama yöntemlerine dair literatürde yer alan çalışmalar .....	61

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### SİMGELER

$R^2$	Regresyon katsayısı
$k_m$	Kütle Aktarım Hız Sabiti
C	Analit Derişimi
W	Watt
t	Zaman
k	Seçicilik
$k'$	Bağıl seçicilik
S	Eğim
n	Freundlich sabiti
$K_A$	Bağlanma sabiti
$K_D$	Ayrılma Sabiti
$k_a$	Bağlanma hız sabiti
$k_d$	Ayrılma hız sabiti
L	Litre
mL	Mililitre
$\mu$ L	Mikrolitre
nm	Nanometre
ng	Nanogram
mg	Miligram
$^{\circ}$ C	Santigrad derece
$\Delta R$	Kırınım değişimi
pH	Çözeltideki hidrojen iyonu molar derişiminin eksi logaritması
%	Yüzde
RF	Referans

## KISALTMALAR

HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
UV-VIS	Ultraviyole ve Görünür Işık
LOD	Gözlenebilme sınırı
LOQ	Tayin alt sınırı
MIP	Moleküler Baskılanmış Polimer
NIP	Baskılanmamış Polimer
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
SPR	Yüzey Plazmon Rezonans
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
SCARS	Sekans Karakterize Amplifiye Bölge
RAPD	Polimorfik DNA'nın Rastgele Amplifikasyonu
CCD	Merkezi kompozit tasarımı
LC-MS	Kütle Spektrometrisi
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
DNA	Deoksiribonükleik asit
COX2	Siklooksijenaz enzimi 2
PBMC	Periferel kan mononükleer hücrelerinin
VSMC	Vasküler düz kas hücreleri
LDL	Düşük yoğunluklu lipoproteinler
TNF	Tümör nekroz faktörü

IL	İnterlökin
HEMA	Hidroksietilmetakrilat
EGDMA	Etilen Glikol Dimetakrilat
EDMA	Etilen Glikol Dimetakrilat
AIBN	Azobisizobutironitil
ACN	Asetonitril
PVA	Polivinil Alkol
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
APS	Amonyum Persülfat
PVA	Polivinilalkol
PDI	Polidispersite indeksi



# 1. GİRİŞ

Son yıllarda dünya genelinde ölüm nedenlerinin başında kanser gelmektedir. Özellikle ilaç sektöründe kanser hücrelerinde selektif etkiye sahip, normal hücrelerde ise toksik etki göstermeyen yeni antikanser ilaçların geliştirilmesine yönelik çalışmalar yürütülmektedir. Günümüzde oldukça popüler hale gelen ve kolayca temin edebileceğimiz bir baharat olan zerdeçal bitkisinden izole edilen kurkumin başta kanser olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Özellikle kanser tedavisinde kemoterapinin etkinliğini arttırdığı yapılan çalışmalar sonucunda ortaya konmuştur [1,2]. Ayrıca lenfoma, yumurtalık kanseri, prostat kanseri ve nörolojik kanserlerde tümörlü hücre ve doku oluşumunu inhibe ettiği de kanıtlanmıştır [3]. Dünya sağlık örgütü tarafından belirtilen dozlarda ve sürede alındığı sürece herhangi bir yan etkinin gözlenmediği sağlıklı dokularda hasara yol açmayan bir terapötik bir ajan olduğu ispatlanmıştır. Kurkuminin uzun süreli yüksek dozlarda kullanımında ise hepatolojik açıdan toksisite oluşturmaktadır. Bu kapsamda piyasada yer alan kurkumin içerikli ürünlerin doğru kullanımı ve üründeki kurkumin miktarının bilinmesi önem arz etmektedir. Günümüze kadar kurkumin miktar tayini geleneksel yöntemlerle izlenmiştir. Geleneksel yöntemler ise elektron mikroskopu, flow sitometri ve floresans görüntüleme içermektedir. Bu yöntemler zaman alıcı ve son derece teknik uzmanlık gerektirmektedir. Piyasada bulunan ürünlerdeki kurkumin miktarının etkin bir şekilde değerlendirilmesi için basit, hızlı ve hassas bir yöntemin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Bu tez kapsamında kurkumin ve yüzey plazmon rezonans spektroskopisi kullanılarak gıda takviyesi olarak piyasada yer alan ürünlerin ve ilaçların analizlerinin yapılabilirliği araştırılmış ve bu biyoanaliz metoduyla kurkumin tayinine yönelik basit, ucuz, hassas ve yeni bir analiz yöntemi geliştirilmeye çalışılmıştır.

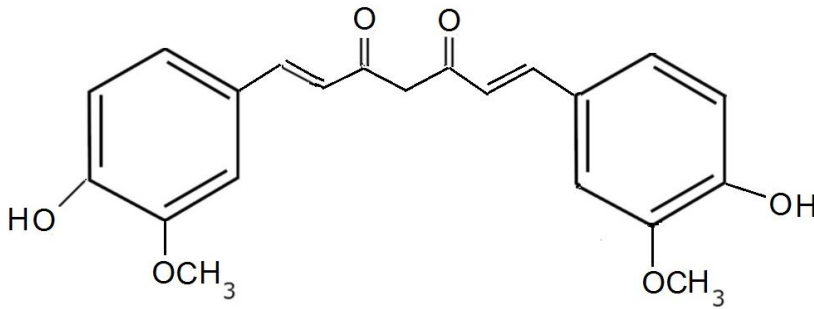
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kurkumin ve Kimyasal Özellikleri

Kurkumin, Zencefilgiller (Zingiberaceae) familyasından Zerdeçal (*Curcuma longa*) bitkisinin toprak altı yapısı olan rizomlarından elde edilen sarı renkli biyoaktif polifenolik bir pigmenttir (Şekil 2.1 ve Şekil 2.2). Güney Asya ülkelerinde oldukça yaygın kullanıma sahip olan ve mucizevi baharat olarak adlandırılan zerdeçalın anavatanı Doğu Hindistan'dır. Zerdeçal büyük yapraklı, sarı çiçekli rizomlu çok yıllık otsu bir bitkidir. Rizomların üst tabakasının rengi kahverengimsi olup; iç kesiti ise kırmızımsı renktedir [4]. Çizelge 2.1'de yer alan tabloda temel besin öğeleri açısından zerdeçal bitkisi oldukça zengin bir içeriğe sahip olup yapısında protein %6.4, yağ %5.1, karbonhidrat %69.5 oranında bulunmaktadır [5].



Şekil 2. 1. Zerdeçal bitkisinin rizom ve toz halindeki görüntüsü (Kendi objektifimden)

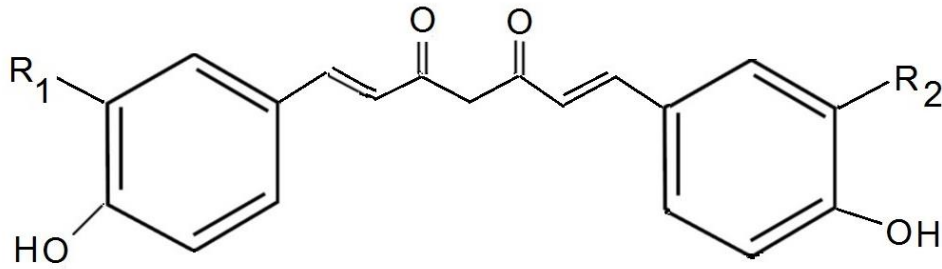


Şekil 2. 2. Curcumin [(1E,6E)-1,7-bis (4-hidroksi-3-metoksifenil)- 1,6-heptadien-3,5-dion] moleküler yapısı

Çizelge 2.1. Zerdeçalın temel besin öğeleri

<b>Besin Öğeleri</b>	<b>100 gram toz halindeki zerdeçal baharatı</b>
Su	%13.3
Enerji	312,00 kcal
Protein	%6.4
Toplam yağ	%5.1
Karbonhidrat	%69.5
Sükroz	%2.46
Dekstroz	%0.39
Fruktoz	%0.46
Doymuş yağ asidi	%5.1
C vitamini, askorbik asit	%0.00072
B12 vitamini	0
B9 vitamini ve folik asit	0
D vitamini	0

Kurkumin dünyada ilk kez 1815 yılında Vogel ve Pelletier tarafından zerdeçaldan izole edilerek keşfedilmiştir. 1910 yılında ise Lampe ve arkadaşları tarafından moleküler yapısı ortaya konulup, Diferulolmetan olarak tanımlanmıştır. Kurkuminoidler zerdeçal içindeki aktif bileşiklerin bir ailesidir. Kurkuminoidler polifenolik pigmentlerdir. Zencefil familyasına ait olan bu ailenin ana bileşeni ve bitkiye sarı rengini veren biyoaktif bileşen, 3 farklı türevden meydana gelmektedir. Bunlar %75 oranında kurkumin I, %20 oranında kurkumin II (dimetoksikurkumin) ve %5 oranında kurkumin III (bisdimetoksikurkumin) 'den oluşmaktadır (Şekil 2.3). Kurkumin, zerdeçaldaki birincil kurkuminoid ve çoğu çalışmanın yapıldığı bileşiktir [3, 5].



Kurkumin:  $R_1 = \text{OCH}_3$   $R_2 = \text{OCH}_3$   
 Dimetoksikurkumin :  $R_1 = \text{H}$   $R_2 = \text{OCH}_3$   
 Bisdimetoksikurkumin :  $R_1 = \text{H}$   $R_2 = \text{H}$

Şekil 2. 3. Kurkumin ve türevlerinin moleküler yapısı

Kurkumin 368,37 g/mol moleküler ağırlığa ve 183°C erime noktasına sahip fenolik bir bileşiktir. Ticari kalitedeki kurkumin %10-20 oranında 338 g/mol moleküler ağırlığa sahip dimetoksikurkumin ve %5'ten daha az 308 g/mol moleküler ağırlığına sahip bisdimetoksikurkumin olarak adlandırılan kurkuminoidler içermektedir.

Ultraviyole görünür spektrofotometrik bölgede 420 nm'de kurkumin azami ışık Emilimi göstermektedir. Kurkumin nötr ortamlar ve alkali ortamda stabil enol oluşturmaktadır. Asitli veya nötr koşullar altında suda çözünmez, ancak alkali

koşullarda çözünmektedir. Kurkumin, asidik pH'da suda hemen hemen çözünmeyen, yağda çözünen bir pigmenttir. Yüksek sıcaklıklarda ve asitlerde kararlıdır, ancak alkali koşullarda kararsızdır; çok hızlı bozunmakta ve rengi sarıdan kırmızıya dönüşür. Bu renk değişikliği pH'daki değişikliklerden kaynaklanmaktadır. Bazı ortamda kırmızı renk alan kurkuminin UV spektrofotometrede 463 nm'de maksimum absorbanı gösterirken; asidik ortamda sarı renkli olan kurkuminin maksimum absorbanı değeri 422 nm'ye kaymaktadır [1,6].

### **2.1.1. Biyo-aktivitesi ve Biyo-yararlılığı**

Son yıllarda terapötik etkileriyle oldukça popüler olan kurkumin gerek antioksidan gerekse antikanserojen özellikleriyle ilaç ve gıda sektöründe sıkça kullanılmaktadır. Bu özelliklerinin yanı sıra diyabet, romatoid artrit, kardiyovasküler hastalıklar, Alzheimer ve Crohn hastalığı da dahil olmak üzere çeşitli insan hastalıklarına karşı terapötik etkinliği de bulunmaktadır. Ancak kurkuminin bu olumlu özelliklerine rağmen sulu çözeltideki kararsızlığı ve insan vücudunda zayıf absorpsiyon göstererek hızlı sistemik eliminasyonu biyoyararlılığını düşürerek, terapötik ajan olarak kullanımını engellemektedir [1,7].

Kurkuminin biyoyararlılığını arttırmak için farklı çözüm stratejileri geliştirilmiştir. Yapılan çalışmaların sonuçlarına göre geliştirilen stratejiler 5 ana başlık halinde toplanmaktadır. Bunlar lipozomal kurkumin kullanımı, kurkumin nanopartiküller, kurkumin ve fosfolipit kompleksleri, kurkumin analoglarının kullanımı ve hidrojel kapsülleme sayılabilmektedir [7,8].

### **2.1.2. Çözünürlüğü ve Çözelti Stabilitesi**

Kurkumin fenolik bir kimyasal yapıya sahip olduğundan suda çözünmemektedir. pH 5.0 olan sulu bir çözeltide kurkuminin çözünürlüğü oldukça düşük olup 11 ng/mL olarak kaydedilmiştir. Asidik tampon içeren bir çözeltide çözünürlüğü bu seviyelerdeyken, nötral bir pH da ise çözünme oranını belirtmek mümkün olmaktadır. İnsan sağlığına faydalarının yanısıra kurkuminin suda çözünürlüğünün ve kararlılığının bu kadar düşük olması özellikle ilaç salım sistemlerinde kullanımını kısıtlamaktadır. Öte yandan, başta metanol ve etanol

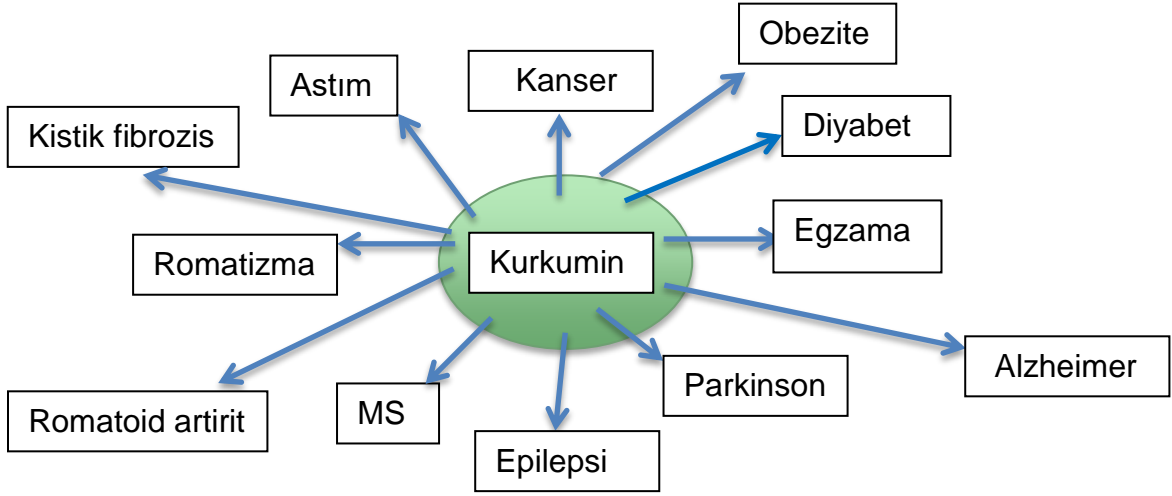
olmak üzere aseton, toluen gibi organik çözücülerde ise iyi derece çözünmektedir [9].

### **2.1.3. Terapötik Etkileri**

Son yıllarda curcuminin, radyasyon ve kemoterapötik etkinliği arttırıp, tedaviden daha hızlı sonuç alınmasını sağlaması nedeniyle kanser araştırmalarında oldukça dikkat çekmiştir . Antikanser bir ajan olarak pek çok kanser türünde, farklı mekanizmalarla tümör oluşumunu baskıladığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.

Curcumin, hücre siklusunda yer alan siklin bağımlı kinazlar (cyclin D1), antiapoptik genlerdeki reseptörlerin azaltılması, yeni kan damarları açı oluşumu (VEGF), yayılma (adezyon molekülleri), karsinojenlerin biyotransformasyonu ve siklooksijenaz-2 (COX<sub>2</sub>) enzimi gibi yapılara müdahale ederek etki göstermektedir [10-17]. Bu etkin bağlanma mekanizması curcuminin moleküler ve biyokimyasal yapısından dolayı çeşitli moleküller hedeflerle etkileşebilme yeteneğinden kaynaklanmaktadır [18].

Curcuminin ayrıca antioksidan özellik göstermesiyle alkollerin ilaçların ve ağır metallerin beyin, karaciğer ve böbrek gibi organlarda meydana gelen hasarı önleme potansiyeline sahip olduğu bildirilmiştir [19, 20]. Kimyasal yapısında yer alan oksijenli aromatik halkaların sitotoksik aktiviteye sahip olduğu, fenolik fonksiyonel gruplarının ise antioksidan aktiviteye sahip olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur [21, 22]. şekil 2.4'de Kurkuminin tıp alanında hangi hastalıklara etki ettiğini gösteren bir şema yer almaktadır. Tez kapsamında kurkuminin terapötik etkilerine ilişkin birkaç hastalığa dair mekanizmalara yer verilmiştir. Belirtilen bu hastalıkların dışında daha birçok hastalığa karşı da gerek iyileştirici gerekse onarıcı mekanizmaları bulunmaktadır.



Şekil 2. 4. Kurkuminin terapötik etkilerinden birkaçı

#### - Antiinflamatuvar ve Antioksidan Etki Mekanizması

Kurkuminin terapötik etkilerinden biri de antioksidan ve antiinflamator olarak adlandırılan bağışıklık sistemini güçlendiren ve serbest radikallerin hücrelere zarar vermesini engelleyen terapötik etkidir. Bu etkinin mekanizmasını hemoglobin oksidasyonunu önleyerek ve lipid perosidasyonunu inhibe ederek E vitamininden bile daha güçlü bir antioksidan etkiye sahip olarak yapmaktadır. Kurkuminin antioksidan etkisi birkaç enzimin aktivitesi ile sağlanmaktadır. Bunu ise süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimler aracılığıyla sağlamaktadır. Ayrıca kurkumin, hücresel döngüde mitokondri onarımından sorumlu ve bağışıklığı güçlendiren ve daha birçok hücresel süreçlerde önemli rol oynayan glutatyon ve DNA sentezinde görev alan tiyoredoksiyonla reaksiyona giren bir Michael katılması olarak görev yapmaktadır. Kurkuminin bu ajanlarla reaksiyonu sonucu hücre içi lipid peroksidasyonunu azaltarak iltihabi durumların enflamasyonu bastırdığı ortaya konulmuştur [23, 24].

#### - Antikanser Mekanizması

Son zamanlarda kurkuminin antioksidan ve antiinflamatuvar etkilerinin yanısıra aynı zamanda antikanser etkinliği de yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. [2,

25,26]. Kanser türlerinden kolon, karaciğer, meme ve deri kanserinde hücre bölünmesini durdurarak kanserli hücrelerin büyümesini ve yayılmasını engellediği gösterilmiştir. Sadece bu özellikleriyle değil aynı zamanda kemoterapinin etkinliğini arttırıcı yönde etkisi de bulunmaktadır.

Antikanser mekanizması oldukça farklı yollardan vücut içerisinde etki etmektedir. Her kanser türü için etkileyeceği metabolik yol değişiklik göstermektedir. Örneğin kolon kanserinde yüksek derişimlere ulaşabildiğinden güçlü etkinliğe sahip olarak, kolon hücrelerindeki DNA mutasyonunda önemli bir terapötik etkiye sahip olmaktadır [27]. Gastrointestinal tümörlerde ise etki mekanizmalarından biri arşidonik asitin biyolojik olarak aktif prostonoidlere dönüşümünü katalizleyen siklooksijenaz (COXs) enzimleridir. Bu enzimin COX-1 ve COX-2 olmak üzere iki izoformu bulunmaktadır. COX-2 inflamatuvar ve mitojenik uyarılar tarafından uyarılarak sinyal iletim yollarının önemli araçlarından prostaglandinlerin sentezini artırarak, kanser oluşumunda etkili rol oynamaktadır. Kurkumin ise burada COX-2 enzimine bağlanarak enzimin ekspresyonunu inhibe etmektedir [28]. Yukarıda da belirtildiği gibi kurkumin daha birçok farklı metabolik yolun ilerlemesini durdurarak antikanser ajanı olarak görev almaktadır.

#### **- Kardiyovasküler Etkisi**

Kurkumin, damar sertleşmesi olarak ifade edilen ateroskleroza ve miyokardiyal enfarktüse karşı etki etmektedir. Bunu damar sertleşmesine dayalı olarak damarların tıkanması ve organların beslenememesiyle sonuçlanan sistemik hastalıkta periferal kan mononükleer hücrelerinin (PBMC'ler) ve vasküler düz kas hücrelerinin (VSMC'ler) çoğalmasını engeleyerek yapmaktadır. Ayrıca kalp krizine yol açan kanda kolestorülü taşıyan düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL) oksidasyonun önleyerek, trombosit agregasyonunu inhibe etmekte ve kalp krizi insidansını azaltmaktadır [29].

#### **- Diyabet Üzerine Etkisi**

Literatüre bakıldığında kurkuminin diyabet üzerindeki etkisiyle ilgili farklı mekanizmalar üzerinde durulmaktadır. Özellikle diyabetik sıçanlarla yapılan bir çalışmada 3 farklı mekanizmaya değinilmiştir. Bunlardan ilki tümör nekroz faktörü ve plazma serbest yağ asitlerini zayıflatarak, lipid peroksidasyonunu ve lizozomal enzim aktivitelerini inhibe ederek kandaki glukoz seviyesini düşürmektedir [30,



31, 32]. İkinci olarak yağ dokusunda bulunan ve insülin hormonu etkisi altında aktivite gösteren lipoprotein lipaz enziminin düzenlenmesinde rol oynamaktadır [33]. Son olarak kurkumin karaciğerde glukozun parçalanmasından sorumlu glikoliz ve lipit metabolizması ile ilişkili enzimlerin aktivasyonunda rol oynamaktadır Ayrıca kurkuminin diyabet tedavisinde önemli bir rolü olmasının yanı sıra, diyabetin getirmiş olduğu yan etkileri de minimum düzeye indirmede fayda sağlamaktadır [34].

#### **- Romatoid Artirid Üzerine Etkisi**

Kurkuminin romatoid artirid için etki mekanizması vücutta eritrositler hariç birçok hücrede yapılan ve çeşitli kimyasal ve mekanik uyarımlar ile salınan lipid aracılar olan COX-2 mekanizmasıyla gerçekleşmektedir. Ayrıca yapılan çalışmalar sonucunda tümör nekroz faktörü (TNF) ve sitokinlerin salgılanmasını down regülasyon olarak adlandırılan reseptör sayısının azaltarak antiromatizmal ve antiartritik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir [35].

#### **- Multipl Skleroz Üzerine Etkisi**

Kan-beyin bariyerinin deformasyonu ve sinir hücrelerindeki miyelin kılıfının zarar görmesi sonucu ortaya çıkan otoimmün hastalıkta, kurkuminin sinir hücrelerinde onarıcı etki mekanizması bulunmaktadır. Özellikle hastalığın şiddetlendiği, belirtilerin yoğunlaştığı atak döneminde T lenfosit hücrelerinden sitokin Tip-1 grubundan salınımın arttığı interlökin (IL) -12 sinyalini bloke ederek multipl skleroz tedavisinde terapötik potansiyeli bulunmaktadır. Ayrıca kurkumin, transkripsiyon faktörlerini ve hücre düzenleyici proteinleri modüle ederek MS hastalığının ilerlemesini önlemede etkili olmaktadır [36] .

#### **- Alzheimer Hastalığı Üzerine Etkisi**

Kurkuminin nörolojik hastalıklardan olan Alzheimer hastalığında da tedavi edici yönde olumlu bir etkisi bulunmaktadır. Alzheimer hastalığında en fazla azalan nörotransmitterler arasında asetilkolin olduğu saptanmıştır. Asetilkolin ise bellek ve hafıza ilişkili, merkezi sinir sisteminden salınan ve parasempatik sinirlerle de ilişkili bir nörotransmitterdir. Kurkumin ise gerek in vitro gerekse in vivo çalışmalarda asetilkolini inaktive eden asetilkolinesteraz enzimini inhibe ettiği ortaya konulmuştur. Ayrıca bu hastalıkta nöronlar arasında tau ve amiloid beta proteinlerinin agregasyona uğrayıp, birikmesiyle sinir iletimde aksaklıklar olduğu

bilinmektedir. Deney hayvan modeli üzerindeki çalışmalarda kurkumin oral yolla verildiğinde amiloid ve tau proteinlerinin agregasyonunu inhibe ettiği kaydedilmiştir. Günümüzde gelinen noktada klinik çalışmalara daha fazla gereksinim olduğu görülmektedir [37, 38].

### **- Kistik Fibrozis Hastalığı Üzerine Etkisi**

Kistik fibrozis genetik bir hastalık olup, kistik fibrozis transmembran iletkenlik düzenleyicisini kodlayan gendeki mutasyondan kaynaklanmaktadır. Kurkumin ise genin ekspresyonunu regüle ederek hastalığın yan etkilerini azaltmaktadır[39].

#### **2.1.4. Günlük Doz ve Toksikite**

Kurkumin gibi selektif enzim inhibitörü olarak adlandırılan kemoterapötik bileşiklerin prelinik ve erken klinik çalışma seviyelerinde diyet tabii tutulan miktarların dışına çıkıldığında potansiyel toksisite oluşturduğu bilinmektedir. İnsan tarafından kurkumin tüketiminin, diyetin bir parçası olarak herhangi bir zararlı etkisi olmadığı bilinmekle beraber, Dünya Sağlık Örgütü ve Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü tarafından günlük kurkumin tüketim dozu maksimum 150 mg / gün kurkumin eşdeğer, kişi başına günde 1,5 g'a kadar zerdeçalın diyet tüketiminin, olumsuz bir endikasyona yol açmadığı belirtilmiştir [40].

Yapılan çalışmalar sonucunda günlük kullanım dozu aşıldığı takdirde veya 8 gram üzerinde tüketildiğinde toksikolojik etkiler gözlemlendiği kaydedilmiştir. Bunu gösteren bir çalışma 2016 yılında Journal of Agricultural and Food Chemistry dergisinde yayınlanmıştır. Peiyu Qiu ve arkadaşları tarafından yürütülen bu çalışmada kurkuminin toksik etkileri sıçanlar üzerinde çalışılmıştır. Sıçanlarda kurkuminin 90 günlük kullanımı sonucunda subkronik toksisitesi, klinik biyokimya ve patolojik sonuçları değerlendirilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda kurkuminin uzun süreli kullanımı ve doz aşımında sıçanların vücut ağırlıklarının azalarak oksidatif stres ve iltihaplanma ile başlayan metabolik bozukluklarla seyreden karaciğer hasarına yol açtığı saptanmıştır [41,42].

Bir diğer çalışma ise Toxicology Letters dergisinde yayınlanmış olup; aşırı dozda kurkumin kullanımı 14 gün ile 90 gün boyunca farelerde ve sıçanlarda izlenmiştir. Uzun süreli ve aşırı doz kullanımının farelerde ve sıçanlarda hepatoksisiteye yol

açtığı bulunmuştur. Ayrıca farelerin sıçanlara göre karaciğer hasarına daha duyarlı olduğu kaydedilmiştir [43].

### **2.1.5. Saklama Koşulları ve Kullanımı**

Zerdeçal bitkisinin yaklaşık 3 gramında 30-90 mg kurkumin bulunmaktadır. Standart toz halindeki kurkuminden günlük 400-600 mg aralığında günde 3 doz halinde alınabilmektedir. Sıvı formülasyonunda ise sabah ve akşam olmak üzere günlük 30-90 damla alınabilmektedir.

Zerdeçalın saklama ve kullanım koşulları terapötik etkilerinin ortaya çıkması açısından önem arz etmektedir. Serin ve kuru yerlerde birkaç hafta saklanabilmektedir. Zeytinyağı, karabiber ve pul biber ile birlikte tüketildiğinde sindirim sisteminde zerdeçalın bağırsaktaki emilini arttırmaktadır [44]. Özellikle karabiberin içinde yer alan piperin alkaloidi sindirim enzimlerinin aktivitesini artırarak, kurkuminin bağırsak endotel hücrelerinden kana karışmasını kolaylaştırmaktadır. Ayrıca karaciğerde parçalanma hızını yavaştarak, kandaki düzeyini yükseltmektedir. Zerdeçaldaki kurkumin ile karabiberdeki piperinin bu sinerjik etkileşimi sadece sindirim sistemi için değil, aynı zamanda güçlü bir antiinflamatuvar etkiyi de açığa çıkarmaktadır [45]

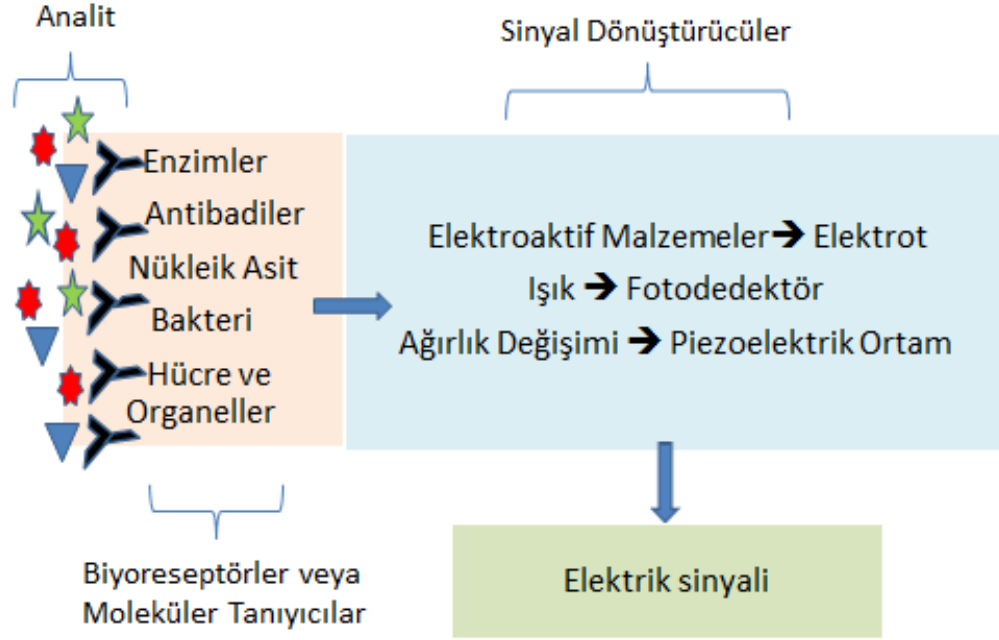
Zerdeçal özellikle Hint yemeklerinde sıklıkla kullanılan bir baharattır. Hintlilerin köri sosunda ve İspanyolların geleneksel yemeği olan paella yemeğinde bile kullanılmaktadır. Türk mutfağında da pilavlarda ve et yemeklerinde yemeğe sarı rengi vermek için kullanılmaktadır. Ayrıca zerdeçal Asya ülkelerinde ve Japonya'da çay olarak da tüketilmektedir [46].

## **2.2. Biyosensörler**

Biyosensörler 1962 yılında Clark ve Lyons adlı iki araştırmacı tarafından bulunmuştur. Biyoalgılayıcılar olarak da adlandırılan biyosensörler; biyolojik bir materyal içeren ve bunları algılayıcı olarak kullanıp elektrik sinyaline dönüştüren analitik cihazlardır.

Biyosensörlerin çalışma prensipleri incelendiğinde 2 temel yapıdan oluşmaktadır. Bunlardan birincisi biyolojik tanıma elemanları ve elektrik sinyaline dönüşümü sağlayan dönüştürücülerdir (Şekil 2.5). Biyolojik tanıma elemanları olarak hücreler, nükleik asitler, dokular, enzimler, antikolar sayılabilmektedir.

Dönüştürücüler ise elektrokimyasal, optik, termal ve piezoelektrik sensörler olarak sınıflandırılmaktadır [47].



Şekil 2.5. Biyosensörlerin çalışma prensipleri

Biyosensörlerin amacı analiz edilecek maddenin analiz miktarıyla orantılı olarak sinyal üretmektir. Özellikle biyokimya alanında sıklıkla kullanılan bu cihazlar enzimatik sensörler, immünosensörler, elektrokimyasal ve optik sensörler olarak 4 gruba ayrılmaktadır.

### 2.2.1. Enzimatik sensörler

Biyosensör grubunun önemli bir bölümünü teşkil etmektedir. Enzimlerin anahtar-kilit ilişkisinde olduğu gibi hedef moleküle afinite ve seçicilik ön planda olmaktadır. Özellikle diagnostik ve anlık verilerin elde edilmesinde enzimatik sensörler oldukça sık kullanılmaktadır. Genel olarak enzim sabit bir şekilde etkileşim sonucu açığa çıkan enerjiyi elektrik enerjisine dönüştüren sinyal çeviricide dururken yalnız analit reaksiyona girmektedir.

Enzimatik sensörler 2 ana gruba ayrılmaktadır. Bunlardan birincisi sinyal dönüştürücü tarafından enzim substrat ya da kofaktör miktarını diğer bir ifadeyle sinyal artışını saptamaktadır. Bu gruba verilebilecek en iyi örnek glukoz biyosensörlerdir. İkinci grupta yer alan enzimatik sensörler ise birinci gruptaki

sensörlerin tersine enzim ve substrat sistemdeyken inhibitör baz alınmaktadır. Yani burada enzim inhibisyonu söz konusu olmakla beraber sinyal dönüştürücüde ise sinyalin azalması takip edilmektedir. Bu gruba verilecek en iyi örnek ise böcek öldürücü kimyasal grubu pestisilerin tayininde kullanılan sensörlerdir.

Enzimatik sensörlerin avantajları olarak gerek yapısal modifikasyona uğramış enzimlerin kullanımı, gerekse mevcut materyallerin tayin ve tespitinde kullanılması ayrıca biyo-mantık bir diğer deyişle biyomoleküler hesaplama alanına öncülük etmesi sayılabilmektedir [48].

### **2.2.2. İmmünosensörler**

İmmünokimyasal tepkimelerine dayalı olarak oldukça ayrıcalıklı antikor-antijen ilişkisini baz alan sensörlerdir. Üç temel sınıf altında immünosensörleri incelenmektedir. Bunlar optik, elektrokimyasal ve mikrogravimetrik immünosensörlerdir. Ayrıca immünosensörlerde dolaylı ve doğrudan olmak üzere 2 yaklaşım izlenmektedir. Dolaylı immünosensör yaklaşımında optik yöntemle ve etiketleme yoluyla algılama söz konusudur. Doğrudan yaklaşımda ise antijen ve antikor arasında etkileşimin ve spesifik bağlanmanın meydana getirdiği değişimin etiketsiz bir yolla izlendiği immünosensör yöntemidir. Doğrudan yaklaşımın izlendiği immünosensör kinetik mekanizmanın aydınlatıldığı SPR gibi cihazlar ile ortaya konulmaktadır [49].

Günümüzde immünoassay sisteminden baz alınarak oluşturulan immünosensörler gerek tıp gerekse gıda endüstrisinde yararlanılmaktadır. Özellikle klinik uygulamalarda immünosensörler umut vaat etmektedir. Şu ana kadar ticari olarak piyasaya sürülen ürün sayısı oldukça azdır. Bunun nedenleri arasında immobilizasyon sorunu, kullanılan antikorların ve yardımcı maddelerin fizikokimyasal özellikleri ve pratik uygulamada hastanelerdeki tıbbi laboratuvarlarda kullanılma durumu ve bu bağlamda kar-zarar durumu sayılabilmektedir.

İmmünosensörlerin biyolojik uygulamalar için herhangi bir ön işlem gerektirmeden direkt ölçüm yapabilirliği ortaya konulursa diğer analiz metotlarına göre fark yaratacaktır. Gelecekte yapılacak çalışmalar doğrultusunda sadece klinik uygulamalarda değil, ilaç sanayinde kalite kontrol laboratuvarlarında, gıda

endüstrisinde, çevre analizlerinde ve proteomiks çalışmalarında da kullanılmaya aday bir yöntemdir [50, 51].

### **2.2.3. Elektrokimyasal Sensörler**

Kimyasal değişimi elektrot vasıtasıyla elektrik enerjisine dönüştürerek sinyal veren kimyasal sensörlerdir [52].

Elektrokimyasal sensörler potansiyometrik, voltametrik ve konduktometrik olmak üzere üç ana sınıfa ayrılmaktadır. Bu ayırım elektriği ilettikleri yola bağlı olarak oluşmaktadır. Her üç grupta da elde edilen sinyaller akımda veya potansiyelde meydana gelen değişimi yansıtmaktadır [53]. Potansiyometrik elektrokimyasal sensörler iyon seçici elektrot vasıtasıyla bir bileşiğin aktivitesini ölçen sensörlerdir. Maliyet bakımından voltametrik ve konduktometrik sensörlere göre en avantajlı olan sensörlerdir. Ayrıca kullanımının oldukça pratik ve kullanımın kolay olması avantajları arasında yer almaktadır [54].

Voltametrik diğer adıyla amperometrik yöntemde ise örneğin derişiminde meydana gelen değişimi baz alarak redoks sırasında meydana gelen akımı ölçmektedir. Potansiyometrik sensörlere göre daha hassas ve oldukça hızlı ölçüm yapmalarıyla fark yaratmaktadır. Kondüktometrik sensörler ise elektrotlarda iletkenlik değişimine dayalı ölçüm yapan sensörlerdir. Bu sensörlerin seçicilik özelliği yoktur. O nedenle ölçümlerde hassasiyet oranı düşüktür [55].

Günümüzde oldukça yaygın kullanıma sahip elektrokimyasal sensörler çevre, tarım, oto sanayi ve tıp gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Bu konuda verilebilecek örneklerin başında piyasada var olan ve kan şekerini ölçmeye yarayan kan şekeri sensörleri gelmektedir. Görüldüğü üzere elektrokimyasal sensörler insan hayatını kolaylaştıran ve günlük hayatta birçok alette bulunan sensörlerin başında gelmektedir.

### **2.2.4. Optik Biosensörler**

Geleneksel metotlara göre birçok biyolojik ve kimyasal maddenin hassas etkin bir şekilde doğrudan ve eş zamanlı olarak tayininden ötürü büyük avantajlar sunmaktadır. Bu avantajlar arasında maliyet, kullanım kolaylığı, az miktarda örneklerle çalışabilme imkanı, kısa sürede ölçüm alabilme özellikleri yer almaktadır. Çağımızda oldukça popüler olan optik biosensörlerin

uygulanmasında nanoteknoloji, mikroelektromekanik sistemler (MEMS), kimya, biyoteknoloji, tıp gibi multidisipliner yaklaşımlar önemli rol oynamaktadır. Bu yaklaşımların ışığı altında optik biyosensörlerin çevre, gıda, tıp, ilaç, biyoteknoloji gibi birçok alanda güncel uygulamaları bulunmaktadır [56].

Optik biyosensörler diğer bir deyişle optik biyotanıma sistemleri etiketli ve etiketsiz olmak üzere 2 gruba ayrılmaktadır. Etiketsiz optik sistemlerde etiket kullanımı yoktur ve sisteme gönderilen sinyal direkt analit ile etkileşime girmektedir. Etiketli biyotanıma sistemlerinde ise etiket kullanımı söz konusudur. Bu sistemlerde ışıktan gelen sinyal farklı yollarla üretilmektedir. Bu yollar arasında kalorimetrik, floresans gibi yöntemlerle üretilmektedir. Örneğin şeker hastalığında kullanılan kandaki glukoz seviyesini ölçen sensörler etiketli biyotanıma sistemine girmekte olup, glukozun enzimatik oksidasyonu ile elde edilmektedir.

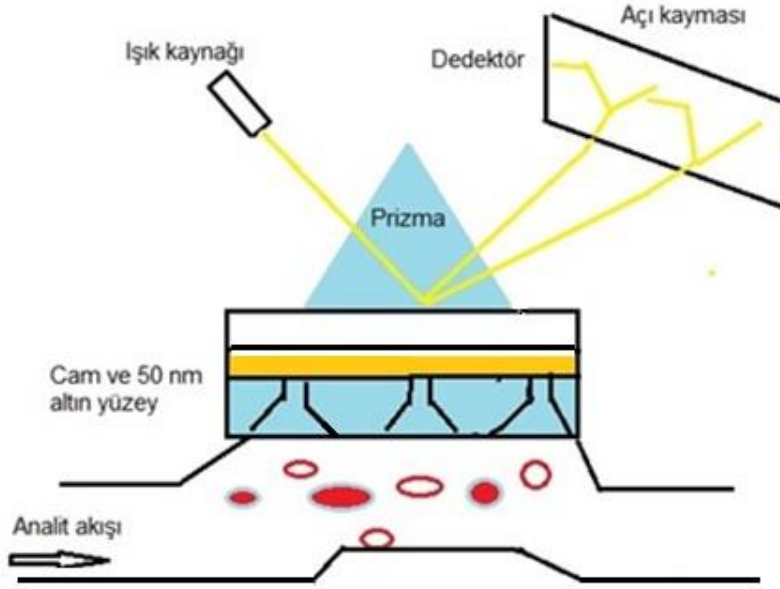
Optik biyosensörleri saymak gerekirse başlıca yüzey plazmon rezonans (SPR) sistemine değinmek gerekmektedir. 1983'te SPR'ın keşfiyle beraber onlarca yıl boyunca yüzey plazmon fiziğinin tam olarak anlaşılmasına yardımcı olmakla beraber başarılı çalışmalar yapılmıştır. Keşfi ile biyomoleküler etkileşimleri tespit etmek için SPR tabanlı sensörler oluşturulmuştur [57]. İlk ticari SPR tabanlı biyosensör cihazı, daha sonra Biacore olarak adlandırılarak Pharmacia Biosensor AB tarafından piyasaya sürülmüştür. Günümüzde oldukça fazla tercih edilen optik biyosensör olan SPR birçok firma tarafından üretilmektedir.

#### **2.2.4.1. Yüzey Plasmon Rezonans Sensörleri (SPR)**

Moleküllerin kimyasal bağ yapılarındaki etkileşime ve fonksiyonlarını baz alan SPR sensörlerin çalışma prensibi moleküler bağlanmanın gerçekleşmesi ile oluşan kırılma indisindeki değişimin spektral değişime yol açmasıdır (Şekil 2.6) . SPR'da meydana gelen bu değişim sensogram adı verilen x ekseninde zaman y ekseninde ise kırılma yüzdesi yani bağlanma grafiklerle ifade edilmektedir.

SPR sisteminde analit üzerine gönderilen ışık prizmadan geçtiği zaman yansımaktadır. Geliş açısının şiddeti yansıyan şiddetinden fazla olmakla beraber bu şiddetin fazlalığı yansıyan ışığın yüzey plazmonlarının uyarılması ile düşüşe neden olmaktadır. Kırılma indeksindeki düşüş ise açı kaymasında yol açmaktadır. Bu düşüşün maksimum olduğu açığa rezonans açısı diğer bir deyişle

SPR eğim seviyesi denmektedir. SPR sensör yüzeyindeki metal materyalin etrafındaki kırılma indeksindeki değişimleri izlemek mümkündür. Özellikle bir molekülün yüzeye bağlandığında kırılma indeksindeki değişimi görmek mümkün olmaktadır [58].



Şekil 2.6. SPR sensörlerinin çalışma prensibinin şematik görüntüsü

#### 2.2.4.2. SPR Sensörlerin Avantajları ve Zorlukları

SPR sensörün avantajları olduğu kadar dezavantajları da vardır. Avantajları arasında eş zamanlı biyomoleküllerin etkileşimlerini izlemeye yardımcı etiketsiz optik bir sensör oluşumu ile ilk sırada gelmektedir. Ayrıca analiz edilecek örneğin hazırlanmasının koaylığı, hassas ölçüm ve oldukça kısa sürede sonuç verebilme özelliği de SPR 'ı diğer optik sensörler arasında avantajlı konuma getirmektedir. Az miktarda örneğe gereksinim duyması, tekrar tekrar kullanılabilir olması ve en küçük moleküller arası etkileşimi bile saptayabiliyor olması SPR'ın diğer avantajlı olduğu noktalardır.

SPR'ın dezavantajlarını belirtmek gerekirse ekipmanlarının maliyetli olması, kalifiye personel ihtiyacı gerektirmesi olarak sayılabilmektedir. Ayrıca çalışırken oldukça hassas ve titiz bir şekilde çalışmak gerekmektedir. Çözeltilerin sisteme



verilmesi sırasında sistemde yer alan kılcal borularda en ufak bir hava kabarcığının oluşması bile sistemi olumsuz etkilemektedir.

### **2.3. Nanoteknoloji ve Uygulama Alanları**

1960 yılında Richard Feynman'ın çabalarıyla ortaya çıkarılan mucizevi özelliklerin ışığında, günümüzde oldukça popüler hale gelen nanoteknoloji hayatımızın bir parçası olma yolunda hızla ilerleyen multidisipliner bir bilim dalıdır. Aslında geçmişi çok eskilere dayanan nanoteknoloji; kelime olarak 'nano' terimi Yunanca'dan gelmektedir. Yunanca'da bu sözcük cüce anlamına gelmekte olup; metrenin milyarda birine (1 nanometre =  $10^{-9}$  metre) eşittir. Nanoteknolojide bir diğer önemli isim ise Amerika'dan Eric Drexler'dir. Özellikle nanoteknoloji terimini ilk defa ortaya koyarak bu alanda önemli çalışmalara imza atmıştır [59,60,61].

Nanoteknolojiye artan ilgiyle beraber nanoboyut kavramı da hayatımıza girmeye başlamıştır. Nanoboyut denildiğinde materyallerin optik, mekanik, morfolojik ve manyetik gibi fiziksel özellikleri değişmektedir. Örneğin tarihte altın nanopartiküllerin nanometre boyutundaki değişimleri partiküllerde renk değişime yol açtığından cam, porselen, mozaiklerde kullanılmıştır [59, 60]. Ayrıca bu değişen özelliklerle beraber atomlar arası moleküler kuvvetlerde de değişiklikler olmaktadır. Bu bağlamda günlük hayatta gözle görülen, elle tutulan materyallerde fizik yasası olarak Newton mekaniği kullanılırken nanoboyuttaki materyallerde bu durum değişmektedir. Nanoyapılar söz konusu olduğunda kuantum mekaniği devreye girmektedir [60, 62]. Nanoteknolojik yapıları ayrıcalıklı kılan bir diğer önemli özellik ise artan yüzey alanı/hacim oranıdır. Bu özellik sayesinde daha dayanıklı daha güçlü nanoyapılar ortaya çıkmaktadır. Örneğin nanopartiküllerde bu oran oldukça yüksektir. Bu nedenle nanopartiküller kullanıldığında yüksek floresans ışımaya sahip, oldukça hafif ama bir o kadar güçlü fonksiyoneller yapılar elde etmek mümkündür.

Nanoteknoloji multidisipliner bir bilim dalı olduğundan kullanım alanları da oldukça geniş bir spektruma sahiptir. Ayrıca daha az enerjiye ihtiyaç duyarak daha güçlü yapıların oluşturulmasına imkan vermesi, daha az sarf teminiyle farklı kombinasyonlarının biraraya gelerek minimal ölçekli yapıların oluşmasına imkan sağlaması da nanoteknolojiyi avantajlı kılmaktadır. Bu avantajlarından dolayı tıp,

savunma, gıda güvenliği, kozmetik, ilaç sanayi gibi birçok alanda kullanılmaktadır [63]. Nanoteknolojinin yardımıyla insan sağlığını ve gıda güvenliğini tehdit eden; tarımda yabancı otların öldürülmesinde kullanılan herbisitlerin tespitine yönelik nanosensörlerin yapılması kısa sürede doğru ve güvenilir sonuçların alınmasına olanak sağlamaktadır [64]. Son dönemlerde özellikle çevre kirliliğine karşı nanoteknolojik çözümlerde devreye girmektedir. Özellikle suların kirlenmesine yol açan ve buradaki ekosisteme zarar veren arseniğin remediasyonunda demir oksit nanopartikülleri kullanılmaktadır [59]. Kozmetik sektöründe de nanoteknolojik ürünler günlük hayatta önemli bir yer tutmaktadır. Birçok ünlü markanın nemlendirici kremleri, güneş kremleri, yüz temizleme jelleri ve yaşlanma karşıtı bakım kremlerinden özellikle nanopartiküllerden yararlanılmaktadır [65]. Ayrıca sağlık alanında da nanoteknoloji avantajlarından yararlanılmaktadır. Gerek görüntüleme, gerekse ilaç sektöründe nanopartiküller, kuantum noktaları ve nanomateryaller kullanılmaktadır. Örneğin kanser tedavisinde kemoterapi ilaçlarında yer alan nanopartiküller sayesinde sadece hedef organı baz alan çevre dokuya ve organlara zarar vermeyen kontrollü ilaç salımları yapılabilmektedir. Ayrıca kuantum noktalarının floresans ışımaya özelliği sayesinde kanserli dokuyu görüntüleme olanağı sağlamaktadır [66]. Görüldüğü üzere nanoteknoloji birçok alanda günlük hayatımızı kolaylaştıran çözümler sunarak geleceğe umut vaat etmektedir.

#### **2.4. Nanopartiküller ve Nanosensörler**

Nanoteknolojinin uygulama alanlarının temel yapıtaşlarından biri olan nanopartiküller diğer bir adıyla nanoküre ya da nanokapsüller 10 ila 1000 nm arasında değişen boyutlarda homojen bir görünüme sahip ama aslında tam olarak çözünmemiş heterojen yapıda ara karışımlardır. Nanoküre ve nanokapsülü nanopartikülden ayıran belirgin özellikleri vardır. Nanokürede solüsyon içerisinde etkin homojen bir dağılım söz konusudur. Nanokapsülde ana fonksiyon görevi gören maddenin etrafı bir membranla ile çevrilidir. Nanopartiküller ile yapılan kontrollü ilaç salımı çalışmalarında istenen özelliklerin başında nanopartiküllerin homeostasisi bozmayacak şekilde parçalanması ve parçalanma sonrasında açığa çıkan parçaların toksisite oluşturmamasıdır [67]. Özellikle aynı boyuttaki nanopartiküller moleküler yapılarda işaretleyici olarak kullanılmaktadır. Özellikle biyolojik işaretlemede tıp alanında görüntüleme

özelliğinde kolaylık sağlamasından dolayı nanopartiküllerden yararlanılmaktadır [68]. Nano ölçekli malzemelerin temelini oluşturan nanopartiküller yüzey/hacim oranının fazla olması, kuantum mekaniğinin oluşturduğu etkileşimler ve yüzey karakterizasyonun benzersizliği gibi özellikleriyle biyomedikal sektöründe de geniş bir kullanıma sahiptir [69].

Nanopartiküllerin sentezi nanoteknolojik ürünlerin çeşitlenmesinde ve çeşitli alanlarda kullanılmasında ilk adım olmuştur. Özellikle günümüzde oldukça popüler olan nanosensörlerin ticarileştirilmesi ve birkaç ürünün pazara ulaştığı bilinmektedir. Bu pazarlar dünyanın büyük ve yüksek teknolojlili şirketlerinin birçoğunu içermektedir [70]. Nano ölçekli malzemelere kıyasla benzersiz fizyokimyasal özellikleri, biyolojik etkileşimlerde uyumluluğu ve fonksiyonel tasarım özellikleriyle nanosensörler oldukça popüler bir hale gelmiştir [71, 72]. Nanosensörler ve uygulama alanları çizelge 2.2'de yer almaktadır [70].

Çizelge 2.2 Nanosensörler ve uygulama alanları

Endüstri Alanı	Uygulamaları
Sağlık	Hızlı teşhis, görüntüleme, medikal araştırmalar, ilaç üretimi
Savunma	Savunma alanında üretilen kimyasal ve biyolojik materyallerin tespiti ve silah yapımı
Çevre	Pestisitlerin tayini, zararlı kimyasallar ve kirlilik tespiti
Gıda	Tağışış, patojenlerin saptanması, kontaminasyon
Nanoteknoloji	Nanomateryal ve nanoyapıların karakterizasyonu

Nanosensörlerde önemli hedeflerden biri vücudun kimyasını tamamen aydınlatmak ve dolayısıyla farklı biyolojik süreçleri çok daha büyük bir ölçekte ilişkilendirmektir. Dünyada nanoteknoloji alanındaki hızlı ilerleme göz önüne alındığında nanosensörler hayatımızın bir parçası olarak her alanda karşımıza çıkacaktır.

## 2.5. Moleküler Baskılama

Son yıllarda oldukça popüler hale gelen seçicilik ve özgülük kavramlarını temel alan bu yöntem 1972 yılında Günter Wulff ve ekip arkadaşlarının sentezledikleri yapay polimerlerin üç boyutlu yapılarında fonksiyonel bölgelerinde seçici bağlanma bölgelerinin oluşturulması ortaya konulmuştur. Özellikle günümüzde gıda güvenliğine yönelik çalışmalar, pestisit tayini, ilaç endüstrisi ve savunma sanayinde spesifik molekülleri tespit etmeye yönelik araştırmalar moleküler tanıma yöntemlerine yönelmiştir. Moleküler tanıma yöntemlerinde biyolojik sistemlerde anahtar-kilit ilişkisi olarak adlandırılan örneğin enzim-substrat, antijen-antikor gibi analiz edilmek istenen moleküle seçici afinitesi olan yöntemleri içermektedir [73,74].

Moleküler baskılama teknolojisinde kalıp molekül ve fonksiyonel monomer olmak üzere iki temel yapı söz konusudur. Burada fonksiyonel monomerlerin kalıp molekül ile kimyasal etkileşime girmesi ve bu etkileşim sonrasında uygun bir işleme tabi tutulup işlevsel özelliklere sahip polimerlerin oluşturulması hedeflenmektedir. Oluşturulan bu polimerlerde desorpsiyon aşamasında kalıp molekülün uzaklaştırılması ile kalıp moleküle spesifik boşluklar oluşmaktadır. Kalıp molekülün uzaklaştırılmasından sonra kalıp molekülün etrafındaki fonksiyonel monomerler kalmaktadır. Bu monomerler tayin veya ayırma işlemleri için kullanılacak yapıya özgü ve benzer özelliğe sahip olduğu için yüksek seçicilik göstermektedir. Bu özgül ve spesifik olarak hazırlanan polimerlere moleküler baskılanmış polimerler (MIP) denmektedir [75].

MIP olarak adlandırılan bu üç boyutlu polimer yapının oluşumunda fonksiyonel monomer ve çapraz bağlayıcı olarak tanımlanan kimyasallar rol oynamaktadır [76]. Üç boyutlu polimerlerden tanımlanması istenen molekülün desorpsiyonu ile kalıp molekülün birebir aynısı olan bir şablon oluşmaktadır.

MIP'ler gerek fiziksel gerekse kimyasal açıdan diğer polimerlere göre oldukça dayanıklıdır. Isığa, asit, baza karşı ve organik çözücülere, moleküler strese oldukça dayanıklıdır. Bu üstün özelliklerinin yanısıra kolay üretimi, az maliyetli oluşu ve birkaç yıl bozunmadan stabil kalmaları ile de MIP'ler, sensör çalışmalarında öncelikli olarak tercih edilmektedir [77].

MIP'ler ilk bulunduğu zamanda kullanım alanı oldukça kısıtlı kalmıştır ve araştırmalar nanomalzemeler alanına kaymıştır. Ama son yıllarda fonksiyonel monomer sayısındaki artış, moleküler baskılama metotlarındaki değişiklik ve kullanım alanlarındaki artış ile beraber MIP bazlı sensörlere yönelik ilgi oldukça artmıştır [78].

Yüksek seçicilik ve özgülük göstermelerine rağmen MIP teknolojisinde şablonda oluşan boşluklara özellikle yabancı küçük moleküllerin bağlanması ve molekül dağılma bölgelerinin heterojen olması bu üstün özellikleri dezavantaja dönüştürmektedir. Ama son yıllarda MIP alanında farklı yöntemlerin ve nanopartiküllerin kullanılmasıyla bu dezavantajlar avantaja çevrilmektedir [79].

### **2.5.1. Moleküler Baskılamanın Aşamaları**

Moleküler baskılama temel olarak 3 aşamadan oluşmaktadır. Bu aşamalar kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki etkileşimlere dayanmaktadır. İlk aşama kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasında bağ oluşumu, ikinci aşama polimerizasyon olarak adlandırılan tüm yapının bir bütünlük gösterip tek bir yapı olarak polimer oluşturduğu basamaktır. En son aşama ise desorpsiyon yani kalıp molekülün polimer yapısından ayrıldığı basamaktır [80].

#### **1) Bağ oluşumu**

Ön kompleksleşme adı da verilen bu basamakta kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasında bağ oluşumu gerçekleşmektedir. Bu bağlanma kovalent ya da kovalent olmayan fakat güçlü etkileşimlerle meydana gelmektedir. Etkileşimin meydana gelmesinde kalıp molekülün kimyasal ve sterokimyasal özellikleri önemli rol oynamaktadır.

#### **2) Polimerizasyon**

Sulu çözelti içerisinde ve uygun koşullar altında kalıp molekül ile fonksiyonel monomerin uygun bir çapraz bağlayıcı ile polimer haline getirmektir. Bu aşamada çapraz bağlayıcının önemli fonksiyonu bulunmaktadır.

#### **3) Kalıp molekülün desorpsiyonu**

Desorpsiyon yani ayrılma olarak ifade edilen aşamada kalıp molekülün elde edilen polimerden uzaklaştırılmasıdır. Böylece hedef molekül için yapıda uygun

boşluklar meydana getirilmektedir. Bu aşamada özellikle spesifikitenin oluşumu ve seçicilik açısından kalıp molekülün ve fonksiyonel monomerin seçimi oldukça önem taşımaktadır [81].

## **2.5.2. Moleküler Baskılama Yöntemleri**

Moleküler baskılama yöntemleri fonksiyonel monomer ile kalıp molekül arasındaki kimyasal bağın çeşidine sınıflandırılmıştır. Kovalent ve kovalent olmayan baskılama olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır.

### **2.5.2.1. Kovalent baskılama**

Kovalent baskılamada kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasında tersinir kovalent bağlanma gerçekleşmektedir. Polimerizasyon işleminden önce gerçekleşen bu işlemde, polimerizasyon sonrası ise bağlar kırılmaktadır. Bağların kırılmasıyla kalıp molekül yapıdan uzaklaşmaktadır. Hedef molekül varlığında ise bu bağlar yeniden oluşmaktadır. Bu bağlamda kovalent baskılama yönteminin avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır [82].

#### **\* Avantajları**

- Kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasında tersinir kovalent bağlanma olduğundan homojen bir dağılım söz konusudur. Böylece bağlanma noktalarında heterojenite gözlenmemektedir.
- Kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki güçlü kovalent bağlanma nedeniyle polimerizasyon şartları polimer oluşumunu etkilememektedir.

#### **\* Dezavantajları**

- Kovalent baskılama yönteminin ilk ve en önemli dezavantajı maliyetli oluşudur.
- Güçlü kovalent bağlanma sonrasında desorpsiyon aşaması zor olmasıdır.
- Hedef molekülün bağlanma kinetiği ve sayısı kısıtlıdır [73,82].

### **2.5.2.2 Kovalent olmayan baskılama**

Kovalent olmayan baskılama yönteminde kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasında hidrojen bağları ve elektrostatik etkileşimler ile gerçekleştirilmektedir. Kovalent olmayan baskılamanın kolaylığı ve maliyetinin uygun oluşuyla son yıllarda özellikle bu yöntem tercih edilmektedir. Ayrıca özel bağlanma bölgelerinin

oluşumu ve kopolimerizasyon ile bağlanma gerçekleşmektedir. Kovalent olmayan baskılama yönteminin de avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır [73].

#### \* **Avantajları**

- Kovalent olmayan baskılama yönteminin ilk ve en önemli avantajı kolay ve uygun maliyetli oluşudur.
- Hedef molekülün bağlanma kinetiği hızlı ve bağlanma bölgeleri oldukça fazladır.
- Kovalent olmayan bağlanmada desorpsiyon aşamasının kolay olmasıdır.

#### \* **Dezavantajları**

- Kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki non-kovalent bağlanma nedeniyle polimerizasyon şartları polimer oluşumunu etkilemektedir.
- Fonksiyonel monomerlerin kullanım fazlalığından ötürü özgüllük azalmakta ve non-spesifik bağlanmalar meydana gelmektedir [83].

### **2.5.3. Moleküler Baskılama Bileşenleri**

Moleküler baskılama temel olarak 4 bileşenden oluşmaktadır. Bunlar başlıca fonksiyonel monomerler, kalıp molekül, çapraz bağlacılar, çözücüler ve başlatıcılardır.

#### **2.5.3.1. Fonksiyonel monomerler**

Fonksiyonel monomerler moleküler baskılamada oldukça önemli rol oynamaktadır. Fonksiyonel monomerlerin kimyasal yapılarındaki fonksiyonel gruplar ile baskılamada kullanılacak olan kalıp molekül ve hedef molekülün fonksiyonel gruplarının uyuşması gerekmektedir. Ayrıca fonksiyonel monomer seçiminde ise dikkat edilmesi gereken bazı noktalar vardır. Bunlardan bir tanesi seçilen monomerin polimerleşebilme özelliğinin olması gerekmektedir. İkinci bir nokta ise fonksiyonel grupların uyuşmasının yanısıra kalıp molekül ile kuvvetli bir bağlanma gerçekleştirebilmesi gerekmektedir. Fonksiyonel monomerlere örnek vermek gerekirse; metakrilik asit (MAA), 2-Hidroksietil metakrilat (HEMA), 4-Vinil piridin sayılabilmektedir [84].

### **2.5.3.2. Hedef - Kalıp molekül**

Öncelikli olarak hedef ya da kalıp molekülün kararlı olması yüksek sıcaklıklara dayanabilmesi, polimerleşebilecek bir yapıya sahip olması gerekmektedir. Gerek kovalent gerekse nonkovalent bağlanma tekniğinde güçlü bir bağlanmanın olabilmesi için etkileşime açık bağ yapabilen kimyasal gruplarının olması gerekmektedir. Ayrıca kalıp moleküller hem fizikokimyasal hem de sterokimyasal olarak hedef molekül ile birebir benzerlik göstermesi gerekmektedir. Kalıp molekülün polimerizasyon aşamasında çevresel koşullardan etkilenmeyip yapısının bozulmaması da başlıca aranan özellikler arasında sayılmaktadır. Kalıp moleküllere örnek verilecek olursa; iyonlar, hormonlar, herbisitler ve ilaçlar sayılabilmektedir [84].

### **2.5.3.3. Çapraz bağlayıcılar**

Çapraz bağlayıcılar polimerizasyon işlemi sonrasında oluşan polimer yapının hem mekanik hem de kimyasal açıdan kararlı olmasını sağlamaktadırlar. Fonksiyonel monomerlerle uyumsuzluk etkin bir baskılamanın olmasında en büyük engel teşkil etmektedir. Ayrıca çapraz bağlayıcının tepkime içerisindeki mol oranı çok önemli rol oynamaktadır. Eğer çapraz bağlacının mol oranı fonksiyonel monomerden fazla ise non kovalent bağlanmalara yol açarak moleküler baskılanmayı etkisiz kılmaktadır. Tam tersi bir durum söz konusu olursa da kalıp molekülün bağlanma noktaları arasındaki mesafe kapanarak moleküler baskılanma kısıtlanmış olmaktadır. Bu nedenle çapraz bağlayıcıların çözücüdeki sitokiyometrik oranları değer bileşenler açısından önem taşımaktadır. Günümüzde kullanılan çapraz bağlayıcılara örnek verilecek olursa Etilenglikol dimetakrilat (EDMA) ve N,N-metilendiakrilamit sayılabilmektedir [85].

### **2.5.3.4. Çözücüler ve Başlatıcılar**

Moleküler baskılamada kullanılan çözücüler ve başlatıcıların ayrı bir önemi bulunmaktadır. Çözücüler özellikle non kovalent moleküler baskılama tekniğinde hedef molekül ya da kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki etkileşimi arttırmaktadır. Ayrıca polimerizasyon sırasında meydana gelen ısının eşit bir şekilde reaksiyon yüzeyine yayılmasını sağlayarak bazı bölgelerde oluşabilecek aşırı ısınmanın önüne geçmiştir olmaktadır.



Başlatıcılar ise adından da anlaşılacağı üzere kimyasal reaksiyonun yani polimerizasyonun başlamasında aktif rol oynamaktadır. Aktivasyon enerjisini düşürerek tepkimenin başlamasına yardımcı olmaktadır. Başlıca peroksitler ve azo yapısını içeren bileşikler başlatıcılar içerisinde sayılabilmektedir. En yaygın kullanılanı ve yüksek sıcaklarda bozulma eğilimi gösteren başlatıcı azobisisobutironitildir (AIBN) [85] .

#### **2.5.4. Moleküler Baskılama Uygulama Alanları**

Son yıllarda moleküler baskılamaya artan ilgiyle beraber bu alandaki çalışmalar artmıştır. Kullanım alanları yaygın bir spektrum çizmektedir. Özellikle biyolojik sensörler, kimyasal sensörler olarak kullanımı ön plana çıkmaktadır [86, 87].

Çalışması kolay ve maliyetinin düşük oluşuyla MIP'lar, ilaç ve tıp alanında, boya sanayinde, gıda tağşişinde, çevreyi olumsuz etkileyen herbisit/pesitisit kullanımının tayinini gibi daha birçok alanda karşımıza çıkmaktadır. İlaç sanayinde özellikle proses validasyonu aşamasında ilaçları izlemek, içerik kontrolünün sağlanmasında etkin rol oynamaktadırlar [88]. Ayrıca tıp alanında çığır açan uygulamalar ile de MIP'lar gündeme gelmektedir. Tersinir bağlanma kapasitesine sahip olmalarından ötürü ilaç taşıyıcı sistemlerde, vücut sisteminde ilaçların takibinde reseptör olarak kullanılmaktadırlar [89]. Bir diğer MIP'ların yaygın olduğu alan ise gıda sektörüdür. Burada gıda tağşişinde özellikle önemli rol oynamaktadırlar [90,91].

Günümüzde son yıllarda yapılan çalışmalardan bir tanesi de moleküler baskılama yöntemi kullanılarak protein benzeri yapay polimerlerin üretilmesi olmuştur. Böylece proteinlere benzer yapay polimerlerin oluşturulması ile birçok avantaj oluşmaktadır. Proteinlerin yüksek sıcaklıklarda bozulması, hassas yapıya sahip olmaları, maliyetlerinin yüksek olup, üretiminin zor olması gibi engeller MIP'lar ile aşılmıştır [92].

#### **2.6. Literatürde Yer Alan Diğer Çalışmalar**

Son günlerde kurkuminin özellikle sağlık alanında terapötik etkilerinden dolayı oldukça popüler olması bilim insanlarını bu konuda çalışmaya yöneltmiştir. Kurkumin tayinine yönelik sensör çalışmaları başta olmak üzere birçok çalışma yapılmıştır.

Bu çalışmalardan bir tanesi 2016 yılında Food Analytical Methods dergisinde yayınlanmıştır. Bu çalışmada distile su, atık su, musluk suyu, tarçın surubu ve tarçın ayı gibi gıda örneklerinden kurkuminin tayini için mikro yüzey hacim spektrofotometrisi kullanılmıştır. Sıvı-sıvı mikro ekstraksiyon yöntemiyle ekstrakte edilen kurkuminden  $10\text{--}2000\text{ ng/mL}^{-1}$  derişim aralığında regresyon katsayısı 0.99 olan doğrusal bir kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. LOD değeri  $0.23\text{ ng/mL}^{-1}$ , LOQ değeri ise  $0.78\text{ ng/mL}^{-1}$  bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmada deney koşullarını optimize etmek için merkezi kompozit tasarımı (CCD) ve istatistiksel varyans analizi ANOVA kullanılmıştır [93].

Bir diğer çalışma ise PCR çalışmasına dayalı kurkumin tayinine yönelik olarak Sasikumar ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada piyasada yer alan 3 adet kurkumin tozunun Polimorfik DNA'nın Rastgele Amplifikasyonu (RAPD) yöntemiyle analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu alışma sonunda piyasada yer alan kurkumin örneklerinden bazılarının daha ucuz ve kurkuminoid içeriği bakımından farklı olan yabanıl tür olduğu saptanmıştır. Ayrıca gerek renk farklılığı gerekse insan sağlığı açısından tehdit oluşturabilecek bu ürünlerin kalite kontrol analizlerinde yeni bir metot olarak bu PCR metodu ortaya konmuştur [94].

2011 yılında Sasikumar ve arkadaşları tarafından bir önceki çalışmalarında olduğu gibi uluslararası olarak ticareti yapılan önemli bir tıbbi baharat ürünü olan kurkuminle ilgili yapılan yönelik sekans analizinden yola çıkarak çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada işlem görmüş zerdeçal tozundaki karışımları tespit etmek için spesifik, hassas ve tekrarlanabilir Sekans Karakterize Amplifiye Bölge (SCARs) belirteçlerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Hızlı ve güvenilir bir şekilde geliştirilen bu yöntemle  $10\text{ g/kg}$  gibi daha düşük derişimlerde, kurkumin miktarını tespit edebilen SCAR belirteçlerinin etkinliği ortaya konulmuştur [95].

2019 yılında yapılan bir çalışmada ise yağsız sütten elde edilen kazein proteini ile kurkumin arasındaki etkileşimin termodinamik ve kinetik parametrelerini belirlemek için SPR ve ultraviyole-görünür spektrofotometrisi (UV-vis) kullanılmıştır. Kazein miselleri ve kurkumin kompleksinin in vitro olarak HeLa hücreleri vasıtasıyla kanser hücrelerine kurkuminin taşınmasına yönelik nano taşıyıcı olarak görev yapabilme fonksiyonu üzerinde çalışılmıştır [95].

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

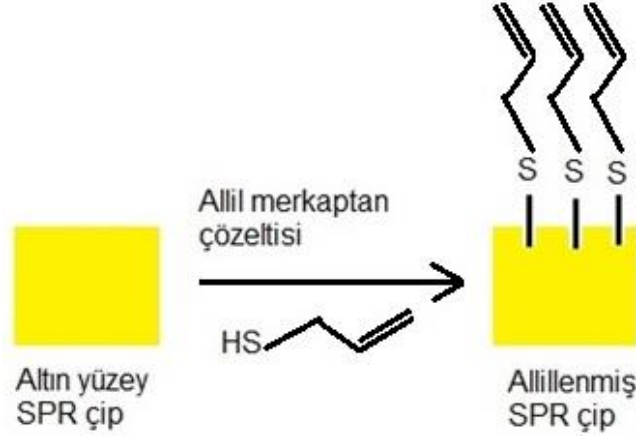
#### 3.1. Kullanılan Kimyasallar

Tez kapsamında kalıp molekül olarak kullanılan kurkumin ve 2-hidroksietilmetakrilat (HEMA), etilenglikoldimetakrilat (EGDMA), deneyi başlatıcı aktivatör olarak kullanılan amonyum persülfat (APS) ve sodyum bisülfid Sigma-Aldrich (Steinheim, Almanya) firmasından temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan diğer kimyasallar ise Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından alınmıştır. Çalışmada gerçek örnek denemesinde kullanılan çay ve baharatlar ise yerel marketlerden sağlanmıştır.

#### 3.2. Kurkumin Baskılanmış ve Baskılanmamış Poli (HEMA-MATrp) SPR Nanosensörlerin Hazırlanması

##### 3.2.1. Sensör Çip Yüzeyinin Modifikasyonu

SPR nanosensörlerin çip yüzeyini analize hazırlamak için allil merkaptan ( $\text{CH}_2\text{CHCH}_2\text{SH}$ ) ile tiyol (-SH) grupları oluşturularak yüzey modifikasyonu yapılmıştır. Bunun için ilk önce 20 mL pirana çözeltisinde birkaç saniye bekletilen çip yüzeyi daha sonra etil alkol ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi ile temizlenen çip yüzeyi 200 mmHg basınç ve 40°C sıcaklığında vakum etüvünde 3 saat boyunca kurutulmuştur. Kurutulmuş olan çip yüzeyine eşit biçimde dağılacak şekilde 5 µL allil merkaptan damlatılarak karanlık bir ortamda ve oda sıcaklığında 12 saat boyunca bekletilmiştir. Bu süre sonunda allille muamele edilmiş çip yüzeyi etanol ile yıkanıp, kurutulmuştur. Böylelikle altın sensör yüzeyine polimerle etkileşime girecek -SH grupları bağlanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. SPR nanosensör çip yüzey modifikasyonun şematik gösterimi

### 3.2.2. Kurkumin-MATrp Çözeltilerinin Hazırlanması

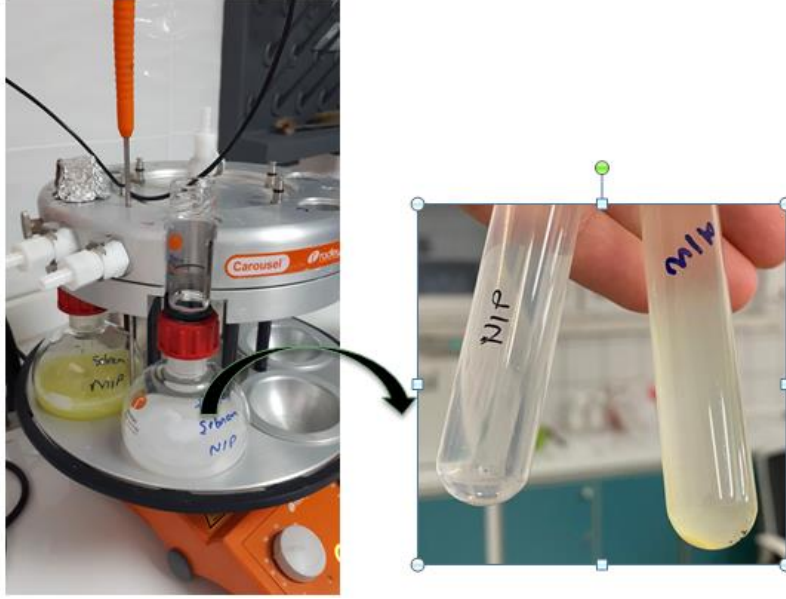
Tez kapsamında kalıp molekül olarak kullanılan kurkumin farklı oranlarda MATrp monomerinde çözülerek bir karışım oluşturulmuştur. Bunun için kurkumin miktarı sabit olacak şekilde 1, 2, 4 ve 8  $\mu\text{mol}$  oranlarında MATrp eklenerek 4 farklı stok çözelti elde edilmiştir. Elde edilen stok çözeltilerden 20  $\mu\text{L}$  alınarak toplam hacim metanol ile 600  $\mu\text{L}$ 'ye tamamlanmıştır. Daha sonra ise 420 nm dalga boyunda UV spektrofotometrede ölçümleri yapılmıştır. En yüksek absorbanans değerine sahip olan stok çözelti kurkumin baskılanmış nanopartikül sentezinde kullanılmıştır.

### 3.2.3. Kurkumin Baskılanmış ve Baskılanmamış Nanopartiküllerin Hazırlanması

Kurkumin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) nanopartiküllerin yapılmasında toplam üç tane sıvı faz karışımı hazırlanmıştır. Öncelikle birinci fazın hazırlanmasında 200 mg PVA, 30 mg SDS ve 25 mg sodyum bikarbonat 10 mL suda manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Bir sonraki aşamada yağ fazı olarak adlandırılan sıvı fazda 2.1 mL çapraz bağlayıcı EGDMA, 0.45 mL fonksiyonel monomer HEMA ve UV spektrofotometrede en yüksek absorbanansı veren kurkumin (1  $\mu\text{mol}$ ) ve MATrp (4  $\mu\text{mol}$ ) ön kompleksi olarak 600  $\mu\text{L}$  kullanılmıştır. Hazırlanan yağ fazı birinci faza eklenerek 30 dakika boyunca 24.000 rpm'de karıştırılarak homojenize edilmiştir. Karışıma bir diğer sulu faz; 200 mL suda çözündürülerek hazırlanan 100 mg PVA ve 200 mg SDS çözeltisi eklenerek sonikatörde 15 dk.

karıştırılmıştır. Daha sonra elde edilen bu karışım polimerizasyon cihazına aktarılmıştır. En son olarak polimerizasyonu başlatıcı aktivatörler olan 230 mg sodyum bisülfid ve 252 mg APS karışıma eklenmiştir. Reaktörde 450 rpm hızında ve 40°C'de 24 saat boyunca polimerizasyon gerçekleştirilmiştir. Polimerizasyon sonrası elden edilen nanopartiküllerden yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Bunun için 5 kez art arda etil alkol ve saf su ile yıkanmıştır. Her yıkama basamağından sonra 9000 rpm hızında santrifüj edilerek bağlanmayan moleküllerin partikül yapısından uzaklaşması sağlanmıştır. Daha sonra yıkama işlemi tamamlanan nanopartiküllerden 4 µL hacminde alınarak alillenmiş çip yüzeyine damlatılmıştır. Spin coater cihazı ile çip yüzeyine homojen olarak dağılımı sağlanan nanopartiküllerin 100 W gücündeki UV ışığı altında 40 dakika boyunca fotopolimerizasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Kurkumin baskılanmış nanopartikül sentezinde en son basamak ise polimerizasyon reaksiyonunda bağlanmayan yapıların çip yüzeyinden uzaklaştırmaktır. Bunun için saf su ve etanol ile altın çip yüzeyi yıkanıp kurutulmuştur.

Kurkumin baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) nanopartiküllerin hazırlanmasında ise kalıp molekül olarak kullanılan kurkumin eklenmeden aynı sentez basamakları uygulanmıştır. Bunun için birinci faz 200 mg PVA, 30 mg SDS ve 25 mg sodyum bikarbonat 10 mL suda çözülerek hazırlanmıştır. Yağ fazı olarak adlandırdığımız diğer faz ise 2.1 mL EGDMA, 0.45 mL HEMA ve kalıp monomer MATrp 197.6 µL karıştırılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan birinci faza yağ fazı eklenerek sonikatörde karıştırılmıştır. Sentezde yer alan bir diğer faz olan 100 mg PVA ve 200 mg SDS kristali 200 mL suda çözüldürülerek hazırlanan karışıma eklenmiştir. Daha sonra cam polimerizasyon cihazına aktarılan baskılanmamış nanopartikül çözeltisine aktivatör olarak 230 mg sodyum bisülfid ve 252 mg APS eklenmiştir. Polimerizasyonun başlaması için gerekli olan 40°C sıcaklık ve 450 rpm karıştırma hızında nanopartiküller 24 saat boyunca bekletilmiştir (Şekil 3.2). Kurkumin baskılanmış nanopartikül sentezinde olduğu gibi tepkimeye girmeyen monomerlerin ortamdan uzaklaştırılması için seri halinde 5 kez saf su ve etanol ile yıkanıp 9000 rpm'de santrifüj edilmiştir. En son basamakta ise kurkumin baskılanmamış nanopartiküllerin çip yüzeyine immobilizasyonu UV ışığı altında gerçekleştirilmiştir ve çip yüzeyi bağlanmayan yapıların uzaklaştırılması için yıkanmıştır.



Şekil 3.2.Kurcumin baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) nanopartiküllerin polimerizasyon cihazındaki ve yıkama işlemi sonrasındaki görüntüleri.

### 3.2.4. Kalıp Molekül Kurcuminin Desorpsiyonu

Kurcumin baskılanmış SPR nanosensörlerin yüzeyinden kurcuminin uzaklaştırılması için 0.5 M NaCl çözeltisi kullanılarak yaklaşık 1 saat kadar yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Her yıkamada da desorpsiyon çözeltisi olan NaCl değiştirilmiştir.

## 3.3. Kurcumin Baskılanmış poli(Hema-MATrp) Nanosensörlerinin Karakterizasyonu

### 3.3.1. Zeta Boyut Analizi

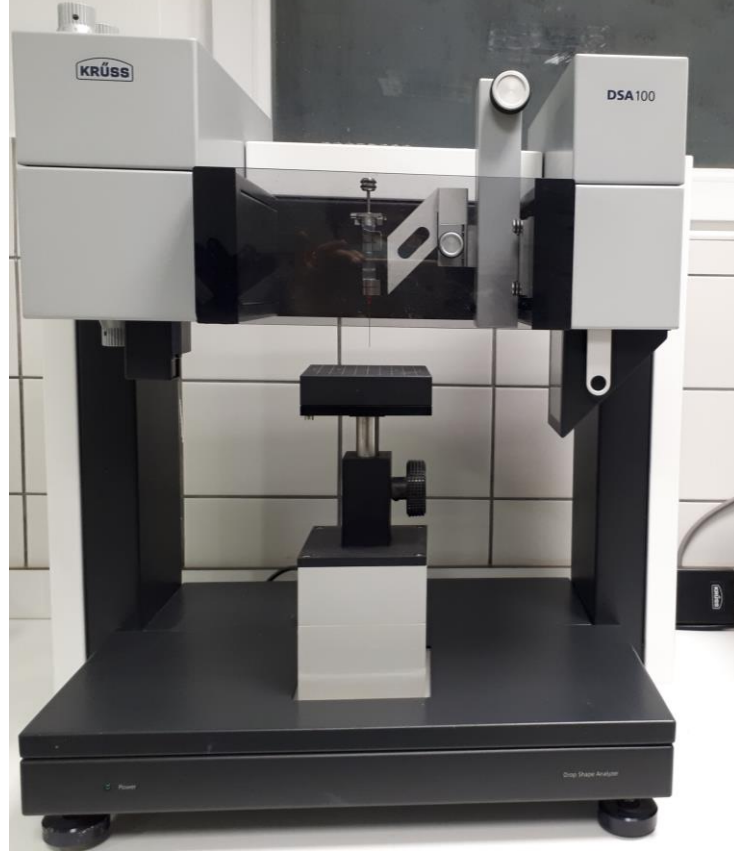
Kurcumin baskılanmış nanopartiküllerin boyut analizi ölçümleri menşei İngiltere olan Malvern marka Nano Zetasizer cihazında yapılmıştır (Şekil 3.3). Zeta boyut analizi kırılma indeksi 1.2 ile 1.65 aralığında olan cihazla ışığın moleküler düzeydeki itme ve çekme kuvvetinin ölçümü sonucunda partikül boyutuna ve koloidal çözelti içerisindeki dağılımı hakkında bilgi vermektedir. Bu amaçla nanopartikül çözeltisinden 1 mL kadarı kuvarz küvete aktarılarak ölçüm alınmıştır. Ölçümler 3 kez tekrarlanıp ortalaması alınarak boyut ve dağılım verileri ortaya konmuştur.



Şekil 3.3. Nano Zetasizer cihazı

### 3.3.2. Elipsometre Ölçümleri

Tez çalışması kapsamında bir diğer karakterizasyon çalışması nanosensör yüzeylerinin yüzey kalınlığını ölçmek üzere elipsometre ölçümleri yapılmıştır. Elipsometre cihazı ışığın yüzey üzerinde kırılması ve yansımayla meydana gelen kutuplaşma farkının ölçülmesi sonucu yüzey kalınlığı hakkında bilgi vermektedir. Bunun için EP3-Nulling Elipsometre (Almanya) cihazı kullanılmıştır (Şekil 3.4). Ölçümler 532 nm dalga boyunda gelen ışıkla 3 tekrarlı 6 farklı noktanın ölçümüyle gerçekleştirilmiştir. Ölçüm sonucu elde edilen sonuçların ortalaması alınarak kaydedilmiştir.



Şekil 3.4. EP3-Nulling Elipsometre cihazı

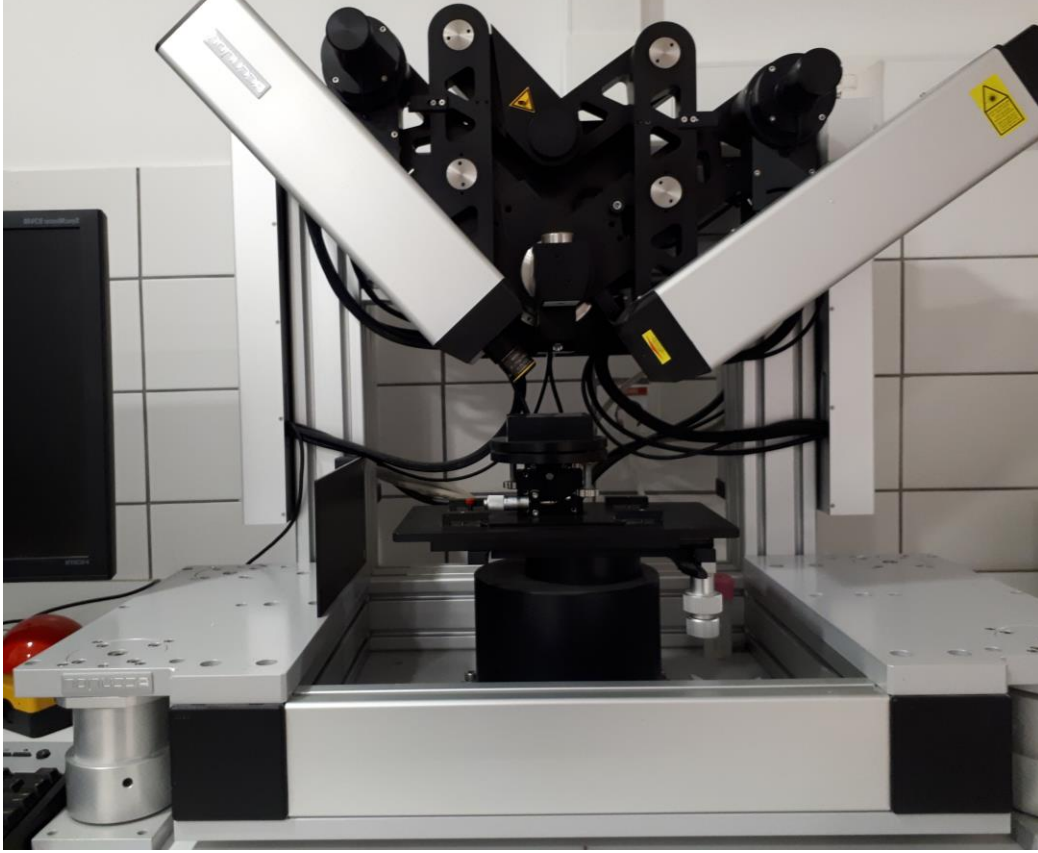
### 3.3.3. Temas Açısı Ölçümleri

Sentezlenen SPR çip yüzeyinin karakterizasyon çalışmalarında Almanya menşeli KRÜSS DSA100 cihazı kullanılarak temas açısı ölçümleri de yapılmıştır (Şekil 3.5). Temas açısı ölçümlerinde katı yüzeyin, sıvı ortamdaki biyolojik materyalle oluşturacağı ortamın yanıtını karakterize etmektedir. Metal yüzeyin ıslatılabilirliği diğer bir deyişle hidrofilitate olarak ifade edilen bu durum, modifiye edilmiş ya da modifiye edilmemiş olan katı yüzeyin suya olan ilgisini ortaya koymak için yapılan karakterizasyon ölçümleridir.

Tez kapsamında modifiye edilmemiş SPR çip yüzeyi, kurkumin baskılanmış ve baskılanmamış olmak üzere üç ana grupta temas açısı ölçümleri yapılmıştır. Bu ölçümler kapsamında altın çip yüzeyinin farklı bölgelerine su damlatılmış ve temas açıları belirlenerek bu gruplara ait fotoğraflar çekilmiştir. Katı SPR



nanosensör yüzeyinin su damlası ile sağ taraftan alınan temas açısı değeri ve sol taraftan alınan temas açısı değeri ve her iki noktanın ortalaması hesaplanarak veriler ortaya konulmuştur.



Şekil 3.5. KRÜSS DSA100 Temas açısı ölçüm cihazı

#### **3.3.4. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Ölçümleri**

Gerek kurkumin baskılanmış gerekse baskılanmamış nanopartiküllerin yıkama işlemleri tamamlandıktan sonra Amerika menşeli QUANTA 400F Field Emission taramalı elektron mikroskop ölçümleri için örneğin hazırlanması aşamasına geçilmiştir. İlk olarak numune tablasının üzerine örneği sabitleyecek şekilde karbon bant yapıştırılmıştır. İkinci olarak örneğin SEM görüntülerinin alınması aşamasına geçilmiştir. Bunun için uygun gerilim ve büyütme ile örnekler incelenmiştir. Böylece nanopartiküllerin yüksek çözünürlüklü üç boyutlu görüntüleri ve morfolojik görüntüleri elde edilmiştir.

### **3.3.5. Atomik Kuvvet Mikroskopisi (AFM)**

Tez kapsamında sensör yüzeylerinin üç boyutlu karakterizasyonu için atomik kuvvet mikroskobu ile ölçümler alınmıştır. Bu ölçümler İngiltere menşeli Nanomagnetics firmasından temin edilen AFM cihazıyla gerçekleştirilmiştir. İlk olarak kurkumin baskılanmamış çip yüzeyi daha sonra ise kurkumin baskılanmış çip yüzeyi cihaz yüzeyine karbon bant yardımıyla sabitlenerek inceleme öncesi hazır hale getirilmiştir. Daha sonra ise yüzeylerin kantilever yardımıyla üç boyutlu tarama işlemleri başlamıştır. Çalışma modu yarı değen, hız 2 µm/s, titreşim genliği 1 VRSM ile boş titreşim genliği 2 VRSM olmak üzere 256x256 piksel çözünürlükte ölçümler alınmıştır. Herbir yüzey için yaklaşık 5x5 µm'lik bir alanda inceleme yapılmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir.

### **3.3.6. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Spektrofotometre Analizi**

Kurkumin baskılanmış ve kurkumin baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) nanopartiküllerin Fourier transform kızılötesi spektroskopisi (FTIR) spektrumları, bir FTIR spektrofotometresi (Varian FTS7000, Palo Alto, CA) kullanılarak elde edilmiştir. Bunun için nanopartiküller kurutulmuş ve ardından 2 mg örnek IF dereceli 98 mg KBr ile karıştırılmıştır. İyice karıştırılmış numune bir pelet formuna basınçla preslenmiştir ve nanopartiküllerin FTIR spektrumu kaydedilmiştir. Böylece gerek kurkumin baskılanmış gerekse baskılanmamış nanopartiküllerdeki karakteristik bandları incelenmiştir.

### **3.4. SPR Nanosensörler ile Kinetik Analizler**

Kinetik analizler kurkumin baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) olmak üzere iki koldan yürütülmüştür. Moleküler baskılanmış nanosensörlerde kalıp molekül kurkumin miktarı sabit olup, fonksiyonel monomer olan poli(Hema-MATrp) miktarı değiştirilerek hazırlanmıştır. Moleküler baskılanmamış nanosensörler ise kurkumin olmaksızın sadece fonksiyonel monomer ile oluşturulmuştur. Moleküler baskılanmış nanosensör çalışmasında kurkuminin farklı derişimleriyle SPR'da ölçümler yapılmıştır. Bu çözeltiler 0.01 mg/mL ve 150 mg/mL derişim aralığında pH 7.4 fosfat tamponuyla hazırlanmıştır. İlk olarak sisteme 2 dk boyunca pH 7.4 fosfat tamponu verilmiştir. Daha sonra farklı

derişimlerdeki kurkumin çözeltileri 25°C'de dakikada 2 mL akış hızında 10 dk boyunca ölçümler alınmıştır. Son olarak desorpsiyon aşamasında ise 0.5 M NaCl 2 dk süreyle nanosensörden geçirilmiştir. Yapılan ölçümler sonucunda çıkarılan sensogramlar ile (%)ΔR ile sembolize edilen kırılma yüzdesi değerleri belirlenmiştir.

### **3.5. Seçicilik Çalışmaları**

Tez kapsamında yapılan kurkumin baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) nanosensörler ile kurkumin baskılanmış nanosensörlerin seçicilik özellikleri ortaya konmuştur. Bunun için 50 mg/L derişimindeki boyar maddelerden sunset yellow ve tartrazin molekülleri ile SPR ölçümleri yapılmıştır. Hazırlanan çözeltiler seçicilik çalışmasında kullanılan moleküller ile pH 7.4 fosfat tamponu ve kurkumin ile hazırlanarak ölçümler alınmıştır.

### **3.6. Gerçek Örnek Denemesi**

Kurkumin baskılanmış nanosensörler ile gerçek örnek denemesi marketten alınmış olan kurkumin içerikli bitkisel çay ve toz halinde baharat olarak satılan kurkuminin ekstraksiyonu ile yapılmıştır. Ekstraksiyon için öncelikle 60 µL sikloheksilamin ve 0.6 gr NaCl 10 mL santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Daha sonra çay ve baharat örneklerinden 0.2 gr. tartılıp santrifüj tüpündeki karışıma eklenmiştir. Diğer bir taraftan 1.35 mL %85'lik H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ve 23.98 gr NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O son hacim 1 L olacak şekilde pH 3.0 tamponu hazırlanmıştır. Santrifüj tüpündeki elde edilen karışımın pH 3.0 tamponuyla 10 mL'ye tamamlanmıştır ve 5 dk boyunca vortekslenmiştir. Son olarak 5000 rpm'de 25 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı alınmış ve SPR analizlerinde kullanılmıştır [97]. Ayrıca gerçek örnek denemesinde referans metot olarak sıvı kromatografi-kütle spektrometresi (LC-MS) cihazı kullanılmıştır. Bunun için Amerika menşelli Thermo Scientific Quantum Access Triple Quadrupole cihazı çalışılmıştır. Bu yöntemde ile spike numunelerde kurkumin konsantrasyonu tayini yapılmıştır. LC-MS ayrımı, C18 ters faz kolonu (2.1x50 mm, 1.7 µm) Agilent Technologies, Santa Clara, CA ile sağlanmıştır. Çalışmalarda mobil faz A olarak suda çözünmüş %0.1 formik asit ve organik mobil faz B olarak iae asetronitril (ACN) kullanılmıştır. Tüm analizler 100 µL/dk akış hızında gerçekleştirilmiştir [97]. LC-MS analizlerinde her bir numuneden cihaza 20 µL hacminde örnek verilmiş olup, analiz süresi ise 18

dakikada tamamlanmıştır. Buna göre elde edilen sonuçlar ile SPR sonuçları karşılaştırılmıştır.

### **3.7. Tekrar Kullanılabilirlik**

Hazırlanan SPR nanosensörlerin tekrar kullanılabilirliğini ve stabilitesini incelemek amacıyla 50 mg/L derişimindeki kurkumin ile tekrarlı ölçümler yapılmıştır. Tekrar kullanılabilirlik için stok kurkumin çözeltisi SPR sistemine aynı gün içerisinde art arda 5 kez verilerek ölçümler alınmıştır. Ayrıca uzun vadede stabilitesini incelemek amacıyla kurkumin baskılanmış SPR nanosensörlerin aylar içerisinde tekrar kullanılabilirlik testleri yapılmıştır. Bunun için 50 mg/L derişimindeki kurkumin ile ilk ay ve 9 ay sonrasında farklı zaman dilimlerinde ölçümler yapılmıştır. Ölçümler sonrasında elde edilen sensogramlar ile kurkumin baskılanmış poli(Hema-MATrp) nanosensörlerin verimliliği ortaya konulmuştur.

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

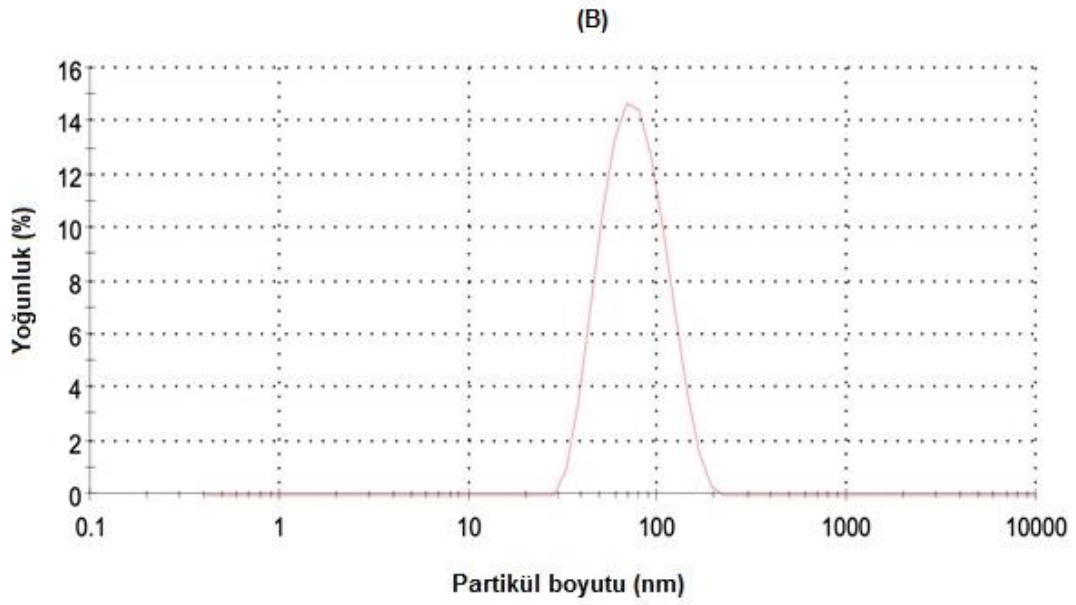
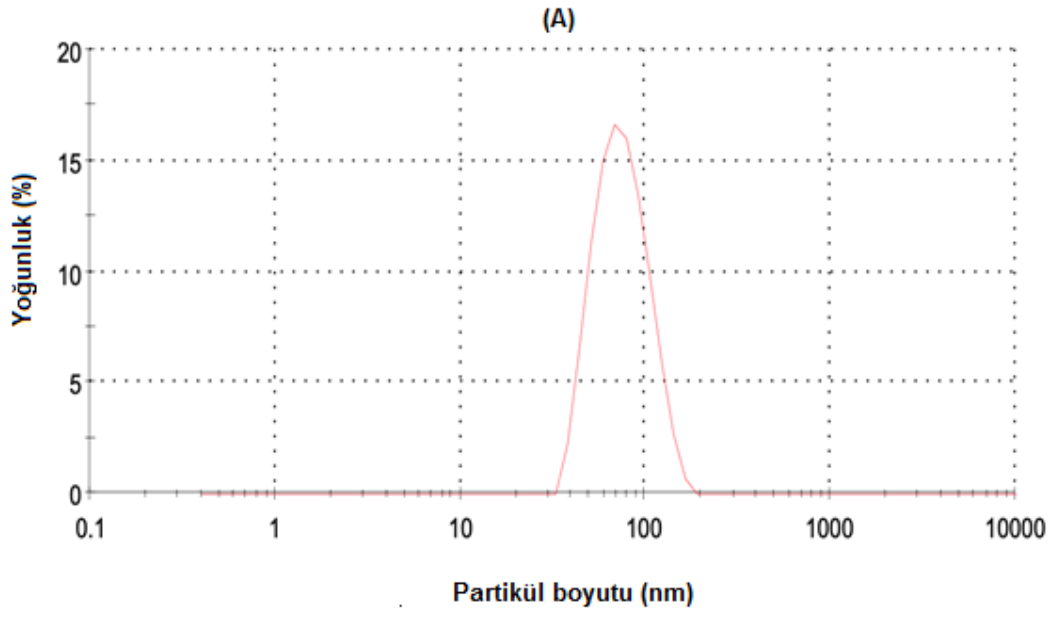
### 4.1. Kurkumin Baskılanmış ve Baskılanmamış Nanopartiküllü SPR Nanosensörler

#### 4.1.1. Baskılanmış ve Baskılanmamış Kurkumin-poli(Hema-MATrp) SPR Nanosensörlerin Karakterizasyonları

Tez kapsamında hazırlanan SPR nanosensörlerin özelliklerini incelemek için aşağıda belirtildiği gibi zeta boyut analizi, elipsometre, temas açısı ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile yapısal karakterizasyon çalışmaları yürütülmüştür.

##### 4.1.1. Zeta Boyut Ölçümleri

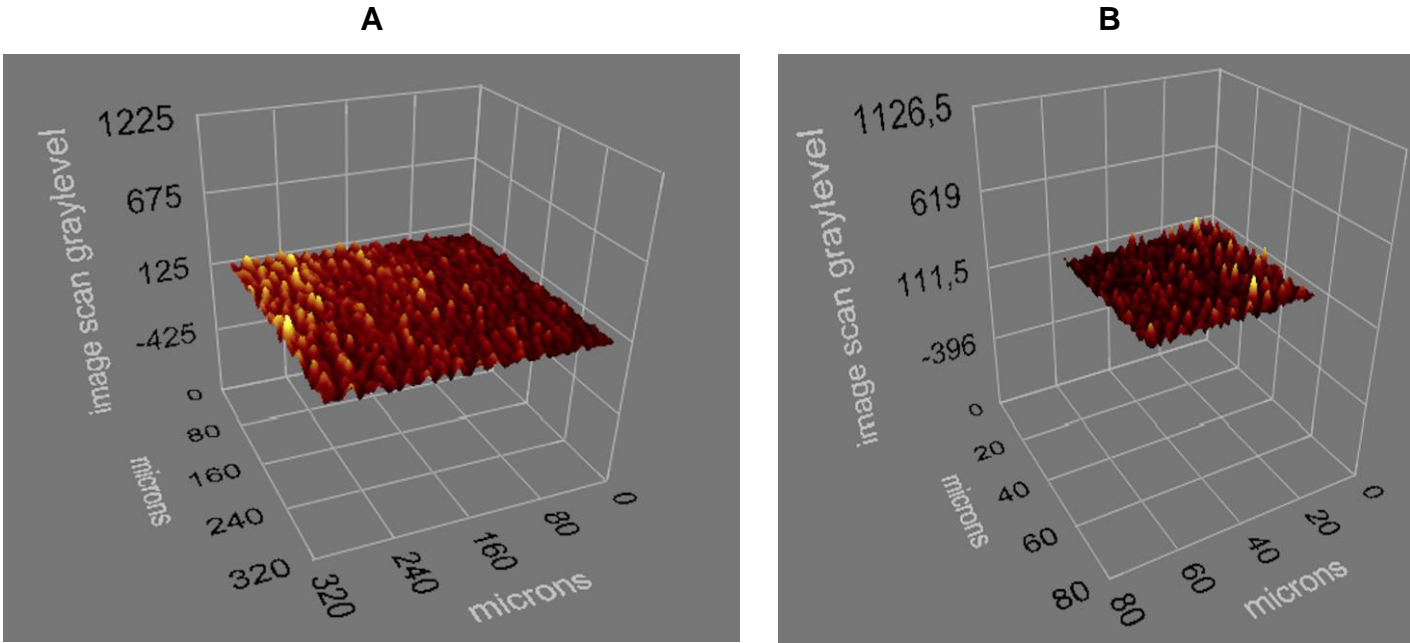
Kurkumin baskılanmış ve baskılanmamış nanopartiküllerin Zeta cihazı ile ölçülen boyut ve dağılım analizlerine dair veriler Şekil 4.1'de yer almaktadır. Kurkumin baskılanmamış nanopartiküllerin ortalama boyutu 68.73 nm, partikül dağılımı olarak ifade edilen polidispersite indeksi (PDI) 0.115 olarak saptanmıştır. Kurkumin baskılanmış nanopartiküllerin boyutu ise 70.37 nm, PDI değeri ise 0.122 olarak kaydedilmiştir. Zeta boyut analiz sonuçlarına bakıldığında gerek baskılanmış gerekse baskılanmamış nanopartiküllerin PDI değerleri birbirlerine yakın olarak bulunmuştur. Her iki grup partikülde de PDI değerlerinin yakın olması dağılımın homojen olduğunu göstermektedir. Bu durum nanopartikül sentezinin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. Ayrıca elde edilen sonuçlara göre, kurkumin baskılanmış ve baskılanmamış nanopartiküllerin boyutlarının birbirine yakın ve moleküler baskılanmış nanopartiküllerin boyutlarının ise daha büyük olduğu ortaya konulmuştur. Bu durum ise moleküler baskılamanın başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini işaret etmektedir.



Şekil 4.1. (A) Kurkumin baskılanmış (B) Kurkumin baskılanmamış nanopartiküllerin zeta boyut analizleri

#### 4.1.1.2. Elipsometre Ölçümleri

Tez kapsamında hazırlanan kurkuminin baskılanmış ve baskılanmamış altın çip yüzeyinin kalınlıkları elipsometre cihazıyla ölçülmüştür. Bu kapsamda ölçümler, dalga boyunun 532 nm ve ışığın geliş açısının 62° olduğu koşullarda gerçekleştirilmiştir. Elde edilen görüntülerden kurkumin baskılanmış SPR nanosensörün ortalama kalınlığı 78.5 nm ve kurkumin baskılanmamış nanosensörün ise ortalama kalınlık değeri 73.4 olarak bulunmuştur. Şekil 4.2'de yer alan elipsometri görüntülerine de bakıldığında kurkumin baskılanmış SPR nanosensörünün kalınlığının baskılanmamış nanosensör kalınlığından fazla olduğu görülmektedir. Bu sonuç moleküler baskılamanın başarılı bir şekilde gerçekleştiğine işaret etmektedir.



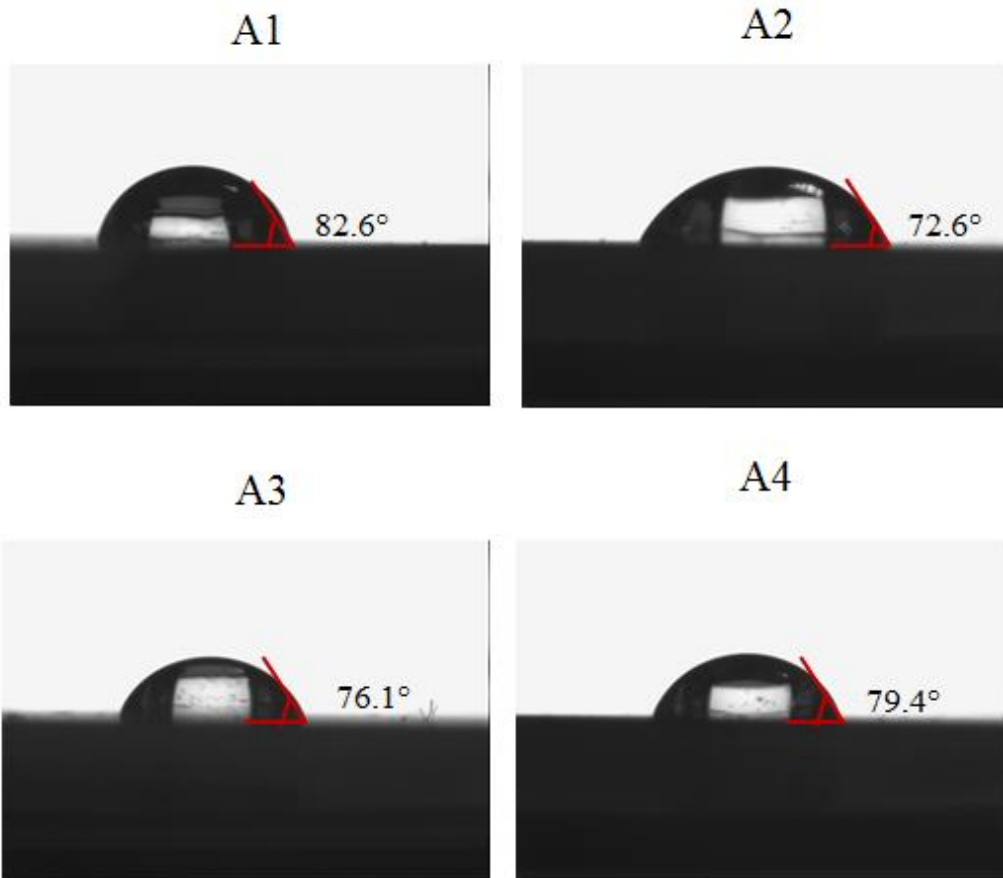
Şekil 4.2. SPR nanosensörlerin elipsometri görüntüleri (A) Kurkumin baskılanmış ve (B) Kurkumin baskılanmamış

#### 4.1.1.3. Temas Açısı Ölçümleri

Modifiye edilmemiş altın SPR çip yüzeyi, kurkumin baskılanmış ve kurkumin baskılanmamış SPR çip yüzeyi olmak üzere yapılan temas açısı ölçüm sonuçları Şekil 4.3'te verilmiştir. Ölçümler nanosensör yüzeyinde farklı noktalara damlatılan

su damlasının sağ ve sol taraftaki temas noktasından alınan ve her iki noktaya dair elde edilen değerlerin ortalaması hesaplanarak yapılan temas açısı ölçüm sonuçları ortaya konulmuştur. Böylece gerek modifikasyon sonrası gerekse moleküler baskılamanın yüzeyde meydana getirdiği hidrofilitedeki farklılık belirlenmiştir.

Tez kapsamında ilk olarak modifikasyona uğramamış çip yüzeyinin temas açısı ölçüm sonuçlarına bakılmıştır ve yapılan ölçümler sonucunda temas açısı değeri  $82.6^\circ \pm 3.6$  bulunmuştur. İkinci olarak çip yüzeyinin allil merkaptan ile modifikasyonu sonrası ölçümler alınmıştır. Bunun sonucunda ise  $72.6^\circ \pm 2.7$  olarak belirgin bir azalış gözlenmiştir. Son olarak ise kurkumin baskılanmış ve baskılanmamış çip yüzeylerinde ölçümler alınmış, bu değerler sırasıyla  $79.4^\circ \pm 2.1$  ve  $76.1^\circ \pm 3.5$  temas açısı değerleri bulunmuştur. Bu sonuçlara göre kurkumin baskılanmış SPR çip yüzeyindeki MATrp monomerinin hidrofobik fonksiyonel grupları nedeniyle yüzeyin hidrofobik karakterindeki artış kaydedilmiştir.

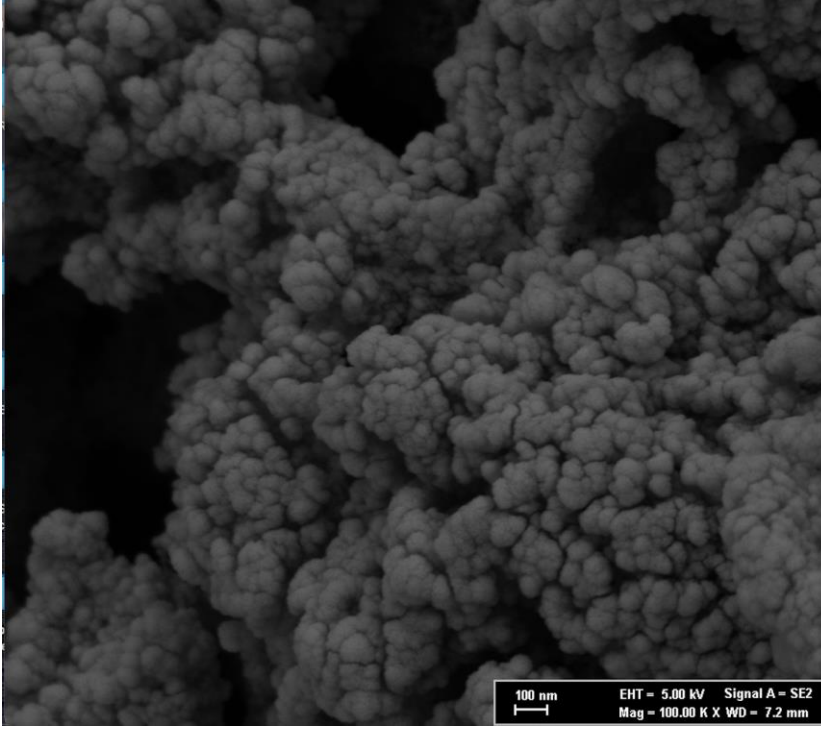


Şekil 4.3. (A1) Modifiye edilmemiş SPR çip yüzey, (A2) Allil merkaptan modifikasyonu sonrası SPR çip yüzeyi, (A3) Kurkumin baskılanmamış SPR çip yüzeyi ve (A4) Kurkumin baskılanmış SPR çip yüzeyleri temas açısı fotoğrafları



#### 4.1.1.4 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Ölçümleri

Nanopartiküllerin SEM ile yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucunda kurkumin baskılanmış nanopartiküllerin SEM analizinde, yaklaşık olarak 76.63 nm büyüklüğünde olduğu bulunmuştur (Şekil 4.4). Ayrıca kurkumin baskılanmış nanopartiküllerin pürüzlü bir yüzeye sahip olduğu gözlemlenmiştir.

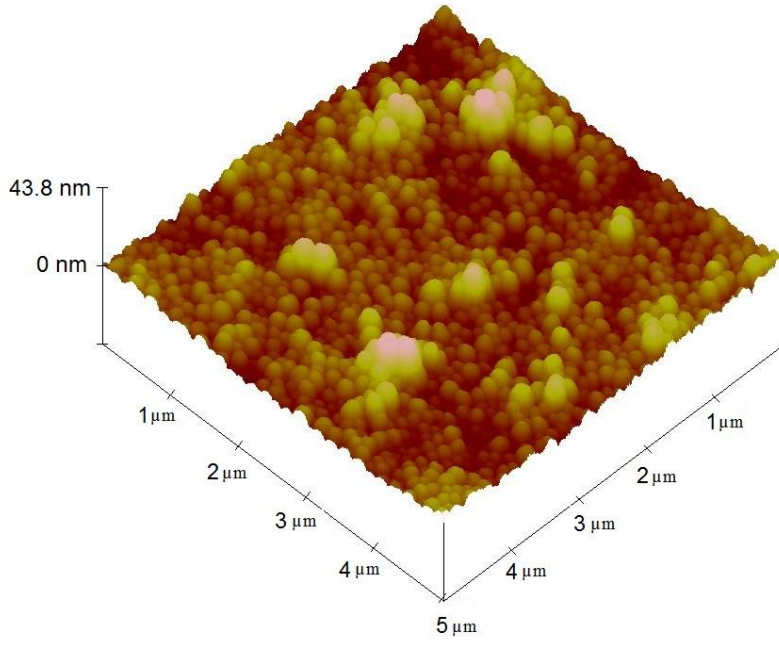


Şekil 4.4. Kurkumin baskılanmış nanopartiküllerin SEM görüntüsü

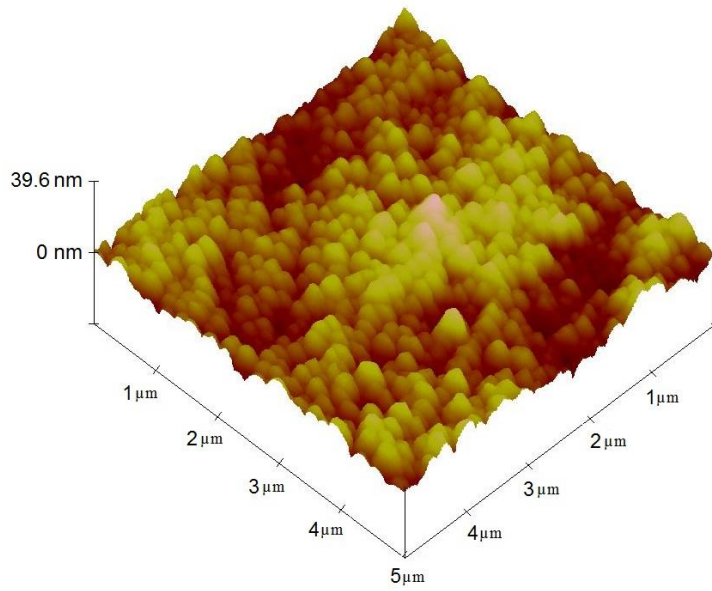
#### 4.1.1.5. Atomik Kuvvet Mikroskopisi (AFM)

SPR nanosensörlerinin yüzey karakterizasyonu için kullanılan AFM sonuçları değerlendirilmiştir. Bu sonuçlara göre kurkumin baskılanmış nanosensörlerin yüzey derinliği 43.8 nm olup, kurkumin baskılanmamış nanosensör yüzeyi ise 39.6 olarak kaydedilmiştir (Şekil 4.5). Sonuçlarda yola çıkarak kurkumin baskılanmış nanopartiküllerin SPR nanosensör yüzeyine homojen olarak yayıldığı gözlemlenmiştir.

(A1)



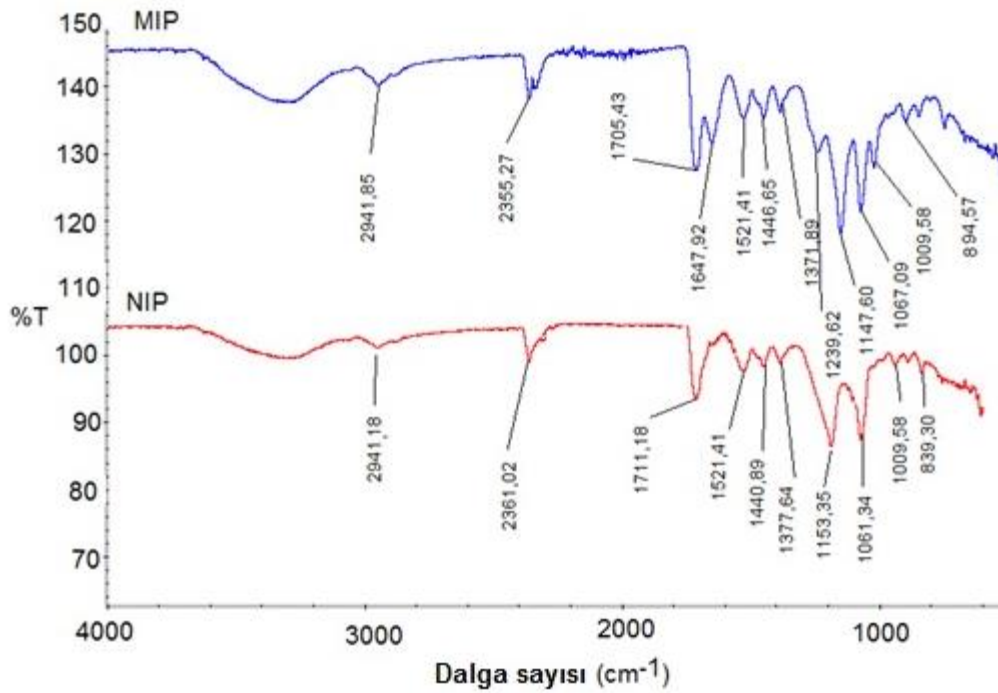
(A2)



Şekil 4.5. (A1) Kurkumin baskılanmış SPR nanosensör yüzeyi, (A2) Kurkumin baskılanmamış nanosensör yüzeyi

#### 4.1.1.6. FTIR Spektrofotometre Analizi

Kurkumin baskılanmış ve baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) nanopartiküllerin FTIR spektrumları sırasıyla Şekil 4.6 ile gösterilmektedir. Kurkumin baskılanmış nanopartiküller için  $1630\text{ cm}^{-1}$  ve  $1513\text{ cm}^{-1}$  dalga boylarındaki bant C=C ve C=O titreşim modlarına sahiptir. Ayrıca aromatik halkaların C-H titreşimlerinden dolayı  $1239\text{ cm}^{-1}$  bandında meydana gelmiştir. Her iki spektrumdan da  $2941\text{ cm}^{-1}$  (alifatik alkil için CH gerilme bantları),  $1710\text{ cm}^{-1}$  (C=O gerilme bandı),  $1446\text{ cm}^{-1}$  ve  $1371\text{ cm}^{-1}$  (amid için CN gerilme bantları) ve  $1147\text{ cm}^{-1}$  (aromatik halka bükülme bandı) bantları oldukça belirgin bir şekilde görülmektedir. MATrp yapısında bu bantlara karşılık gelen bazı fonksiyonel grupların varlığı, MATrp monomerinin nanopartiküllerin yapısına başarılı bir şekilde dahil edildiğini göstermektedir. Ayrıca tüm bu sonuçlardan yola çıkarak moleküler baskılamanın başarılı bir şekilde gerçekleştiği ortaya konulmaktadır.

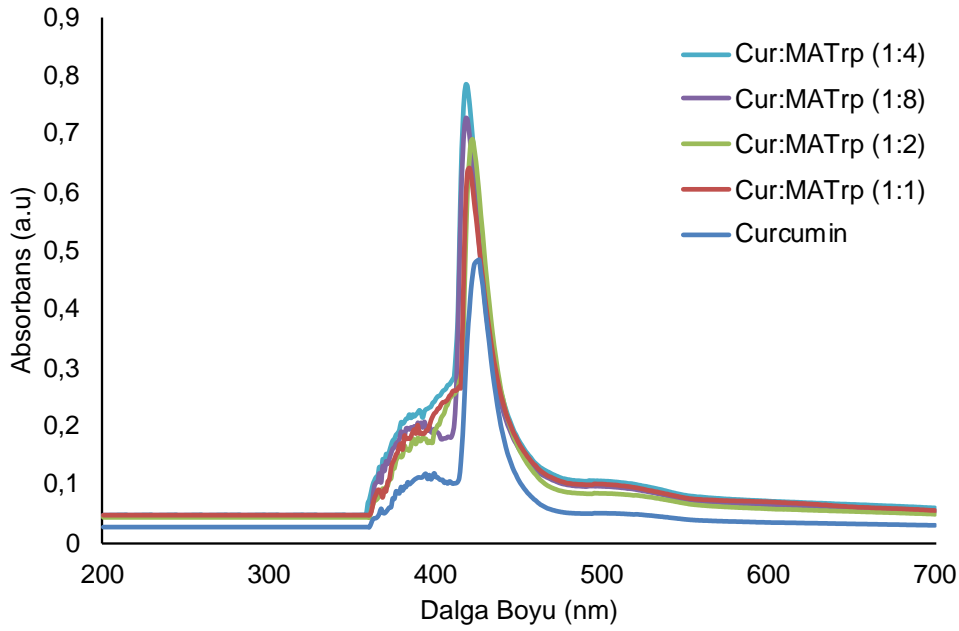


Şekil 4.6. Kurkumin baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) nanopartiküllerin FTIR spektrumları.

## 4.1.2. Kurkumin Baskılanmış poli(Hema-MATrp) SPR Nanosensörlerin Analizleri

### 4.1.2.1. Kurkumin-MATrp Oranının Belirlenmesi

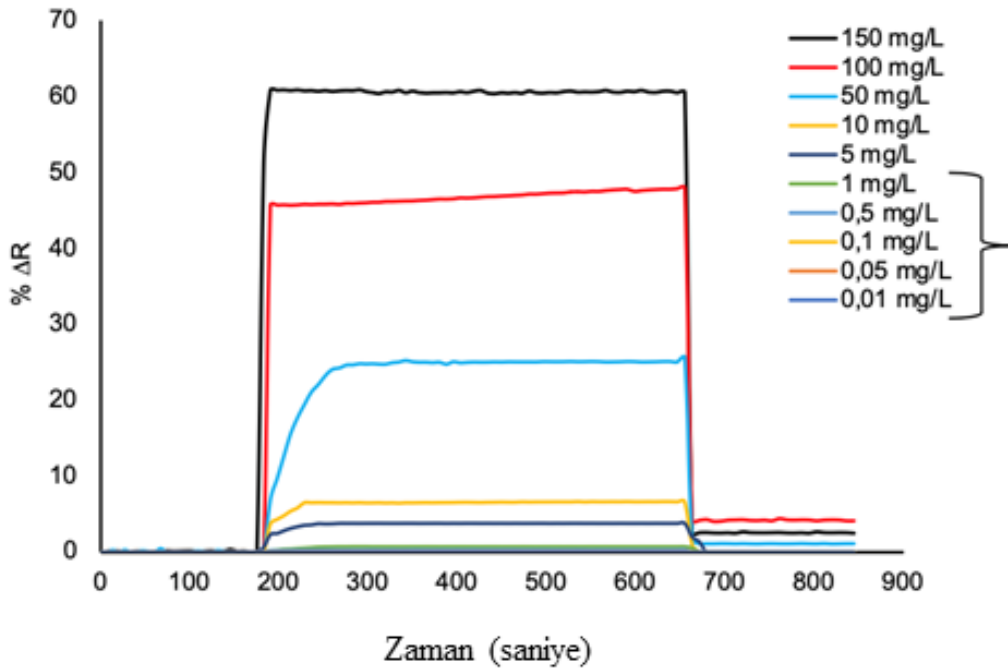
Kalıp molekül kurkumin sabit tutularak değişen mol oranlarında MATrp monomeri ile nanopartikül sentezi için ön karışım oluşturulmuştur. Bu karışım 1, 2, 4 ve 8  $\mu\text{mol}$  değişen oranlarda MATrp ve 1  $\mu\text{mol}$  kurkumin ile hazırlanmıştır. Elde edilen karışımlardan 20  $\mu\text{L}$  alınıp toplam hacim metanolle 600  $\mu\text{L}$  tamamlanmıştır. Daha sonra UV spektrofotometrede 420 nm dalga boyunda ölçümler yapılmıştır. Elde edilen absorbans değerleri ait şekil 4.4'de gösterilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi en yüksek absorbans değerine MATrp'nin 4  $\mu\text{mol}$  olduğu çözeltilerden elde edilmiştir. Nanopartikül sentezi başta olmak üzere diğer tüm analizlerde bu oran kurkumin stok çözeltisi olarak hazırlanmıştır.



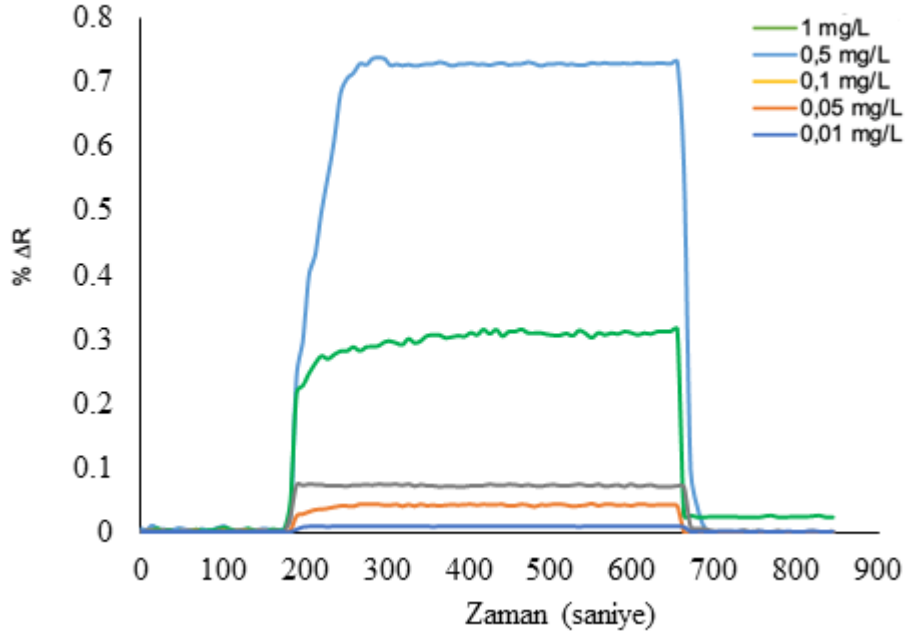
Şekil 4.7. Kurkumin-MATrp UV taraması

#### 4.1.2.2. SPR Nanosensörler ile Kinetik Analizler

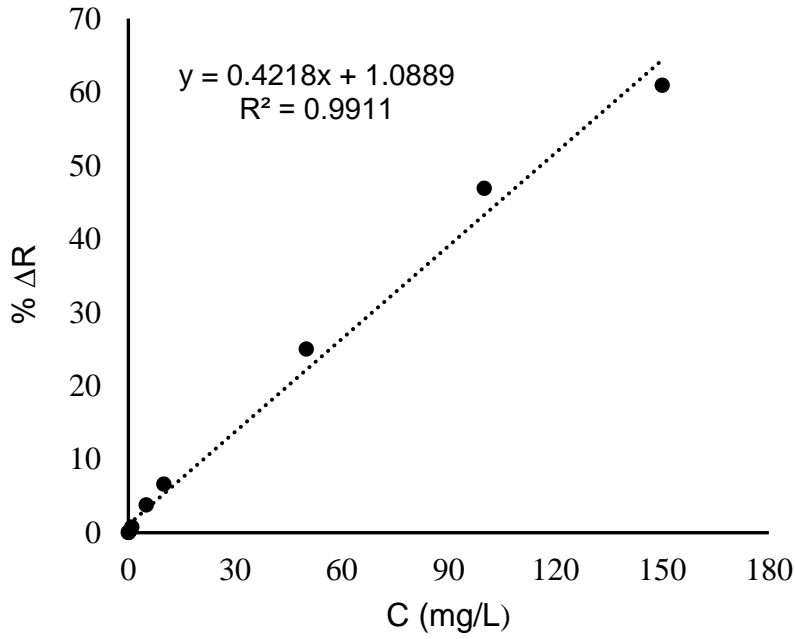
Tez kapsamında kurkumin baskılanmış poli(Hema-MATrp) nanopartiküller ile oluşturulan SPR nanosensörler ile kinetik analizler gerçekleştirilmiştir. İlk olarak sistemden 3 dk boyunca pH 7.4 fosfat tamponu geçirilmiştir. Sistem dengeye geldikten sonra kurkuminin 0.01 mg/L ile 150 mg/L aralığında farklı derişimleri 8 dk boyunca sisteme verilmiştir. Bu derişimler pH 7.4 fosfat tamponuyla hazırlanmıştır. Desorpsiyon işlemi ise 3 dk boyunca 0.5 M NaCl ile gerçekleştirilmiştir. Böylece kurkumin baskılanmış SPR nanosensörler ile 2 mL/dk akış hızında toplam analiz süresi yaklaşık 14 dk sürmüştür. Analiz sonrasında elde edilen sinyallerden yola çıkarak SPRview yazılım programı desteğiyle kinetik veriler incelenmiştir. Zamana karşı kırılma yüzdesi hesaplanarak farklı derişimlerdeki kurkumin çözeltisine ait sensogramlar elde edilmiştir. Şekil 4.8 ve 4.9'da yer alan sensogramdan yola çıkarak kurkumin derişiminin (C) artmasıyla kırılma yüzdesinin arttığı gözlenmiştir.



Şekil 4.8. Kurkumin çözeltisi ile kurkumin baskılanmış SPR nanosensör arasındaki etkileşimlere dair sensogram grafiği (0.01-150 mg/L derişim aralığında).



Şekil 4.9. Kurkumin çözeltisi ile kurkumin baskılanmış SPR nanosensör arasındaki kinetik analizlere ait sensorgramlar (0.01-1.0 mg/L derişim aralığı)



Şekil 4.10. Kurkumin derişimi ile kurkumin baskılanmış SPR nanosensördeki kırılma yüzdesi arasındaki kalibrasyon grafiğı

Şekil 4.10'da görüldüğü üzere kurkuminin farklı derişimlerdeki kırılma yüzdesine karşı olan grafik yer almaktadır. Grafikten elde edilen veriler doğrultusunda lineer bölge x ekseninde 0.01 mg/L, 0.05 mg/L, 0.1 mg/L, 0.5 mg/L, 1 mg/L olmak üzere toplam 5 kurkumin derişimi yer almaktadır. Bu kalibrasyon grafiğine göre determinasyon katsayısı olarak ifade edilen  $R^2$  0.99 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca lineer bölgeye ait kalibrasyon denklemi  $y=0.4218x+1.0889$  olarak bulunmuştur.

#### 4.1.2.3. Kurkumin Baskılanmış SPR Nanosensörler ile Denge Analizleri

Kurkumin baskılanmış poli(Hema-MATrp) nanopartiküller ile oluşturulan SPR nanosensörlerin kinetik analizlerden sonra denge analizleri ve bağlanma kinetik analizleri incelenmiştir. İlk olarak denge analizlerine bakıldığında Scatchard izoterminden yola çıkılmıştır. Scatchard izotermine göre ligand reseptör bağlanma ilişkisine dayanarak nanosensör yüzeyine bağlanan ve bağlanmayan ligand arasındaki derişim ortaya konulmaktadır. Buradan yola çıkarak ortaya konan grafiklerde kırınım değişimi ( $\Delta R$ ) baz alınarak hesaplamalar yapılmıştır. Genel olarak ortaya konan Scatchard izoterm eşitliğinde;

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

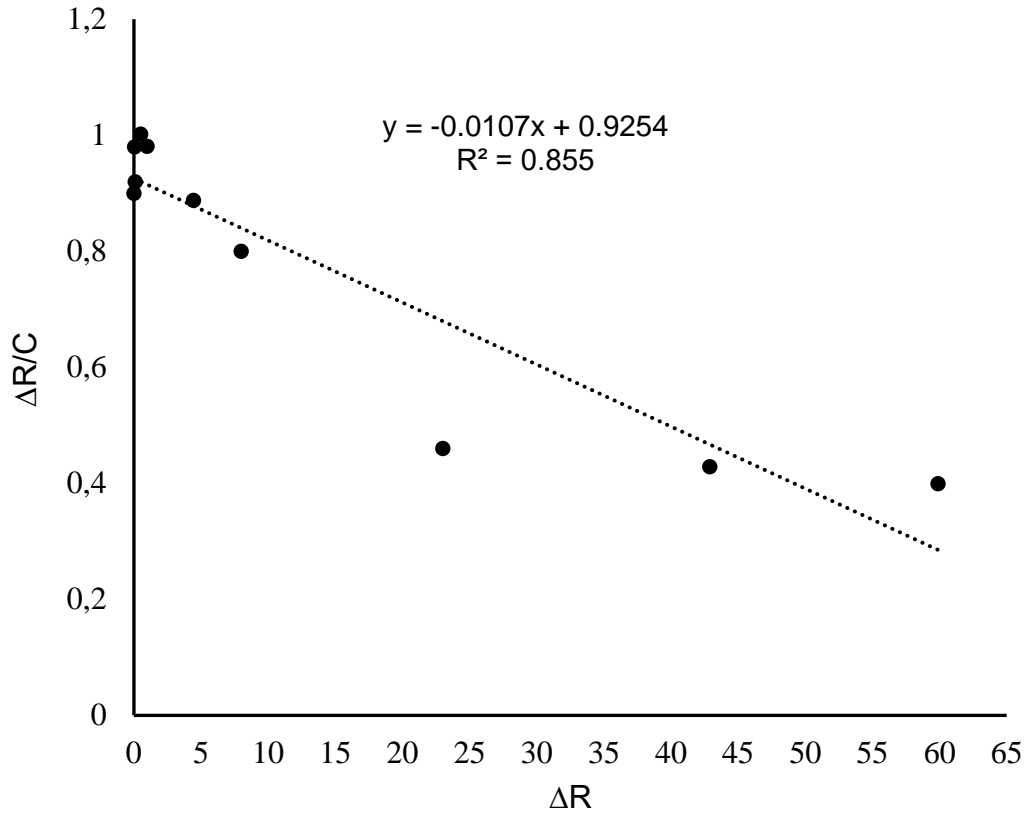
Bu denklemde  $\Delta R$  daha öncede belirtildiği gibi kırınım değişimini,  $d\Delta R/dt$  sinyaldeki değişim hızını,  $k_a$  bağlanma hız sabiti,  $k_d$  ise ayrılma hız sabitini ve  $C$  ise derişimi ifade etmektedir. Tersinir bir bağlanma tepkimesini ifade eden Scatchard izotermine göre sensör yüzeyi denge haliydeyken  $\Delta R$  sıfıra eşit olmaktadır. O zaman tekrar eşitliğe bakılacak olunursa;

$$\Delta R_{denge}/C = K_A \Delta R_{maks} - K_A \Delta R_{denge} \quad (2)$$

eşitliği elde edilmektedir.

Denge halindeki halindeki tepkime söz konusu olduğunda kırılma farkındaki değişim  $\Delta R_{denge}$  olarak ifade edilmektedir. Burada bağlanma sabiti olan  $K_A$  ise  $k_a/k_d$ 'nin arasındaki orana ayrıca ayrılma sabiti olan  $K_D$  ise  $1/K_A$ 'ya eşit olmaktadır. Scatchard denkleminde yer alan  $C$  olarak ifade edilen derişim çıkartıldığında elde edilen veriyi grafiğe döktüğümüzde x eksenini adsorpsiyon bölgelerini y eksenini ise desorpsiyon bölgelerini göstermektedir.

Scatchard denge analiz grafiğine bakıldığında  $K_A$  ve  $K_D$  değerleri arasındaki fark analit ile ligand arasındaki bağlanma noktalarının sayısını ortaya koymaktadır. Şekil 4.11'deki Scatchard denge analiz grafiği ve çizelge 4.1'de yer alan tabloda yukarıda belirtilen denklemlere göre denge analiziyle ilgili hesaplanmış veriler yer almaktadır. Buradan yola çıkarak hazırlanan kurkumin baskılanmış SPR nanosensörde  $K_D$  ve  $K_A$  değerleri hesaplanmıştır.



Şekil 4.11. Scatchard denge analiz grafiği.

#### 4.1.2.4. Kurkumin Baskılanmış SPR Nanosensörler ile Bağlanma Kinetik Analizleri

Kurkumin baskılanmış poli(Hema-MATrp) nanopartiküller ile oluşturulan SPR nanosensörler ile yapılmış olan bağlanma kinetik analizleri incelenmiştir. Denge analizi eşitlik 2'de yer alan  $d\Delta R/dt = k_a C(\Delta R_{max} - \Delta R) - k_d \Delta R$  denklemi tekrar düzendiğinde;



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

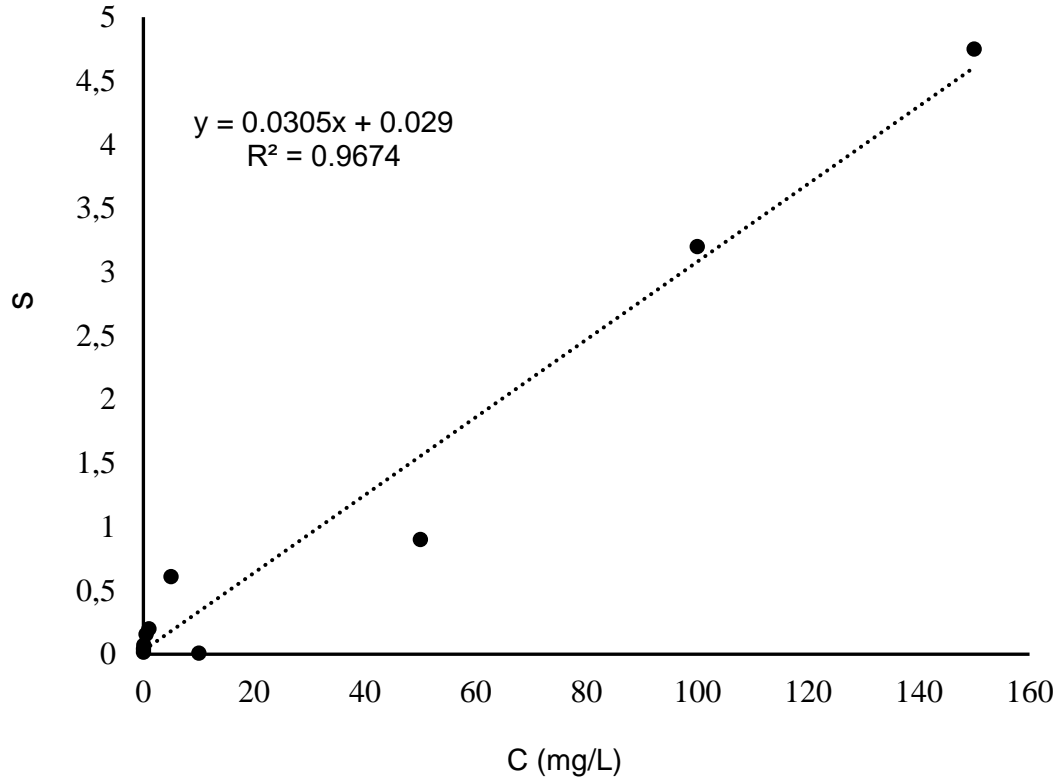
eşitliği elde edilmektedir. Yukarıda 3. eşitlikte yer alan  $d\Delta R/dt$  karşı  $\Delta R$  grafiği çizildiğinde eğim  $-(k_a C + k_d)$  olmaktadır. Genel olarak bağlanma hızı olarak ifade edilen  $k_a$ , derişim olarak ifade edilen  $C$  ile doğrusal bir orantıya sahiptir. Buradan yola çıkarak  $C$  değeri hesaplanabilmektedir. Öncelikle  $R_{maks}$  değerinin pratik olarak belirlenebilmesi için sensör çip yüzeyinin maksimum analit derişimiyle doyunluğa ulaşması gerekmektedir. Daha sonra  $R_{maks}$  değeri belirlenerek tek bir sensogram ile  $k_a$  ve  $k_d$  değerleri hesaplanabilmektedir. Farklı derişimlerin olduğu SPR çalışmalarında  $k_a$  sensogramlarının alınması doğru bir yaklaşımdır. Tersinir bir bağlanma tepkimesinde  $S$  sembolü ifade edilen eğim değeri eşitlik 3'te yer alan denklem baz alınarak çizilen grafiğe göre düzenlenirse eşitlik 4 oluşmaktadır.

$$S = k_a C + k_d \quad (4)$$

Eşitlik 4'e göre çizilen grafiğe göre  $k_a$  değeri eğim olmaktadır. Bağlanma hız sabiti olan  $k_a C$  değeri desorpsiyon sabiti olan  $k_d$  değerinden büyük olduğu durumlarda Eşitlik 4'te de yer alan  $k_d$  değerinin hesaplanması çok doğru olmamaktadır.

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

$\Delta R_0$  ve  $\Delta R_t$  değerlerinin  $t=0$  ve  $t$  zamanlarındaki SPR sinyallerinden alınan sonuçlarının logaritması alınarak eşitlik 5 ortaya çıkmaktadır. Buradan  $k_d$  değerinin hesaplanması daha kesin bir sonuç vermektedir. Şekil 4.12'de kurkumin baskılanmış SPR nanosensörlerin bağlanma kinetiğine dair grafik yer almaktadır. Ayrıca çizelge 4.1'de ise yukarıda yer alan denklemler baz alınarak hesaplanmış bağlanma kinetik analizine dair veriler bulunmaktadır.



Şekil 4.12. Bağlanma kinetiği grafiği

Çizelge 4.1. Kinetik hız sabitleri

Denge Analizi (Scatchard)	Bağlanma Kinetik Analizi
$\Delta R_{\text{maks}}$ : 84	$k_a$ , (mg/L.s): 0.031
$K_A$ , (mg/L): 0.0107	$k_d$ , (1/s): 0.029
$K_D$ , (L/mg): 93.46	$K_A$ , (mg/L): 1.069
$R^2$ : 0.855	$K_D$ , (L/mg): 0.935
	$R^2$ : 0.9674

#### 4.1.2.5. Kurkumin Baskılanmış SPR Nanosensörler ile Denge İzoterm Analizleri

Kurkumin baskılanmış poli(Hema-MATrp) nanopartiküller ile oluşturulan SPR nanosensörlerin izoterm modelleriyle de analizler yapılmıştır. Dört farklı izoterm modeli uygulanmıştır. Denge analizlerinde kullanılan Scatchard izotermi dışında Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich izoterm modellerinden de yararlanılmıştır.

İlk olarak Freundlich izoterm modelinde heterojen yüzeylerdeki adsorbsiyon için kullanılmaktadır. Aşağıda belirtilen formülle ifade edilmektedir.

$$\Delta R = \Delta R_{\text{maks}} [C]^{1/n} \quad (6)$$

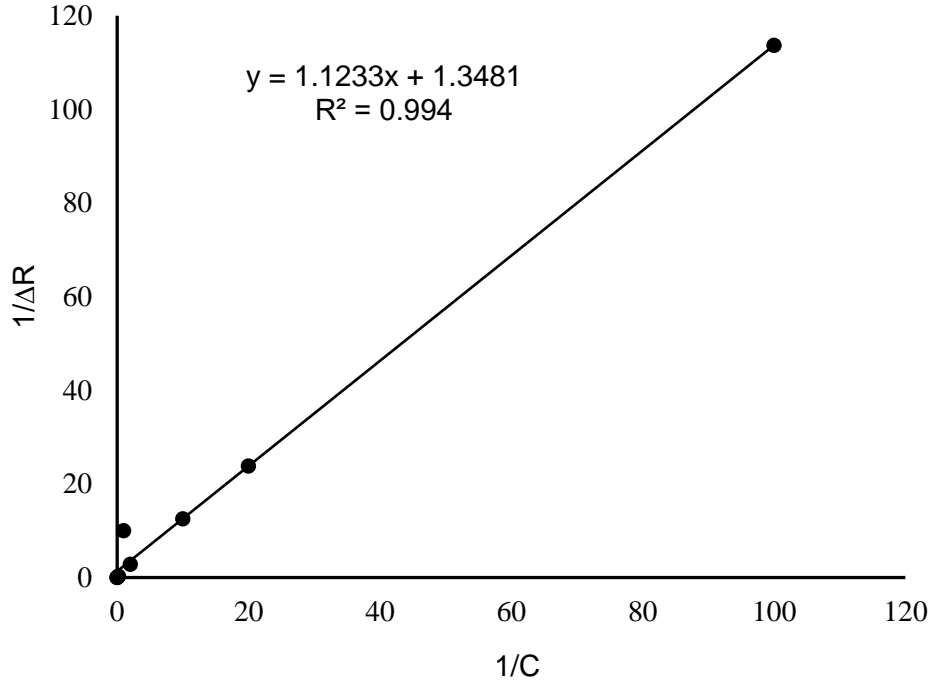
İkinci olarak bahsedilen Langmuir izotermi, Freundlich izoterminin tersine homojen yüzeylerdeki adsorbsiyon için kullanılmaktadır. Langmuir izoterminde çip yüzeyinde analit adsorpsiyonun eşit bir şekilde yayıldığı ve enerjinin de eşit olup, analitteki moleküler arası etkileşiminin sıfır olduğu ortaya konulmuştur. Aşağıdaki formülle ifade edilmektedir.

$$\Delta R = \{\Delta R_{\text{maks}} [C] / (K_D + [C])\} \quad (7)$$

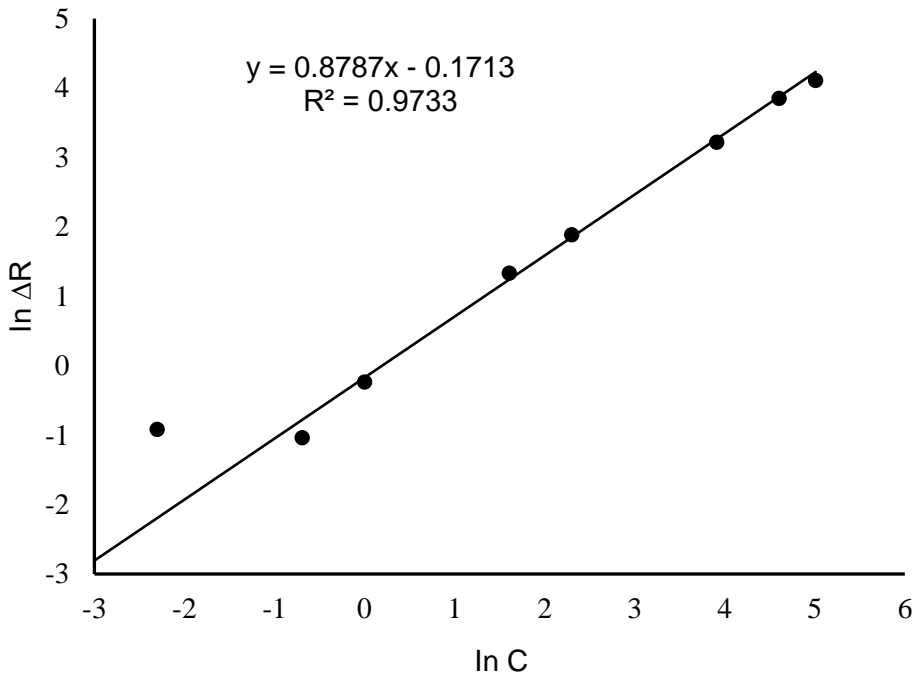
Son olarak hem Langmuir hem de Freundlich izoterm modeli yer almaktadır. Bu model ise aşağıda belirtilen formülle ifade edilmektedir.

$$\Delta R = \{\Delta R_{\text{maks}} [C]^{1/n} / K_D + [C]^{1/n}\} \quad (8)$$

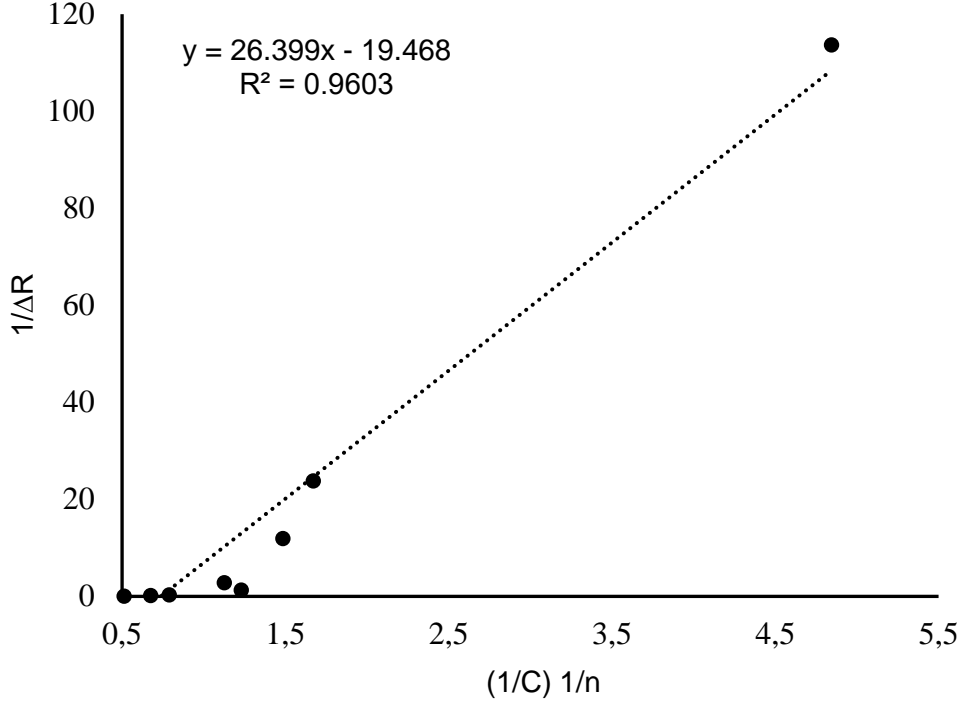
Kurkumin baskılanmış poli(Hema-MATrp) nanopartiküller ile oluşturulan SPR nanosensörlerin her üç izoterm modeli baz alınarak ortaya konan veriler çizelge 4.2'de yer almaktadır. Ayrıca Şekil 4.13'de Langmuir, Şekil 4.14'de Freundlich ve Şekil 4.15'de Langmuir-Freundlich izoterm grafikleri yer almaktadır.



Şekil 4.13. Kurkumin baskılanmış SPR nanosenörlerde Langmuir izotermi



Şekil 4.14. Kurkumin baskılanmış SPR nanosenörlerde Freundlich izotermi



Şekil 4.15. Kurkumin baskılanmış SPR nanosenörlerde Langmuir-Freundlich izotermi

Çizelge 4.2. Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich parametreleri

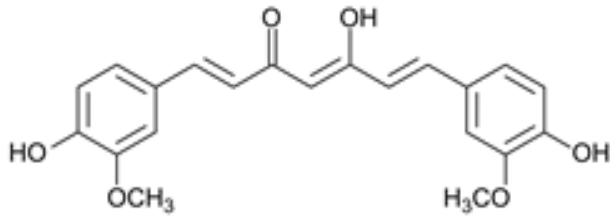
Langmuir	$\Delta R_{maks}$ , (mg/L): 0.742 $K_D$ , (L/mg): 0.833 $K_A$ , (mg/L): 1.200 $R^2$ : 0.994
Freundlich	$\Delta R_{maks}$ , (mg/L): 1.187 $1/n$ : 0.8787 $R^2$ : 0.9733
Langmuir-Freundlich	$\Delta R_{maks}$ , (mg/L): 0.0514 $1/n$ : 0.8787 $K_D$ , (L/mg): 1.356 $K_A$ , (mg/L): 0.737 $R^2$ : 0.9603

Çizelge 4.2.'de yer alan veriler doğrultusunda her üç izoterm modeli içerisinde en uyan model  $\Delta R_{maks}$  değerinin 0.742 mg/L ile ve  $R^2$  değerinin 0.994 ile en yüksek olduğu Langmuir izoterm modelidir. Ayrıca  $K_D$  ayrılma sabitinin 0.833 L/mg olması sebebiyle, 1.200 mg/mL olan bağlanma sabiti  $K_A$ 'den küçüktür. Buna göre sonuçlar kurkuminin nanosensör yüzeyine bağlanmasının homojen ve tek tabakalı güçlü bir bağlantı olduğuna işaret etmektedir.

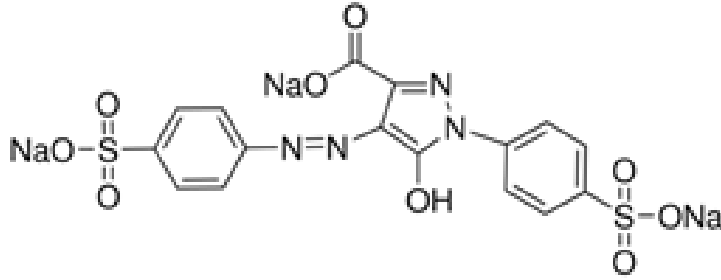
#### 4.1.2.6. Kurkumin Baskılanmış SPR Nanosensörler ile Seçicilik Analizleri

Hazırlanan kurkumin baskılanmış SPR nanosensörlerin seçicilik analizleri  $C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$  molekül formülüne sahip 50 mg/L derişiminde tartrazin (MA: 534.36 g/mol) ve  $C_{16}H_{10}N_2Na_2O_7S_2$  molekül formülüne sahip 50 mg/L derişimin sunset yellow (MA: 452.38 g/mol) molekülleri ile yapılmıştır (Şekil 4.16).

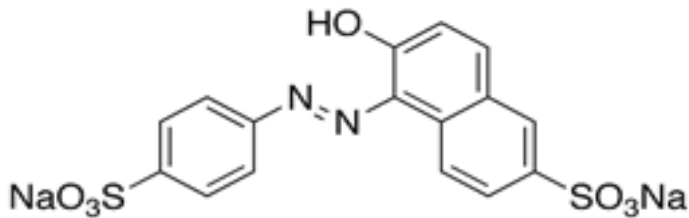
(A)



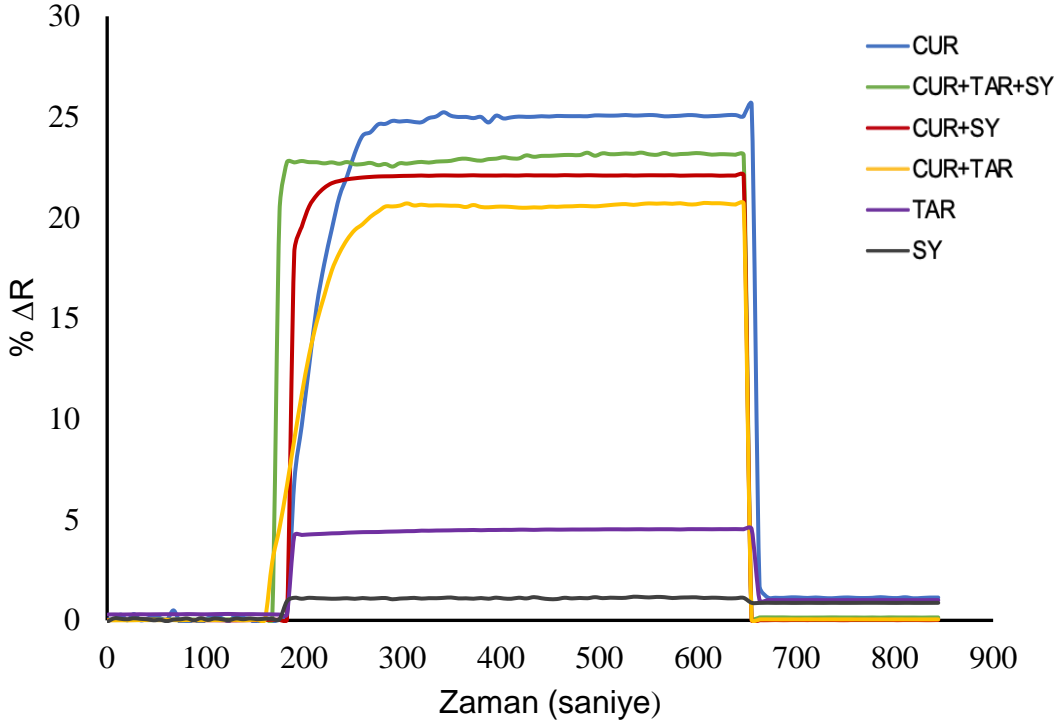
(B)



(C)



Şekil 4.16. (A) Kurkumin, (B) Sunset Yellow ve (C) Tartrazin moleküler yapısı



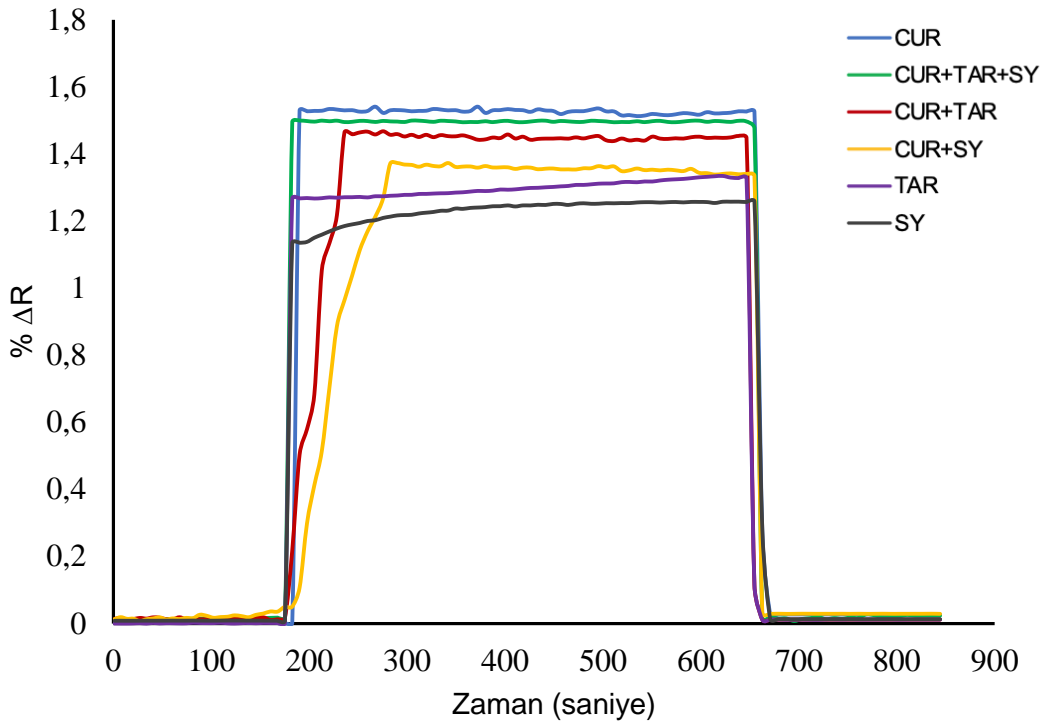
Şekil 4.17. Kurkumin (CUR), Sunset Yellow (SY) ve Tartrazin (TAR) çözeltileri ile kurkumin baskılanmış SPR nanosensörüne (MIP) ait sensogram

Şekil 4.17'e bakıldığında kurkumin baskılanmış nanosensörde kurkumin dışında kullanılan moleküllerde spesifik bir bağlanmanın olmadığı kaydedilmiştir. Buradan çıkarılan sonuca göre elde edilen nanosensörün yalnızca kurkumine spesifitesi olduğu kanıtlanmıştır. Seçicilik çalışması kapsamında gerek kurkuminli gerekse yarışmacı moleküllerin birbiriyle karışımları hazırlanıp ölçümler alınmıştır. Bu tür karışımlardan elde edilen (%) $\Delta R$  değerinin daha düşük olduğu saptanmıştır. Karışım halindeki durumlarda moleküllerin yarışmacı davranış sergilediği ve kayma değerinde düşüşe yol açtığı ortaya konulmuştur.

Ayrıca tez kapsamında seçicilik çalışmalarında spesifite farkındalığını ortaya koymak için kurkumin baskılanmamış poli(Hema-MATrp) nanopartiküller ile oluşturulan SPR nanosensörleri hazırlanmıştır. Sunset yellow ve tartrazin çözeltileri tıpkı kurkumin baskılanmış nanosensörlerde olduğu gibi SPR sisteminde analiz edilmiştir. Şekil 4.18'e bakıldığında kurkumin dışındaki moleküllerde (%) $\Delta R$  değerinin daha az olduğu görülmektedir. Bu durum ise bu moleküllerin rekabetçi ajan olarak davranıp kalıp molekülün bağlandığı bölgelere

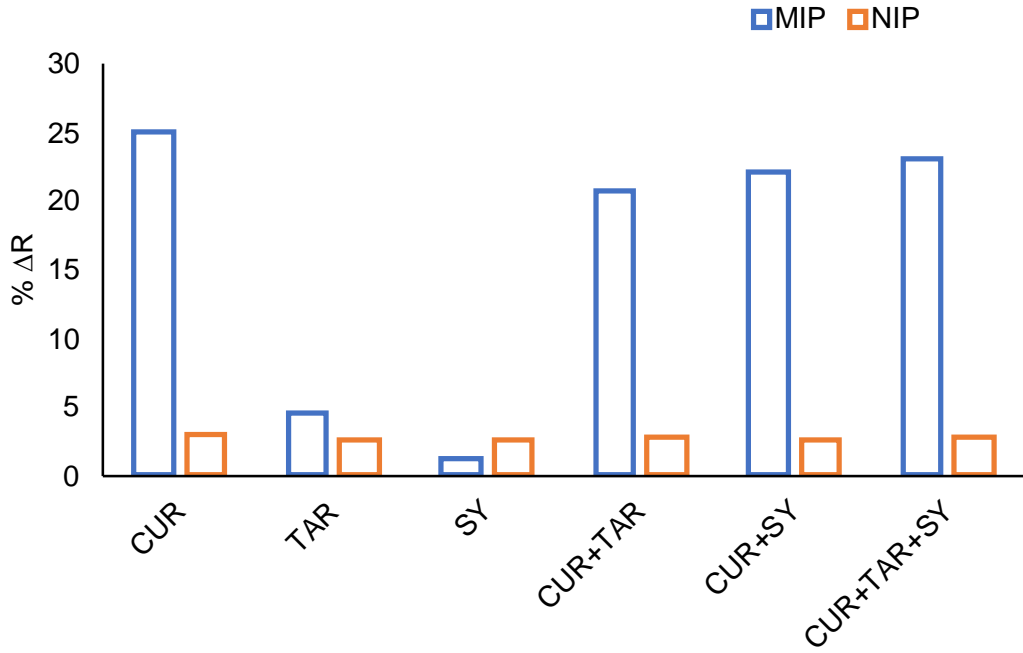
gerek MIP gerekse NIP nanosensörlerde adsorbe olmaya yönelmelerinden kaynaklanmaktadır.

Şekil 4.19'da çubuk grafik şeklinde ifade edilen yarışmacı moleküllere ait NIP ve MIP'daki yüzde kırılım değişimi grafiği yer almaktadır. Bu grafiğe bakıldığında genel olarak MIP'daki bağlanmanın ve spesifik seçiciliğin NIP'a göre fazla olduğu,  $(\%)\Delta R$  değerindeki değişim ile ortaya konulmaktadır. Ayrıca kurkumin çözeltisinin de ortamda olduğu zaman yarışmacı moleküllerin rekabete girerek daha fazla değişime yol açtığı bir kez daha bu grafikte kanıtlanmıştır.



Şekil 4.18. Kurkumin (CUR), Tartrazin (TAR) ve Sunset Yellow (SY) çözeltileri ile kurkumin baskılanmamış SPR nanosensörüne (NIP) ait sensogram.





Şekil 4.19. Kurkumin (CUR), Tartrazin (TAR) ve Sunset Yellow (SY) çözeltilerinin MIP ve NIP senörlerine ait karşılaştırmalı grafiği.

Seçicilik ( $k$ ) ve bağıl seçicilik ( $k'$ ) katsayılarını belirlemek ve formülize ederek sayısal verileri hesaplamak amacıyla aşağıdaki formüllerden yararlanılmıştır.

$$k = \Delta R_{\text{kalıp}} / \Delta R_{\text{yarışmacı}} \quad (9)$$

$$k' = K_{\text{baskılanmış}} / k_{\text{kontrol}} \quad (10)$$

Yukarıda yer alan formüllerden yola çıkarak gerek MIP gerekse NIP nanosensörler ile yapılan seçicilik çalışmaları doğrultusunda hesaplanan sayısal veriler çizelge 4.3'te ortaya konulmuştur. Her iki nanosensör çalışmasında da yarışmacı moleküllerin kalıp molekül olarak kullanılan kurkumine göre daha az değerde  $\Delta R$  değeri verdiği kaydedilmiştir. Ayrıca kurkuminin MIP nanosensörde kaydedilen 25.07  $\Delta R$  değeri ile NIP nanosensöründeki  $\Delta R$  değerine göre yaklaşık 8.5 kat yüksek olması kurkuminin güçlü bir özgüllük ile nanosensör yüzeyine bağlandığını ortaya koymaktadır.

Çizelge 4.3. Kurkumin ve yarışmacı moleküllere ait seçicilikle ilgili parametreler

Yarışmacı Moleküller	MIP SPR Nanosensör		NIP SPR Nanosensör		
	$\Delta R$	k	$\Delta R$	k	k'
KUR	25.07	-	1.51	-	-
TAR	4.51	5.56	1.32	1.14	4.88
SY	1.09	23.00	1.25	1.21	19.01
KUR+TAR	20.59	1.22	1.44	0.69	1.77
KUR+SY	22.10	1.13	1.31	1.15	0.98
KUR+TAR+SY	23.15	1.08	1.49	1.01	1.07

#### 4.1.2.7. Kurkumin Baskılanmış SPR Nanosensör ile Gerçek Örnek Analizleri

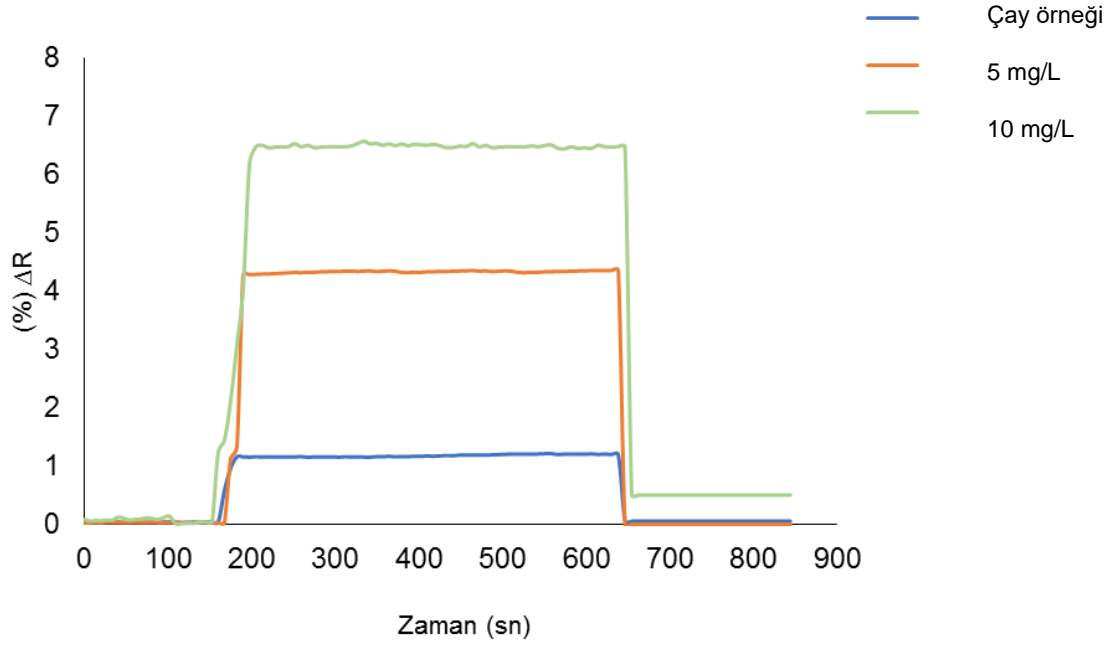
Hazırlanan kurkumin baskılanmış poli(Hema-MATrp) nanopartiküller ile oluşturulan SPR nanosensörlerin doğruluğunu ve çalışılabilirliğini ortaya koymak için gerçek örnek denemeleri yapılmıştır. Bu analizler marketten alınan çay ve toz halindeki baharat olarak kullanılan kurkumin ile yapılmıştır.

Öncelikle gıda örneklerinde ekstraksiyon basamağı gerçekleştirilmiştir. Bunun için öncelikle 60  $\mu$ L sikloheksilamin ve 0.6 gr NaCl 10 mL santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Daha sonra çay ve baharat örneklerinden 0.2 gr. tartılıp santrifüj tüpündeki karışıma eklenmiştir. Diğer bir taraftan 1.35 mL %85'lik H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ve 23.98 gr NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O son hacim 1 L olacak şekilde pH 3.0 tamponu hazırlanmıştır. Santrifüj tüpündeki elde edilen karışımın hacmi pH 3.0 tamponuyla 10 mL'ye tamamlanmıştır ve 5 dk boyunca vortekslenmiştir. Son olarak 5000 rpm'de 25 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı stok olarak alınmıştır [97]. SPR analizleri için çay ve toz kurkumin ekstraktelerine çizelge 4.4'te de belirtildiği gibi ekstra 5 ve 10 mg/L kurkumin çözeltilisinden de ilave edilmiştir. Ayrıca çay ve toz örneklerine ait zamana karşı kırılım değerlerinin yer aldığı sensogramlar da Şekil 4.20 ve 4.21'de yer almaktadır. Sonrasında da LC-MS tekniği kullanılarak validasyon çalışmaları yürütülmüştür. Bu çalışmalarda LC-MS cihazıyla kurkumin içeren gıdalarda miktar tayini yapılmıştır.

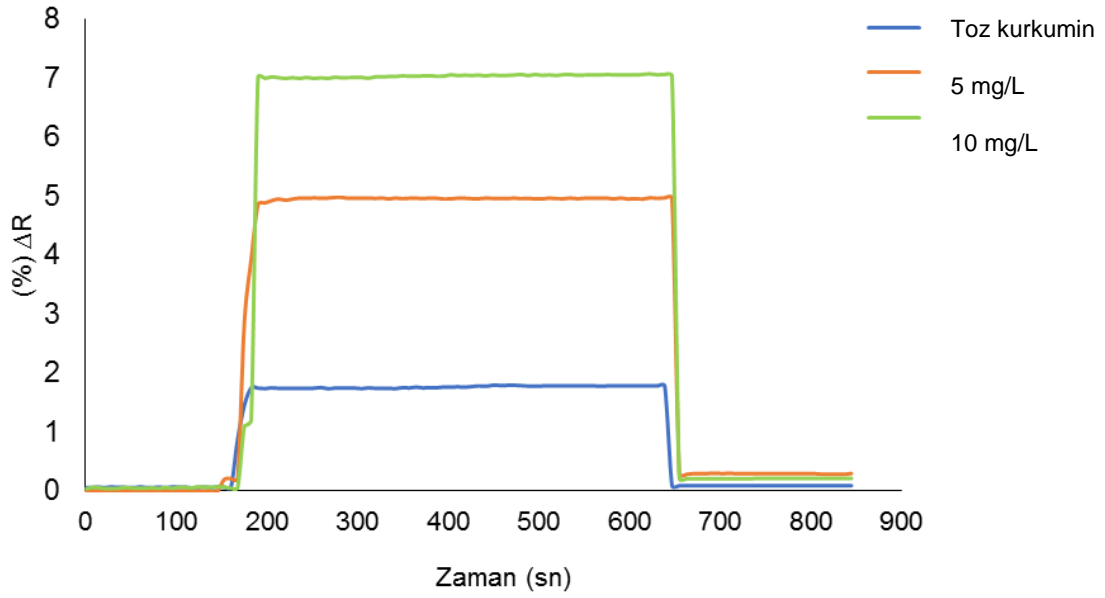
Gerçek örnek denemesi sonuçlarına bakıldığında Şekil 4.20 ve 4.21'deki yer alan  $(\%)\Delta R$  değerleri doğrultusunda  $y=0.4218x+1.0889$  denklemi baz alınarak gerçek örneklere ait kurkumin miktarları hesaplanmıştır. Çizelge 4.4'te görüldüğü üzere referans metot LC-MS ve SPR analizleri için gerek çay gerekse kurkumin tozunda geri kazanım oranı %95'in üzerinde olduğu kaydedilmiştir. Sonuçlar, LC-MS ile kıyaslayarak kurkumin baskılanmış SPR nanosensörünün, çay ve toz numunelerinde kurkumin tespiti için nicel, kesin, kararlı ve hassas olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca tez kapsamında literatürde kurkumin tayinine yönelik yapılmış olan çalışmalar incelenmiş ve çizelge 4.5' te verilmiştir.

Çizelge 4.4. Kurkumin baskılanmış SPR sensörlerin çay ve toz kurkumin örneklerindeki sayısal veriler

Gıda Örnekleri	Eklene miktar (mg/L)	Bulunan miktar (mg/L)		Geri kazanım (%)	
		SPR	LC-MS	SPR	LC-MS
Çay	5	4.92±0.0082	4.91±0.009	98.4±0.630	98.35±0.191
	10	9.96±0.009	9.91±0.01	99.68±0.095	99.15±0.100
Kurkumin Tozu	5	4.93±0.006	4.89±0.008	98.5±0.115	97.8±0.163
	10	9.91±0.008	9.88±0.005	99.1±0.082	98.85±0.057



Şekil 4.20. Kurkumin baskılanmış SPR nanosensörler ile \u00e7ay \u00f6rne\u011fi sensogramı



Şekil 4.21. Kurkumin baskılanmış SPR nanosensörler ile toz kurkumin \u00f6rne\u011fi sensogramı

Çizelge 4.5. Kurkumin saptama yöntemlerine dair literatürde yer alan çalışmalar

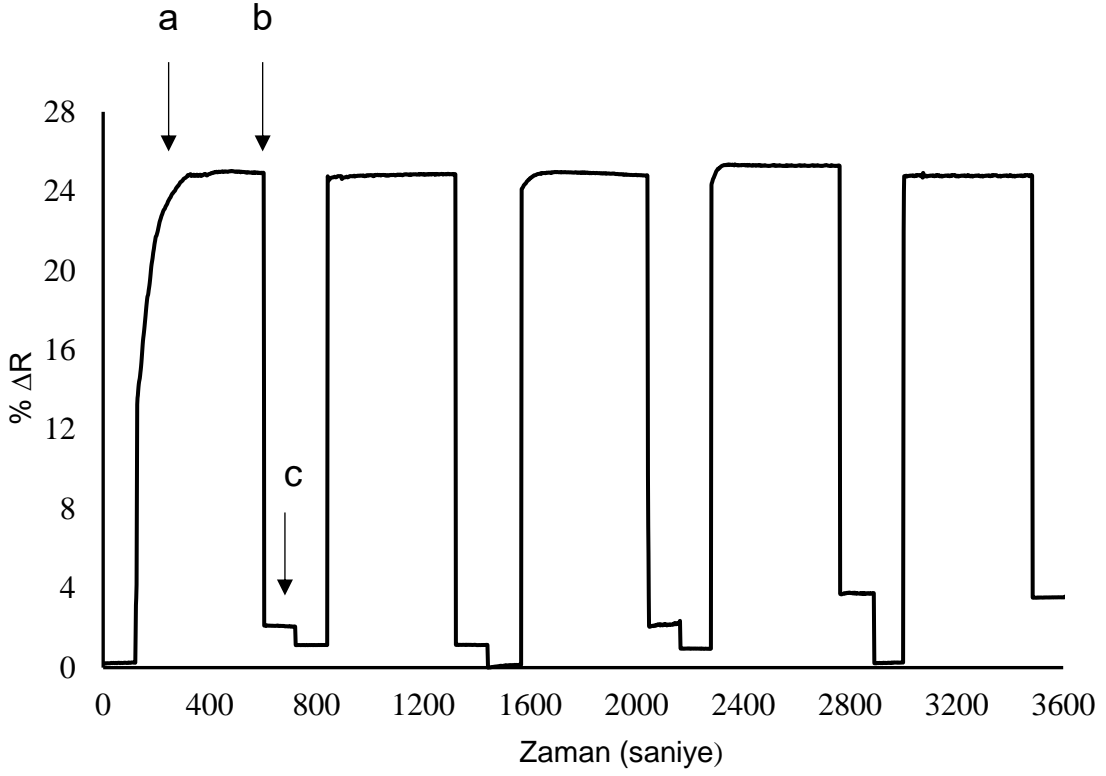
Metot	Tespit Aralığı	Ürün	LOD	RF
Fluoresans sensör	0.0576–2.3026 mg/L	İçme suyu, öğütülmüş zencefil, köri tozu, zencefil suyu, hardal, kırmızı biber, Chinese meyve suyu	0.0067 mg/L	99
Fluoresans sensör	0.0115-4.0295 mg/L	Hardal, zencefil, kırmızı biber ve zerdeçal tozu	0.0044 mg/L	100
Fluoresans sensör	0–172.695 mg/L	Musluk suyu ve mineral suyu	0.0078 mg/L	101
Fluoresans sensör	0.1524-2.2865 mg/L	Kurkumin solüsyonu	0.0469 mg/L	102
Fluoresans kimyasal nanosensor	0.0576-2.3026 mg/L	Zencefil suyu, köri tozu, hardal, öğütülmüş zencefil, radix curcuma	0.0093 mg/L	103
Fluoresans sensör	-	Zencefil	$0.1324 \times 10^{-6}$ mg/L	104
Kağıt sensör	0-299.338 mg/L	Portakal suyu, köri sosu	0.015 mg/L	105
Voltametik sensör	0.0230-36.8416 mg/L	B9 vitamini varlığında gıdalarda	0.0092 mg/L	106
Voltametik sensör	0.0230-0.1151 mg/L	Doğal gıda takviyesi	0.0031 mg/L	107
Yüzey plazmon rezonans nanosensör	0.01-150 mg/L	Kurkumin çayı ve tozu	0.0012 mg/L	Bu çalışma

Tez kapsamında yapılan bu çalışmada 0.01 ile 150 mg/L tespit derişim aralığında olup, LOD değeri 0.0012 mg/L ve LOQ değeri 0.0040 mg/L bulunmuştur. Literatürde yer alan çalışmalara bakıldığında genel olarak floresans sensörler ile çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen LOD değerleri tabloda verilmiştir. Literatüre bakıldığında daha önce SPR ile kurkumin tayinine yönelik yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır. Sonuçlara bakıldığında hassasiyet ve seçicilik açısından kurkumin baskılı SPR nanosensörler ile daha iyi sonuçlar elde edildiğini görülmektedir. Ayrıca tez kapsamında sunulan bu yeni metot ile diğer metotlara kıyasla örnek hazırlama kolaylığı ve kısa sürede ölçüm yapma imkanı bulunmaktadır.

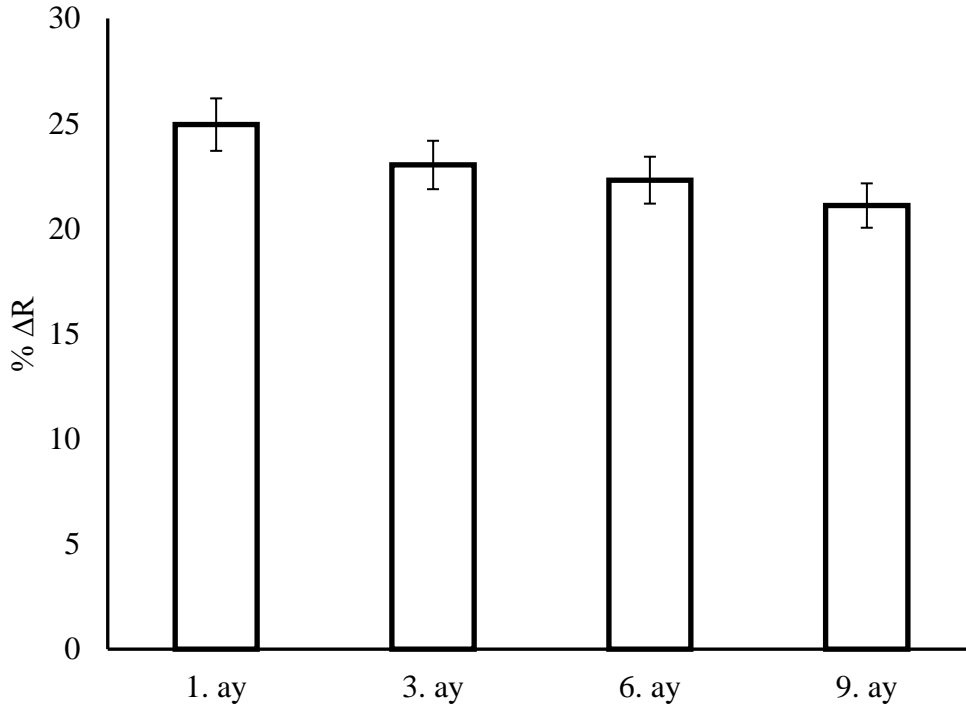
#### **4.1.2.8. SPR Nanosensörlerin Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi**

Kurkumin baskılanmış poli(Hema-MATrp) nanopartiküller ile oluşturulan SPR nanosensörlerin tekrar kullanılabilirliğini incelemek için aynı gün içerisinde art arda 5 defa tekrarlı ölçümler yapılmıştır. Bunun için önce 3 dk pH 7.4 fosfat tamponu sistemden geçirilmiş, daha sonra 8 dk boyunca 50 mg/L derişimindeki kurkumin çözeltisi sisteminden geçirilip en son 3 dk süre ile 0.5 M NaCl desorpsiyon çözeltisi sistemden geçirilmiş. Bu işlem aralıksız arka arkaya 5 kez tekrarlanmıştır ve Şekil 4.22'de zamana karşı kırılma indisi grafiğı yer almaktadır.

Kurkumin baskılanmış SPR nanosensörlerin tekrar kullanılabilirliği sadece aynı gün içerisinde değil, ilk ay ve akabinde 9 ay boyunca 50 mg/L derişimindeki kurkumin çözeltisi ile farklı zamanlarda tekrar kullanılabilirliği analiz edilmiştir. Bu durum kurkumin baskılanmış nanosensörün tekrar kullanılabilirliğinin yanısıra, zaman içerisinde bozunmadan stabil kalabildiğini de ortaya koymaktadır. Şekil 4.23'de elde edilen sonuçlar, zamana karşı  $\% \Delta R$  grafiğine döküldüğünde %84.57 verimlilikle kurkumin baskılanmış SPR nanosensörlerin gıda analizlerinde kullanılabilirliğini ortaya koymaktadır.



Şekil 4.22. Kurkumin baskılanmış SPR nanosensörün aynı gün içerisinde art arda yapılan ölçümler sonucunda tekrarlanabilirliğini gösteren zamana karşı kırılma indisi grafiği (a: adsorpsiyon, b: desorpsiyon, c: rejenerasyon).



Şekil 4.23. Kurkumin baskılanmış SPR nanosensörün aylar içerisinde yapılan ölçümler sonucunda tekrarlanabilirliğini gösteren zamana karşı kırılma indisi grafiği

## 5. YORUM

Günümüzde birçok hastalığa karşı farklı mekanizmalar ile tedavi edici ve enflamasyonu azaltıcı özelliklere sahip olan kurkuminin fazla kullanımı insan sağlığını olumsuz yönde tehdit etmektedir. Aynı zamanda piyasada yer alan ürünlerde kurkumin ile ilgili yapılan miktar değişimi gıda güvenilirliği açısından olumsuz sonuçlara yol açabilmektedir. Bu amaçla tez kapsamında kurkuminin tayinine yönelik hassas, güvenilir ve hızlı SPR nanosensör çalışmaları yürütülmüştür.

Tez çalışmasının ilk basamağında altın sensör çip yüzeyinin allil merkaptan ile modifikasyonu ve kurkumin baskılanmış ve baskılanmamış nanopartiküler sentezi gerçekleştirilmiştir. Öncelikle nanopartikül sentezi için kurkumin miktarı sabit tutularak farklı derişimlerde triptofan monomeriyle ile karıştırılmıştır. UV spektrofotometrede yapılan ölçümler sonucunda en yüksek absorbands değerini veren derişim oran belirlenerek, sentez için ön kompleks oluşturulmuştur. Daha sonra kurkumin baskılanmış ve baskılanmamış nanopartiküller sentezlenmiştir. İkinci aşamada ise zeta boyut analizi, SEM, elipsometre, temas açısı, AFM ve FTIR ile karakterizasyon çalışmaları yürütülmüştür. Zeta boyu analizinde sentezlenen nanopartiküllerin boyut analizleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre kurkumin baskılanmamış nanopartiküllerin ortalama boyutu 68.73 nm çıkarken, kurkumin baskılanmış nanopartiküllerin boyutu ise 70.37 olarak kaydedilmiştir. Elde edilen bu veriler doğrultusunda gerek kurkumin baskılanmış nanopartikül boyutunun büyük olması gerekse homojen dağılım göstergesi olarak PDI değerlerinin her iki grupta da birbirine yakın değerler çıkması, başarılı bir nanopartikül sentezinin gerçekleştiğini göstermektedir. Ayrıca kurkumin baskılanmış nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmalarına yönelik SEM ile yapılan ölçümler sonrasında yaklaşık 76.63 büyüklüğünde ve pürüzlü bir yüzeye sahip olduğu gözlenmiştir. Karakterizasyon çalışmalarının bir diğeri ise SPR nanosensörlerin ortalama kalınlık değerini veren elipsometre cihazıyla gerçekleştirilmiştir. Burada kurkumin baskılanmış SPR nanosensörün 78.5, moleküler baskılanmanın olmadığı sentezde ise 73.4 değeri kaydedilmiştir. Sonuçlara göre kurkumin baskılanmış olan nanosensörün daha kalın olması, moleküler baskılanmanın başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. Bir diğerkarakterizasyon çalışmasında temas açısı ölçümleri yapılmıştır. Yapılan



ölçümler sonucunda allil merkaptan yüzey modifikasyonu sonrası  $72.6^{\circ} \pm 2.7$ , kurkumin baskılanmamış çip yüzeylerinde  $76.1^{\circ} \pm 3.5$  ve baskılanmış  $79.4^{\circ} \pm 2.1$  temas açısı değeri bulunmuştur. MATrp monomerinin hidrofobik fonksiyonel grupları nedeniyle yüzeyin hidrofobik karakterinde artış gözlenmiştir. Kurkumin baskılanmış ve baskılanmamış SPR nanosensörlerin yüzey karakterizasyonunda bir diğeri ise AFM ile gerçekleştirilmiştir. Kurkumin baskılanmış ve baskılanmamış SPR nanosensör yüzeylerinin yüzey derinliği değerleri sırasıyla 43.8 nm ve 39.6 nm olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre kurkumin baskılanmış nanosensörlerin yüzeyinde homojen dağılım yaptığı gözlenmiştir. Tez kapsamında son olarak FTIR cihazıyla analizler gerçekleştirilmiştir. Bu analizlerde kurkumin baskılanmış nanopartiküllerin  $1630 \text{ cm}^{-1}$  ve  $1513 \text{ cm}^{-1}$ 'deki bantları C=C ve C=O titreşim enerjisine sahiptir. Ayrıca aromatik halkaların C-H titreşimlerinden dolayı  $1239 \text{ cm}^{-1}$  bandında pik meydana gelmiştir. Gerek kurkumin baskılanmış gerekse kurkumin baskılanmamış nanopartiküllerin spektrumlarında  $2941 \text{ cm}^{-1}$  (alifatik alkil için CH gerilme),  $1710 \text{ cm}^{-1}$  (C=O gerilme),  $1446 \text{ cm}^{-1}$  ve  $1371 \text{ cm}^{-1}$  (amid için CN gerilme) ve  $1147 \text{ cm}^{-1}$  (aromatik halka bükme) bantları oldukça belirgin bir şekilde gözlenmiştir.

Tez çalışmasında altın çip yüzeyinin modifikasyonu, karakterizasyonu, kurkumin baskılanmış ve baskılanmamış nanopartikül sentezinden sonra kinetik analiz çalışmalarına geçilmiştir. Kurkumin baskılanmış ve baskılanmamış SPR nanosensörler ile toplamda 14 dakikada 0.01 mg/L ile 150 mg/L aralığında farklı derişimlerde hazırlanmış kurkumin çözeltileri analiz edilmiştir. Sensogramlardan yola çıkarak kurkumin derişimi arttıkça aktif seçici bağlanma bölgelerine bağlanan analit derişimi  $\Delta R_{\text{max}}$  değeri arttığı kaydedilmiştir. Ayrıca elde edilen verilere dayanarak  $R^2$  değeri 0.99 olan kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. Bağlanma kinetik ve denge izoterm analizlerine bakıldığında ise kinetik hız sabitlerine göre denge analizinde Scatchard'a ve bağlanma kinetik analizine göre  $K_A$  değeri  $K_D$  değerinden oldukça küçüktür. Bu sonuç bağlanmanın tek bir noktadan güçlü bir şekilde yapılmış olduğunu göstermektedir. Her üç izoterm modeli incelendiğinde ise kurkumin baskılanmış SPR nanosensörlerde en uyan modelin  $R^2$  değerinin 0.999 olduğu Langmuir izoterm modeli olduğu saptanmıştır. Langmuir izotermine göre kurkumin baskılanmış SPR çiplerinin homojen bağlama bölgelerine sahip olduğunun ve tek tabakalı güçlü bir bağlantı olduğuna işaret etmektedir.

Kurkumin baskılanmış ve baskılanmamış MATrp nanosensörlerde tartrazin ve sunset yellow gibi yarışmacı moleküller ile seçicilik analizleri de gerçekleştirilmiştir. Her iki nanosensör çalışmasında da yarışmacı moleküllerin kalıp molekül olarak kullanılan kurkumine göre daha az değerinde  $\Delta R$  değeri verdiği ve MIP nanosensörde kaydedilen 25.07  $\Delta R$  değeri ile NIP nanosensöründeki  $\Delta R$  değerine göre yaklaşık 8.5 kat yüksek olması kurkumin baskılama işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini göstermektedir. Ayrıca seçicilik katsayılarında, MIP nanosensörün NIP nanosensöre kıyasla kurkumini oldukça seçici bir şekilde tayin edebildiği ortaya konulmuştur.

Geliştirilen bu SPR nanosensörü ile sahada uygulanabilirliğini test etmek amacıyla marketten alınan kurkumin içerikli toz baharat ve çay örnekleri ekstrakte edilerek incelenmiştir. Sonuçlar her iki numunede de SPR nanosensörler ile küçük derişimlerde bile geliştirilen metodun duyarlı olduğunu ve geri kazanım oranının %95'in üzerinde olması ile de kurkumin tayini için kullanılabilirliğini ortaya koymaktadır. Tez kapsamında referans metot olarak LC-MS cihazıyla da gerçek örnek numuneleri üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar SPR ile kıyaslandığında oldukça tutarlı sonuçlar elde edildiği ve doğruluk payının yüksek olduğu bulunmuştur.

Ayrıca tez çalışması kapsamında aynı gün içerisinde ve 9 ay boyunca tekrarlı ölçümler alınarak SPR nanosensörler ile analizler gerçekleştirilmiştir. Kırınım yüzdesinin minimal düzeyde değişimi kurkumin baskılanmış SPR nanosensörünün kararlılığını ve bozunmadan tekrar kullanılabilirliğini ortaya koymuştur.

Bu tez çalışması literatürde ilk defa yapılan bir çalışma olması sebebiyle SPR nanosensörler için öncü niteliği taşımaktadır. Kısa sürede tayin etme, oldukça hassas sonuçlar ve örnek hazırlama kolaylığı ile günümüzde çalışılan birçok sisteme göre fark yaratmaktadır. Ayrıca kurkumin tayininde özellikle moleküler baskılanmış nanosensörlerde spesifik seçiciliğin arttığı ve bozunmadan aylar boyunca tekrar kullanılabilir olması sahada aktif olarak uygulabileceğini ortaya koymaktadır.

## 6. KAYNAKLAR

- [1] B. B. Aggarwal, C. Sundaram, N. Malani, H. Ichikawa , “Curcumin: The Indian solid gold”, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 595, (2007) 1-75.
- [2] M. Akpolat, Topçu Y. Tarladaçalışır, H. Uz, Sapmaz Metin M., Kızılay G., *Kanser Tedavisinde Curcuminin Yeri*, *Yeni Tıp Dergisi*, 27, (2010) 142-147.
- [3] R. A. Sharma, A.J. Gescher, W.P, Steward, Curcumin: the story so far, *European Journal of Cancer*, 41, (2005) 1955–1968.
- [4] R. Warunyoupalin, Study on the complex formation between curcumin and metal ions by spectrophotometric method, *Central European Journal of Chemistry* 7(3), (2007), 388-394.
- [5] S. Bansal, M. Goel, F. Aqil, M. Vadhanam, R. Gupta, Advanced drug delivery systems of curcumin for cancer chemoprevention, *Cancer Prev Res* 4, (2011), 1158–1171.
- [6] B. Li, S. Konecke, L. A. Wegiel, Taylor, L. S. ve Edgar, K. J., Both solubility and chemical stability of curcumin are enhanced by solid dispersion in cellulose derivative matrices., *Carbohydr Polym.*, 15;98(1), (2013), 1108-1116.
- [7] A. Tapal, ve P. K. Tiku, Complexation of curcumin with soy protein isolate and its implications on solubility and stability of curcumin. *Food chemistry*, 130,4 (2012) 960-965.
- [8] D. Guzman-Villanueva, Í. M. El-Sherbiny, D. Herrera-Ruiz, ve H. D. C. Smyth, Design and In Vitro Evaluation of a New NanoMicroparticulate System for Enhanced Aqueous-Phase Solubility of Curcumin., *BioMed Research International*, (2013), 9 pages.
- [9] MR. Chowdhury, R.M. Moshikur, R. Wakabayashi, Y. Tahara, N. Kamiya , M. Moniruzzaman, M. Goto, Development of a novel ionic liquid–curcumin complex to enhance its solubility, stability, and activity, *Chemical Communications*, 55(54), (2019), 7737-7740.
- [10] M.T. Huang, R.C. Smart, C.Q. Wong, A.H. Conney, Inhibitory effect of curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid, and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res.*, 48, (1988) 5941-5946.

- [11] R. Kuttan, P. Bhanumathy, K. Nirmala, M.C. George, Potential anticancer activity of turmeric (*Curcuma longa*), *Cancer Lett.*, 29, (1985), 197-202,.
- [12] R. Kuttan, P.C. Sudheeran, C.D. Joseph, Turmeric and curcumin as topical agents in cancer therapy, *Tumori*, 73, (1987), 29-31,.
- [13] TS. Rao, N. Basu, S.D. Seth, H.H. Siddiqui, Some aspects of pharmacological profile of sodium curcumin, *Indian J Physiol Pharmacol*, 28, (1984), 211-5,.
- [14] S.S. Deshpande, A.D. Ingle, G.B. Maru, Chemopreventive efficacy of curcumin-free aqueous turmeric extract in 7,12-dimethylbenzane anthracene-induced rat mammary tumorigenesis, *Cancer Lett*, 123, (1998), 35-40,.
- [15] R.A. Sharma, H.R. McLelland, K.A. Hill, C.R. Ireson, S.A. Euden, M.M. Manson, et al. Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of oral *Curcuma* extract in patients with colorectal cancer, *Clin Cancer Res*, 7, (2001), 1894-1900.
- [16] B.B. Aggarwal, S. Shishodia, Y. Takada, S. Banerjee, R.A. Newman, C.E. Bueso-Ramos et al., Curcumin suppresses the paclitaxel-induced nuclear factor-kappaB pathway in breast cancer cells and inhibits lung metastasis of human breast cancer in nude mice. *Clin Cancer Res* 11, (2005), 7490-7498.
- [17] R.L. Thangapazham, A. Sharma, R.K. Maheshwari, Multiple molecular targets in cancer chemoprevention by curcumin. *AAPS J.* 8, (2006), 443-9.
- [18] P. Anand, C. Sundaram, S. Jhurani, A.B. Kunnumakkara, B.B Aggarwal, Curcumin and cancer: An “old-age” disease with an “age-old” solution. *Cancer Letters*, 267, (2008), 133–164.
- [19] H. Hatcher, R. Planalp, J. Cho, F.M. Torti, S.V. Torti, Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials. *Cell Mol Life Sci.*, 65, (2008), 1631-1652.
- [20] M. Akpolat, M. Kanter, M.C. Uzal, Protective effects of curcumin against gamma radiation-induced ileal mucosal damage. *Arch Toxicol.*,83, (2009), 609.
- [21] R. A. Sharma, A.J. Gescher, W.P. Steward, Curcumin: the story so far. *European Journal of Cancer*, 41, (2005), 1955–1968.
- [22] D. Youssef, C. E. Nichols, T. Cameron, S. Cameron, J. Balzarini, E. De Clercq, A. Jha, Design, synthesis, and cytostatic activity of novel cyclic curcumin analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17, (2007), 5624–5629.

- [23] S.M. Khopde, K.I. Priyadasini, P. Venkatesen, *et al.*, Free radical scavenging ability and antioxidant efficiency of curcumin and its substituted analogue, *Biophys.Chem.*, 80, (1999), 85–91.
- [24] B.K. Adams, J. Cai, J. Armstrong, *et al.*, EF24, a novel synthetic curcumin analog, induces apoptosis in cancer cells via a redox-dependent mechanism. *Anticancer Drugs*, 16, (2005), 263–275.
- [25] P. Limtrakul, S. Lipigorngoson, O. Namwong, A. Apisariyakul, F.W. Dunn, Inhibitory effect of dietary curcumin on skin carcinogenesis in mice. *Cancer Lett*, 116, (1997), 197-203.
- [26] J.T. Piper, S.S. Singhal, M.S. Salameh, R.T. Torman, Y.C. Awasthi, S., Awasthi Mechanisms of anticarcinogenic properties of curcumin: the effect of curcumin on glutathione linked detoxification enzymes in rat liver. *Int J Biochem Cell Biol*, 30, (1998), 445-56.
- [27] J. Ushida, S. Sugie, K. Kawabata, Q.V. Pham, T. Tanaka, K. Fujii, Chemopreventive effect of curcumin on N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal carcinogenesis in rats. *Jpn J Cancer Res*, 91, (2000), 893-898.
- [28] W. Kiefer, G. Dannhardt, "COX-2 inhibition and the control of pain." *Curr Opin Investig Drugs.*, 3(9), (2002), 1348-58.
- [29] B.B Aggarwal, A. Kumar, M.S. Aggarwal, *et al.*. Curcumin derived from turmeric (*Curcuma longa*): a spice for all seasons. *In Phytochemicals in Cancer Chemoprevention*. P.D. Debasis Bagchi & H.G. Preuss, Eds., (2005), 349–387.
- [30] M. A. El-Moselhy, A. Taye, S. S. Sharkawi, S. F. I. El-Sisi, and A. F. Ahmed, The antihyperglycemic effect of curcumin in high fat diet fed rats. Role of TNF- $\alpha$  and free fatty acids, *Food and Chemical Toxicology*, vol. 49, no. 5, (2011), 1129–1140.
- [31] M. F. El-Azab, F. M. Attia, and A. M. El-Mowafy, Novel role of curcumin combined with bone marrow transplantation in reversing experimental diabetes: effects on pancreatic islet regeneration, oxidative stress, and inflammatory cytokines, *European Journal of Pharmacology*, vol. 658, no. 1, (2011) 41–48
- [32] P. Suryanarayana, A. Satyanarayana, N. Balakrishna, P. U. Kumar, and G. Bhanuprakash Reddy, Effect of turmeric and curcumin on oxidative stress and

antioxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic rat, *Medical Science Monitor*, vol. 13, no. 12, (2007), 286–292.

[33] K. I. Seo, M. S. Choi, U. J. Jung et al., Effect of curcumin supplementation on blood glucose, plasma insulin, and glucose homeostasis related enzyme activities in diabetic db/db mice, *Molecular Nutrition and Food Research*, vol. 52, no. 9, (2008) 995–1004.

[34] H. J. He, G. Y. Wang, Y. Gao, W. H. Ling, Z. W. Yu, and T. R. Jin, Curcumin attenuates Nrf2 signaling defect, oxidative stress in muscle and glucose intolerance in high fat diet-fed mice, *World Journal of Diabetes*, vol. 3, no. 5, (2012), 94–104.

[35] B. Chandran and A. Goel, A Randomized, Pilot Study to Assess the Efficacy and Safety of Curcumin in Patients with Active Rheumatoid Arthritis *Phytother. Res.* 26, (2012), 1719–1725.

[36] M. Qureshi, E. A. Al-Suhaimi, F. Wahid, O. Shehzad & A. Shehzad, Therapeutic potential of curcumin for multiple sclerosis, *Neurological Sciences*, 39, (2018), 207–214.

[37] T. Ahmed, A.H. Gilani, Inhibitory effect of curcuminoids on acetylcholinesterase activity and attenuation of scopolamine-induced amnesia may explain medicinal use of turmeric in Alzheimer's disease. *Pharmacol Biochem Behav.*, 91, (2009), 554–559.

[38] M. Garcia-Alloza, E.M. Robbins, S.X. Zhang-Nunes, et al., Characterization of amyloid deposition in the APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mouse model of Alzheimer disease, *Neurobiol Dis*, 24, (2006), 516–524.

[39] M. E. Egan, M. Pearson, S. A. Weiner, V. Rajendran, D. Rubin, J. Glöckner-Pagel, S. Canny, K. Du, G. L. Lukacs, M. J. Caplan, Curcumin, a Major Constituent of Turmeric, Corrects Cystic Fibrosis Defects, *Science*, 304-5670, (2004), 600-602.

[40] X. Fang, L. Fang, S. Gou, L. Cheng, Design and synthesis of dimethylaminomethyl-substituted curcumin derivatives/analogues: Potent antitumor and antioxidant activity, improved stability and aqueous solubility compared with curcumin., *Bioorg Med Chem Lett.*, 23(5), (2013) 1297-1301.

- [41] Q. Peiyu, M. Shuli, L. Jing, Z. Liming, Y. Peng, Wenyuan G. Overdose Intake of Curcumin Initiates the Unbalanced State of Bodies J. Agric. Food Chem. 64, (2016) 2765–2771.
- [42] H. Mossalam, A. Yousuf, Potential Protective Effect of Curcumin on Acitretin - Induced Nephrotoxicity in Adult Albino Rat. Nature and Science.12(11), (2014), 1-14.
- [43] S.S. Deshpande, V.S. Lalitha, A.D. Ingle, A.S. Raste, S.G. Gadre, G.B. Marua, Subchronic oral toxicity of turmeric and ethanolic turmeric extract in female mice and rats, Toxicology Letters, 95, (1998) ,183 – 193.
- [44] D.C. Michele and G. Riccardo, Dietary Curcumin: Correlation between Bioavailability and Health Potential, Nutrients, 11(9), (2019), 2147.
- [45] S. Chen, Q. Li, A. J. McClements, Y. Han, L. Dai, L. Mao, Y. Gao, Co-delivery of curcumin and piperine in zein-carrageenan core-shell nanoparticles: Formation, structure, stability and in vitro gastrointestinal digestion, Food Hydrocolloids, 99 (2020), 105334.
- [46] R.F. Tayyem, D.D. Heath, W.K. Al-Delaimy, C.L. Rock, Curcumin Content of Turmeric and Curry Powders, Nutrition and cancer, 55 (2), (2006), 126-31.
- [47] J.E. Pearson, A. Gill, P. Vadgama Analytical aspects of biosensors, Ann. Clin. Biochem., 37, (2000), 119-145.
- [48] Y. Saylan, F. Yilmaz, E. Özgür, A. Derazshamshir, H. Yavuz, A. Denizli, Molecular Imprinting Of Macromolecules For Sensor Applications, Sensors, 17-4, (2017), 898.
- [49] G. Ertürk, and B. Mattiasson, Molecular Imprinting Techniques Used For The Preparation Of Biosensors, Sensors, 17-2, (2017), 288.
- [50] E. Gizeli, C.R. Lowe, Immunosensors, Analytical biotechnology Curr. Opin. Biotechnol., 7, (1996), 1-3.
- [51] L.J. Sokoll, D.W. Chan, Clinical analyzers. Immunoassays, Anal. Chem., 71, (1999), 356-362.
- [52] J. Wang, Analytical Electrochemistry, 2nd ed. Wiley & Sons Inc., (2000).
- [53] J. Vetelino, A. Reghu, Introduction to Sensors. CRC Press, New York, (2011).
- [54] M. Khalid, Electrochemistry Intechopen, (2013).

- [55] A. C. Michael, L. M. Borland, *Electrochemical Methods for Neuroscience*, CRC Press, Taylor & Francis, ( **2007**).
- [56] D. Çimen, N. Bereli, S. Günaydın, A. Denizli, Detection of cardiac troponin-I by optic biosensors with immobilized anti-cardiac troponin-I monoclonal antibody, *TALANTA*, 219, ( **2020** ) 121259.
- [57] B. Liedberg, C. Nylander, and I. Lunstrom, Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sens. Actuators* 4, ( **1983** ) , 299-304.
- [58] N. Bereli, D. Çimen, S. Hüseyinli, A. Denizli, Analysis of Drug Residues in Eggs via the Surface Plasmon Resonance and Quartz Crystal Microbalance Sensors, *Journal of food Science*, 85, 12, ( **2020** ) 4152-4160,.
- [59] D. Schaming, H. Remita, *Nanotechnology: from the ancient time to nowadays*, *Foundation of Chemistry*, 17 ( **2015** ) 187–205.
- [60] M. Loose, *Nanoscience and Nanotechnology, Carbon Nanotube Reinforced Composites: CNR Polymer Science and Technology*, ( **2014**).
- [61] F. Allhoff, P. Lin, D. Moore, *Nanoteknoloji Nedir Ve Neden Önemlidir? Bilimden Etiğe*, 1. Basım, TÜBİTAK Popüler Bilim Kitapları, Ankara, ( **2017**).
- [62] Ş. Erkoç, *Nanobilim ve Nanoteknoloji*, 7. Basım, ODTÜ Yayıncılık, Ankara, 2014.
- [63] J.J. Ramsden, What is Nanotechnology?, *Nanotechnology*, 1–1, ( **2011**).
- [64] A. Kumar, S. Singh, N. Singh, S. Arora, *Nanotechnology: a review.*, *Journal of Pharmacy Research*, 5 ( **2012** ) 3630–3634.
- [65] K. Niska, E. Zielinska, M.W. Radomski, I. Inkielewicz-Stepniak, Metal nanoparticles in dermatology and cosmetology: Interactions with human skin cells, *Chemico-Biological Interactions* 295 ( **2018** ) 38–51.
- [66] R. Seigneuric, L. Markey, D.S. a Nuyten, C. Dubernet, C.T. a Evelo, E. Finot, C. Garrido, From nanotechnology to nanomedicine: applications to cancer research., *Current Molecular Medicine* 10 ( **2010** ) 640–652.
- [67] Koç F., Kocaman S., Eskişehir, *Kontrollü Salınım Sistemleri ve Bu Sistemlerde Kullanılan Polimerler*, Osmangazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, Bitirme Tezi, **2004**.
- [68] O.V. Salata, Applications of nanoparticles in biology and medicine. *Journal of Nanobiotechnology*, ( **2004** )1-6.



- [69] V. T. Liveri, Controlled Synthesis of Nanoparticles in Microheterogeneous Systems, Springer Science Business Media, the USA , Chapter 1, **2006**.
- [70] R. Bogue, Nanosensors: a review of recent progress, Sensor Review, 28 -1 (**2008**) 12–17.
- [71] Çimen, N. Bereli, A. Denizli, Patulin Imprinted Nanoparticles Decorated Surface Plasmon Resonance Chips for Patulin Detection, Photonic Sensors, (**2021**) DOI: 10.1007/s13320-021-0638-1.
- [72] M. Björnmalm, M. Faria, F. Caruso. Increasing the impact of materials in and beyond bio-nanoscience. J. Am. Chem. Soc. 138- 13 (**2016**) 449-456.
- [73] G. Wulff, A. Sarhan, The use of polymers with enzymeanalogous structures for the resolution of racemates, Angewandte Chemie, 84 (**1972**) 364.
- [74] G. Wulff, K. Knorr, Stoichiometric Noncovalent interaction in Molecular imprinting, Bioseparation, 10 (**2002**) 257-276.
- [75] J.E. Lofgreen, G.A. Ozin, Controlling morphology and porosity to improve performance of molecularly imprinted sol–gel silica, Chemical Society Reviews, 43, (**2014**) 911–933.
- [76] H. Yan, K.H. Row, Characteristic and Synthetic Approach of Molecularly Imprinted Polymer, International Journal Of Molecular Science, 7 (**2006**) 155–178.
- [77] D.R. Kryscio, N.A. Peppas, Critical review and perspective of macromolecularly imprinted polymers, Acta Biomaterialia, 8, (**2012**) 461–473.
- [78] E. L. Holthoff, F. V. Brigh, Molecularly templated materials in chemical sensing, Analytica Chimica Acta, , 594 (**2007**) 147-161.
- [79] R.J. Umpleby, M. Bode, K.D. Shimizu, Measurement of the continuous distribution of binding sites in molecularly imprinted polymers, Analyst, 125, (**2000**) 1261-1265.
- [80] Y. Fuchs, O. Soperra, K. Haupt, Photopolymerization and photostructuring of molecularly imprinted polymers for sensor applications--a review, Analytica Chimica Acta, 717 (**2012**) 7-20.

- [81] J.M. Gladis, T.P. Rao, Effect of porogen type on the synthesis of uranium ion imprinted polymer materials for the reconcentration/separation of traces of uranium, *Microchimica Acta*, 146 (2004) 251–258.
- [82] Schirhagl, R., Bioapplications for molecularly imprinted polymers, *Analytical Chemistry*, 86 (2013) 250–261.
- [83] N. Greene, S.I. Morgan, K. Shimizu, Molecularly imprinted polymer sensor arrays, *Chemical Communications*, 10 (2004) 1172-1173.
- [84] D.R. Kryscio, N.A. Peppas, Critical review and perspective of macromolecularly imprinted polymers, *Acta Biomaterialia*, 8 (2012) 461–473.
- [85] S. Faalnouri, D. Çimen, N. Bereli, A. Denizli, Surface Plasmon Resonance Nanosensors for Detecting Amoxicillin in Milk Samples with Amoxicillin Imprinted Poly(hydroxyethylmethacrylate-N-methacryloyl-(L)-glutamic acid), *Chemistryselect*, 5, (2020) 4761-4769.
- [86] N. Bereli, D. Çimen, A. Denizli, Optical Sensor-Based Molecular Imprinted Poly(Hydroxyethyl Methacrylate-N-Methacryloyl-(L)-Histidine Methyl ester) Thin Films for Determination of Tartrazine in Fruit Juice, *IEEE SENSORS JOURNAL*, 21, 12, (2021) 13215-13222.
- [87] D. Çimen, N. Bereli, M. Andaç, A. Denizli, Molecularly imprinted cryogel columns for Concanavalin A purification from jack bean extract, *Sep Sci plus*, (2018) 1–10.
- [88] C.M. Lok, R. Son, Application of molecularly imprinted polymers in food sample analysis – a perspective, *international food research journal*, 16 (2009) 127–140.
- [89] D. Çimen, N. Bereli, A. Denizli, Surface Plasmon Resonance Based on Molecularly Imprinted Polymeric Film for L-Phenylalanine Detection, *Biosensors*, 11, 21, (2021).
- [90] D. Çimen, A. Denizli, Development Of Rapid, Sensitive And Effective Plasmonic Nanosensor For The Detection Of Vitamins In Food Samples, *Photonic Sensor*, 10, 4, (2020) 316–332.
- [91] O. Ramström, K. Skudar, J. Haines, P. Patel, A. Brüggemann, Food analyses using molecularly imprinted polymers, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (2001) 2105–2114.

- [92] J. Chen, S. Shinde, M.H. Koch, M. Eisenacher, S. Galozzi, T. Lerari, K. Barkovits, P. Subedi, R. Krüger, Kuhlmann, B. Sellergren, S. Helling, K. Marcus, Low-bias phosphopeptide enrichment from scarce samples using plastic antibodies, *Scientific Reports*, 5 (2015) DOI: 10.1038/srep11438.
- [93] A. Arash, G. Mehrorang, E. Alipanahpour, S. Agarwal Vinod Kumar Gupta, Application of Response Surface Methodology and Dispersive Liquid–Liquid Microextraction by Microvolume Spectrophotometry Method for Rapid Determination of Curcumin in Water, Wastewater, and Food Samples, *Food Anal. Methods*, 9 (2016) 1274–1283.
- [94] B. Sasikumar, S. Syamkumar, R. Remya & T. John Zachariah, PCR Based Detection of Adulteration in the Market Samples of Turmeric Powder, *Food Biotechnology*, 18-3 (2004) 299-306.
- [95] K. Dhanya, S. Syamkumar, S. Siju, B. Sasikumar, Sequence characterized amplified region markers: A reliable tool for adulterant detection in turmeric powder, *Food Research International*, 44 (2011) 2889–2895.
- [96] E. A. Hudson, H.M.C. de Paula, R. M. da Silva, A. C. dos S. Pires, L. H. M. da Silva, Curcumin-micellar casein multisite interactions elucidated by surface plasmon resonance, *International Journal of Biological Macromolecules*, 133 (2019) 860–866.
- [97] K. Gurmen, Separation And Preconcentration Of Curcumin With Salt Supported Homogenous Liquid Phase Microextraction Method In Different Samples, Erciyes University, Institute of Science M.Sc. Thesis, (2019).
- [98] W. Li, H. Yang, B. Buckley, L. Wang, AN. Kong, A novel triple stage ion trap MS method validated for curcumin pharmacokinetics application: A comparison summary of the latest validated curcumin LC/MS methods, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 156 (2018) 116–124.
- [99] Y. Liu, X. Gong, W. Dong, R. Zhou, S. Shuang, C. Dong, Nitrogen and phosphorus dual-doped carbon dots as a label-free sensor for curcumin determination in real sample and cellular imaging, *Talanta*, 183 (2018) 61-69.

- [100] Q. Hu, L. Gao, S. Rao, Z. Yang, T. Li, X. Gong, Nitrogen and chlorine dual-doped carbon nanodots for determination of curcumin in food matrix via inner filter effect, *Food Chemistry*, 280 (2019) 195-202.
- [101] B. Wu, X. Liu, X. Shi, W. Han, C. Wang, L. Jiang, Highly photoluminescent and temperature sensitive P, N, B-co-doped carbon quantum dots and their highly sensitive recognition for curcumin, *Royal Societes of Chemistry Advances* (2019).
- [102] Z. Guo, Z. Zhu, Z. Sun, X. Zhang, Y. Chen, Synthesis of dual-emitting (Gd,Eu)<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PEI@CD composite and its potential as ratiometric fluorescent sensor for curcumin, *Materials Research Bulletin*, 108 (2018) 83-88.
- [103] X. Gong, H. Wang, Y. Liu, Q. Hu, Y. Gao, Z. Yang, S. Shuang, C. Dong, A di-functional and label-free carbon-based chem-nanosensor for real-time monitoring of pH fluctuation and quantitative determining of curcumin, *Analytical Chimical Acta*, 1057 (2019) 132-144.
- [104] Si Jiang, J. Qiu, B. Lina, H. Guo, F. Yang, First fluorescent sensor for curcumin in aqueous media based on acylhydrazone-bridged bis-tetraphenylethylene, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 229 (2020) 117-916
- [105] X. Du, G. Wen, Z. Li, H-W. Li, Paper sensor of curcumin by fluorescence resonance energy transfer on nitrogen-doped carbon quantum dot. *Spectrochemical Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 227 (2020) 1386-1425.
- [106] S. Cheraghi, MA. Taher, HK. Maleh, Electroanalysis fabrication of fas tand sensitive nanostructure voltammetric sensor for determination of curcumin in the presence of vitamin B9 in food samples, *Electroanalysis*, 28 (2016) 2590-2597.
- [107] C. Raril, JG. Manjunatha, G. Tigari, Low-cost voltammetric sensor based on an anionic surfactant modified carbon nanocomposite material for the rapid determination of curcumin in natural food supplement, *Instrumentation Science and Technology*, 48 (2020) 561-582.