

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

NANODESENLENMİŞ VE MOLEKÜLER BASKILANMIŞ
KLORAMFENİKOL BİYOSENSÖRÜNÜN HAZIRLANMASI,
KARAKTERİZASYONU VE GIDA GÜVENLİĞİ AMACIYLA KULLANIM
POTANSİYELİNİN BELİRLENMESİ

DOKTORA TEZİ

Meryem KARA

HAZİRAN, 2010
TRABZON

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

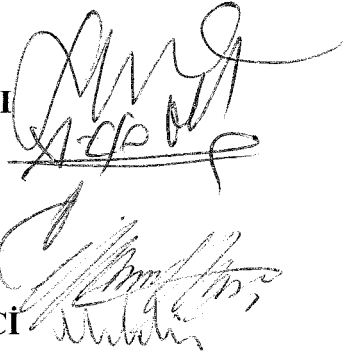
**NANODESENLENMİŞ VE MOLEKÜLER BASKILANMIŞ KLORAMFENİKOL
BİYOSENSÖRÜNÜN HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU VE GIDA
GÜVENLİĞİ AMACIYLA KULLANIM POTANSİYELİNİN BELİRLENMESİ**

Meryem KARA

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
"Doktor (Kimya)"
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih :14.06.2010
Tezin Savunma Tarihi :24.06.2010**

**Tez Danışmanı : Doç. Dr. Sevgi KOLAYLI
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ahmet ÇOLAK
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Orhan DEĞER
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Murat KÜÇÜK
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ**



Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Salih TERZİOĞLU

Trabzon 2010

İkinci Tez Danışmanı

: Prof. Dr. Adil DENİZLİ

ÖNSÖZ

Bu tezle moleküler baskılama yöntemi ile nanodesenlenmiş yüzey plazmon rezonans sensörlerin hazırlanması ve gıda güvenliği uygulamalarının araştırılması amaçlanmıştır. Projemizin literatüre ve ülkemizdeki nanoteknolojik çalışmaların hızlandırılması ve yaygınlaştırılması çalışmalarına bir katkı sağlaması temenni edilmektedir.

Doktora tezi olarak yürütülen çalışmamız Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafından hızlı destek projesi olarak (Proje no: 2008.111.02.6) desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı KTÜ BAP birimine ve tez çalışmalarının yürütülmesinde her türlü donanımlarından yararlandığım Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü yetkililerine teşekkür ederim.

Tez çalışmamın belirlenmesi ve yürütülmesinde desteğini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Sn. Doç. Dr. Sevgi KOLAYLI'ya, laboratuvar imkânlarını bizimle paylaşan Sn. Prof. Dr. Adil DENİZLİ'ye, doktora çalışmalarımnda önerileriyle destek veren Sn. Prof. Dr. Orhan DEĞER ve Sn. Doç. Dr. Ahmet ÇOLAK'a, deneylerin yürütülmesinde destek veren Sn. Dr. Lokman UZUN ve Sn. Gülsu ŞENER'e, ayrıca doktora çalışmalarımın bitirilmesinde desteklerini esirgemeyen Sn. Yrd. Doç. Dr. Fatih ER'e, biricik dostum Sn. Saliha DİNÇ'e, sabırlarından ve teşviklerinden dolayı sevgili aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Meryem KARA

Trabzon 2010

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	II
ÖZET.....	VI
SUMMARY	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
TABLolar DİZİNİ.....	X
SEMBOLLER DİZİNİ	XI
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş	1
1.2. Yüzey Plazmon Rezonans.....	4
1.3. Yüzey Plazmon Rezonans Sensörler	7
1.4. Bir SPR Sensör Sisteminde Deney Adımları.....	9
1.5. Denge Analizi (Scathard modeli).....	12
1.6. Bağlanma Kinetik Analizi.....	13
1.7. Denge İzoterm Modelleri	14
1.7.1. Langmuir Modeli.....	14
1.7.2. Freundlich Modeli	15
1.7.3. Langmuir-Freundlich (LF) modeli	15
1.8. SPR Uygulamaları ve Gıda Güvenliği Örnekleri.....	15
1.9. Biyolojik Tanıma Elementleri Olarak Kullanılabilecek Ligandlar.....	17
1.10. Moleküler Baskılama Teknolojisinin Tarihçesi.....	18
1.11. Moleküler Baskılama	19
1.12. Moleküler Baskılama Çeşitleri	20
1.12.1. Kovalent Baskılama	20
1.12.2. Kovalent Olmayan Baskılama.....	21
1.13. Kovalent ve Kovalent Olmayan Baskılamanın Avantaj ve Dezavantajları	21
1.14. Moleküler Baskılamada Kullanılan Materyaller.....	22
1.14.1. Fonksiyonel Monomerler	22
1.14.2. Çapraz Bağlayıcılar	23

1.14.3.	Çözücüler.....	24
1.14.4.	Başlatıcılar.....	25
1.14.5.	Kalıp Molekül.....	25
1.15.	Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Uygulama Alanları	26
1.16.	Moleküler Baskılamanın Gıda Güvenliği Amaçlı Uygulamaları	28
1.17.	Kloramfenikol.....	29
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR	31
2.1.	Kullanılan Kimyasal Maddeler	31
2.1.1.	N-Metakriloil-(L)-Histidin Metil Ester (MAH) Monomerinin Sentezlenmesi...31	
2.2.2.	MAH Monomerinin Karakterizasyonu.....	32
2.2.2.1.	FTIR Analizi.....	32
2.2.3.	Kloramfenikol Baskılanmış Poli(EDMAH) Nanopartiküllerin Hazırlanması	32
2.2.4.	Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	33
2.2.4.1.	Zeta Boyut Analizi.....	33
2.2.5.	Yüzey Plazmon Rezonans Sensör Yüzeyine Nanopartiküllerin Tutturulması.....	34
2.3.	Kalıp Molekülün Desorpsiyonu	33
2.4.	Yüzey Plazmon Rezonans Nanosensörün Karakterizasyonu	34
2.4.1.	Atomik Kuvvet Mikroskopisi.....	34
2.4.2.	Temas Açısı Ölçümleri.....	34
2.5.	Yüzey Plazmon Rezonans Sistemi ile Plazmon Ölçümleri	35
2.6.	SPR Nanosensörle Kinetik Analizlerin Gerçekleştirilmesi	35
2.6.1.	Seçicilik Analizleri	36
2.7.	Bal Numunelerinin Hazırlanması ve Kinetik Analizler.....	39
3.	BULGULAR VE TARTIŞMA	40
3.1.	MAH Monomerinin Sentezi ve Karakterizasyonu	40
3.1.1.	FTIR Analizi.....	40
3.2.	Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	41
3.2.1.	Zeta Boyut Analizi	41
3.3.	Kloramfenikol Baskılanmış SPR Nanosensör Yüzeyinin Karakterizasyonu	42
3.3.1.	Atomik Kuvvet Mikroskopisi (AFM) Analizi.....	42
3.4.	Kinetik Analizler.....	46

3.4.1.	Denge Analizi ve Bağlanma Kinetik Analiz Sonuçları.....	53
3.4.2.	Denge İzoterm Modelleri	54
3.5.	Seçicilik Analiz Sonuçları.....	57
3.6.	Değişik Bal eşitlerinden Yapılan Kinetik Analizler.....	64
4.	SONUÇLAR VE ÖNERİLER	65
5.	KAYNAKLAR.....	68
ÖZGEÇMİŞ		

ÖZET

Bu çalışma kapsamında nanodesenlenmiş ve moleküler baskılanmış (MIP) yüzey plazmon rezonans (SPR) sensörünün hazırlanması, karakterizasyonu ve gıda güvenliği amacıyla kullanım potansiyelinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Birinci aşamada N-Metakriloil-(L)-Histidin Metil Ester (MAH) monomeri sentezlenmiş ve FTIR spektrofotometresi ile karakterize edilmiştir. İkinci aşamada MAH ve EDMA (Etilen glikol dimetakrilat) varlığında kloramfenikol (CAP) baskılanmış nanopartiküller miniemülsiyon polimerizasyon yöntemi ile hazırlanmıştır. Kontrol amaçlı olarak kloramfenikol baskılanmamış nanopartiküller de hazırlanmıştır. Nanopartiküllerin karakterizasyonu zeta boyut analizi ile gerçekleştirilmiştir ve nanopartikül büyüklüğü 52 nm bulunmuştur. Üçüncü aşamada hazırlanan nanopartiküller çipin altın yüzeyine tutturulmuştur. Nanosensörün yüzey karakterizasyonu atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ve temas açısı ölçümleriyle gerçekleştirilmiştir. 0,155-6,192 nM derişim aralığındaki CAP çözeltileri ile kinetik analizler yapılmış ve adsorpsiyon izoterm modelleri incelenmiştir. Langmuir modelinin bu sisteme en uygun adsorpsiyon modeli olduğu bulunmuştur ($R^2, 0.9941$). Kloramfenikolün moleküler baskılanmış nanopartiküllere adsorpsiyonunun baskılanmamış olanlarına göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Nanopartiküllerin seçiciliğini belirlemek için florfenikol (FAP) ve tiyamfenikol (TAP) antibiyotikleri yarışmacı bileşen olarak seçilmiştir. Baskılanmış nanopartiküller; kloramfenikolü tiyamfenikole göre 8.86 kat, florfenikole göre 8.36 kat daha yüksek seçicilikte tanımaktadır. Tayin limiti 0,04 µg/kg olarak bulunmuştur. 5 değişik balda yapılan analizlerde ise CAP miktarı tayin limitinin altında kalmıştır. Hazırlanan nanosensörün gıda güvenliği amacıyla gelecekteki potansiyel biosensör fabrikasyon çalışmalarına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Yüzey Plazmon Rezonans, SPR, Moleküler Baskılama, Kloramfenikol, Gıda Güvenliği

SUMMARY

Nanopatterned and molecularly imprinted chloramphenicol biosensor: Preparation, characterization and determination of utilization potential for food safety purpose

Preparation, characterization of nanopatterned and molecularly imprinted surface plasmon resonance sensor and determination of its utilization potential for food safety purpose was aimed in this study. At the first stage, N-methacryloyl-(L)-histidine methyl ester (MAH) monomer was synthesized and characterized with FTIR spectrophotometer. At the second stage, chloramphenicol imprinted nanoparticles were prepared in the presence of MAH and EDMA by miniemulsion polymerisation method. Non-imprinted nanoparticles were also prepared without chloramphenicol for control purpose. Characterisation of nanoparticles were carried out with zeta-sizer measurement and size of nanoparticles was found as 52 nm. At the third stage, nanoparticles were immobilized to the surface of gold chip. Surface characterisation was performed with atomic force microscopy (AFM) and contact angle measurements. Kinetic analyses were executed with chloramphenicol solution (concentration range 0,155-6,192 nM) and adsorption isotherms were examined. Langmuir model was found the most appropriate adsorption model for this system ($R^2, 0.9941$). Adsorption of chloramphenicol to the molecularly imprinted nanoparticles was determined to be higher than that of non-imprinted ones. Florfenicol and thiamphenicol antibiotics were chosen as competitive components to determine selectivity of nanoparticles. Imprinted nanoparticles selectively recognize the CAP molecules 8.86 times more than thiamphenicol and 8.36 times more than florfenicol. Detection limit was found as 0,04 $\mu\text{g/kg}$. The amount of CAP in five different honey samples was below detection limit. It is thought that prepared nanosensor will make contribution to sensor fabrication studies of food safety purpose in future.

Key Words: Surface Plasmon Resonance, SPR, Molecular Imprinting, Chloramphenicol Food Safety

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Elektromanyetik dalganın oluşumu	5
Şekil 2. Yüzey plazmon rezonansının oluşumu	6
Şekil 3. Yüzeyi altın kaplı SPR sensör çipi.....	7
Şekil 4. Yüzey plazmon rezonans sistemi.....	8
Şekil 5. Direk dedeksiyon aşamaları.....	10
Şekil 6. Moleküler baskılanmış polimerin hazırlanma adımları	20
Şekil 7. Kloramfenikol.....	31
Şekil 8. Yarışmacı bileşen olarak seçilen florfenikol (FAP) ve tiyamfenikol (TAP)	39
Şekil 9. GenOptics SPRiLab sistemi.....	39
Şekil 10. MAH monomerinin sentez reaksiyonu	41
Şekil 11. MAH Monomerinin FTIR spektrumu.....	42
Şekil 12. Kloramfenikol baskılanmış (MIP) SPR nanosensörün (a) Yüzey görüntüsü (b) 3B görüntüsü	44
Şekil 13. Kloramfenikol baskılanmamış (NIP) SPR nanosensörün (a) Yüzey görüntüsü (b) 3B görüntüsü	45
Şekil 14. Temas açısı ölçümleri: a, b: Modifiye edilmemiş nanosensör yüzeyi c,d: CAP baskılanmış nanosensör yüzeyi e, f: CAP baskılanmamış nanosensör yüzeyi.....	47
Şekil 15. Kloramfenikol çözeltilerinin her birinin kloramfenikol baskılanmış SPR nanosensörden elde edilen zamana karşı % R değerlerine ait sensogramları.....	48
Şekil 16. Kloramfenikol çözeltilerinin hazırlanan derişimlerinin (0.155-6.192 nM) zamana karşı % R değerlerine ait SPR sensorgramları.....	50
Şekil 17. Kloramfenikol çözeltilerinin her birinin kloramfenikol baskılanmış SPR nanosensörden elde edilen zamana karşı ΔR değerlerine ait sensorgramları	51
Şekil 18. Kloramfenikol çözeltilerinin hazırlanan derişimlerinin (0.155-6.192 nM) zamana karşı ΔR değerlerine ait SPR sensorgramları	54
Şekil 19. Kloramfenikol derişimi ile ΔR arasındaki ilişki	55

Şekil 20. Kinetik hız sabitlerinin belirlenmesi. (a) Denge analiz yaklaşımı (Scatchard); (b) Bağlanma kinetik yaklaşımı	57
Şekil 21. Denge adsorpsiyon izoterm modelleri a) Langmuir, b) Freundlich, c) Langmuir- Freundlich	59
Şekil 22. CAP molekülünün moleküler baskılanmamış polimerde (NIP) zamana karşı % R değerlerine ait sensogramlar	61
Şekil 23. Kloramfenikol çözeltilerinin 0.155; 0.619; 1.858; 3.096 ve 6.192 nM derişimlerinde moleküler baskılanmamış polimerde (NIP) zamana karşı % R değerlerine ait SPR sensorgramlarının bir arada gösterilmesi	62
Şekil 24. CAP molekülünün moleküler baskılanmamış polimerde (NIP) zamana karşı ΔR değerlerine ait sensogramlar	62
Şekil 25. Kloramfenikol çözeltilerinin 0.155; 0.619; 1.858; 3.096 ve 6.192 nM derişimlerinde moleküler baskılanmamış polimerde (NIP) zamana karşı ΔR değerlerine ait SPR sensorgramlarının bir arada gösterimi	64
Şekil 26. Kloramfenikol <u>baskılanmış</u> nanosensör yüzeyinden geçirilen 1.858 nM derişimindeki CAP, FAP ve TAP çözeltilerine ait zamana karşı % R değerlerine ait SPRsensogramlar (a) CAP-MIP (b) FAP-MIP (c) TAP-MIP.....	65
Şekil 27. Kloramfenikol <u>baskılanmamış</u> nanosensör yüzeyinden geçirilen 1.858 nM derişimindeki CAP, FAP ve TAP çözeltilerine ait zamana karşı % R değerlerine ait SPR sensogramlar (a) CAP-NIP (b) FAP-NIP (c) TAP-NIP.....	66

TABLÖLER DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1.	Çapraz bağlayıcılar.....	24
Tablo2.	Atomik kuvvet mikroskopisi analiz parametreleri	43
Tablo 3.	Temas açısı ölçümleri	46
Tablo 4.	Kinetik hız sabitleri	56
Tablo 5.	Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich parametreleri	60
Tablo 6.	Kloramfenikol antibiyotiğine göre FAP ve TAP antibiyotik- lerinin K_d , k ve k' değerleri	67

SEMBOLLER DİZİNİ

AFM	:	Atomik kuvvet mikroskopisi
AIBN	:	2,2'-azobis(izobütironitril)
ADVN	:	2,2'-azobis(2,4 dimetilvaleronitril)
APS	:	Amonyum persülfat
CAP	:	Kloramfenikol
CE	:	Kapiler elektroforez
EDMA	:	Etilen glikol dimetakrilat
FAP	:	Florfenikol
FDA	:	Gıda ve ilaç dairesi
FTIR	:	Fourier Dönüslü IR Spektroskopi
HEMA	:	2-Hidroksietil metakrilat
HPLC	:	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
MAH	:	N-Metakriloil-(L)-Histidin Metil Ester
MIP	:	Moleküler baskılanmış polimer
MS	:	Kütle spektrometresi
NIP	:	Moleküler baskılanmamış polimer
NMR	:	Nükleer manyetik rezonans
MRLP	:	İstenen maksimum performans limiti
PAH	:	Poliaromatik hidrokarbonlar
pAPBA	:	Poli-3-aminofenilboronikasit
PCB	:	Poliklorlanmış bifeniller
PVA	:	Poli(vinil alkol)

QCM	:	Kuvars kristal mikroterazi
SDS	:	Sodyum dodesil sülfat
SPR	:	Yüzey plazmon rezonans
TAP	:	Tiyamfenikol

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

AB ülkeleri ile kıyaslandığında nüfus ve yüzölçümü bakımından büyük bir ülke olan Türkiye’de özellikle küçük çaplı üretim yapan kayıt ve kontrol dışı gıda işletmelerinin sayısının fazla olması, gıda kontrol hizmetlerinin yetersiz oluşu, toplumda riskli sayılabilecek gıda tüketim alışkanlıklarının olması gıda güvenliğini olumsuz yönde etkilemektedir. Gıda güvenliği; tüketime sunulan gıdalarda fiziksel, kimyasal, biyolojik ve her türlü tehlikeli ajanların bertaraf edilmesi için alınan tedbirler bütünüdür. Başka bir ifadeyle tarladan sofraya, çevre ve insan sağlığına zarar vermeyen, üretimin her aşamasında gerekli kontrolleri yapılmış sağlıklı ve güvenilir ürünlerin temin edilmesidir. Son 40 yıldır Avrupa Birliği gıdaların güvenilirliği ile ilgili çok geniş yasalar, standartlar ve izleme prosedürleri oluşturmaktadır. Gıda ve yem konusunda kontrol hizmetleri vermekte olan il kontrol laboratuvarlarının, üretim yapan firmaların, özel laboratuvarların çalışmalarının da AB normlarında olması gerekmektedir. Bu laboratuvarların çalışmalarının daha etkin ve güvenilir bir şekilde yürütülmesi ulusal ve uluslararası yeterlilik testlerine tabi tutularak akreditasyonunun sağlanması da önemlidir. Ayrıca erken uyarı sisteminin oluşturulmasında önemli olan hızlı, güvenilir, hassas test yöntemleri geliştirilmelidir. Başka bir deyişle tarım ve gıda sektörü; proseslerin ve ürünlerin güvenliğini ve kalitesini sağlamak amacıyla gelişmiş analitik tekniklere sürekli ihtiyaç duymaktadır. Bu analitik tekniklerden maliyeti uygun olan, güvenilir, gıda proseslerini izlemeye ve zor çevre şartlarına uygun olan ve saha çalışmalarında hemen cevap verebilen teknikler daha çok dikkat çekmektedir. Bu güne kadar enzim, immünolojik çalışmalar, biyosensörler ve afinite teknikleri gibi birçok analitik metotta antikor, enzim ve reseptör gibi doğal, spesifik teşhis elementleri kullanılmıştır. Bu metotlar oldukça önemli olmalarına rağmen bazılarında stabilite ve maliyet gibi sorunlar vardır. Diğer yaygın olarak kullanılan teknikler; yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC), kapiler elektroforez (CE), gaz kromatografisi, nükleer manyetik rezonans (NMR) ve kütle spektrometresi (MS) gibi fizikokimyasal tekniklerdir. Biyolojik örnekler için HPLC özellikle de MS ya da NMR gibi gelişmiş dedektörlerle birlikte kullanıldığında hâla en temel analitik cihazdır. Bu teknikte ise yeni ve daha spesifik sabit fazlara gereksinim vardır. Bu nedenle alternatif tekniklerin kullanımı önem arz etmektedir. Moleküler baskılama teknolojisi, bilim

adamlarına bazı avantajlar sunan hedef moleküle yönelik yüksek spesifiteli reseptör bölgelerine sahip gelişmekte olan bir alandır (Ramstrom vd., 2001). Moleküler baskılanmış polimerler (MIP), kalıp molekül olarak kullanılan hedef molekülün varlığında hazırlanmaktadır. Kalıp molekül, çapraz bağlayıcı ile bağlanmadan önce fonksiyonel monomerlerle etkileşime girmektedir. Kalıp molekül katı polimerden uzaklaştırıldığında ise hedef moleküle komplementer olan spesifik bağlanma bölgeleri oluşmaktadır (Lok ve Son, 2009). Afinite ve seçicilik bakımından doğal reseptörlere benzeyen moleküler baskılanmış polimerler, kolay hazırlanabilme ve adaptasyon, birçok solvent ve koşullarda stabil olma gibi özelliklere sahiptirler.

Geleneksel baskılama tekniğinde düşük bağlanma verimi, yavaş bağlanma ve kalıp molekülün bağlanma bölgelerine hemen bağlanmasının engellenmesi ve üretimindeki zorluklar gibi dezavantajları vardır. Bu nedenle baskılanacak materyalin moleküler seviyede kontrol edilmesi önemlidir. Geleneksel baskılamadaki dezavantajların bir kısmı moleküler baskılamada matriks olarak kullanılan ultraince filmlerle giderilmektedir. Adsorpsiyon hızının artmasıyla seperasyon gücü arttığı için moleküler baskılama alanında ultraince filmlere olan ilgi de artmıştır (Yang vd., 2008). Ancak özellikle yüksek duyarlılık ve kısa sürede cevabın istendiği sensör uygulamalarında yüzeyde hızlı bir kütle transferi için film kalınlığının yeterince ince olması gerekir. Buna karşılık, yüzeyde baskılanmış MIP küreciklerin düzenli şekilleri ve makromoleküllerin hızlı bir şekilde tekrar bağlanması gibi özellikleri sözü edilen sorunları giderebilir niteliktedir (Tan ve Tong, 2007). Son zamanlarda moleküler baskılanmış nanomateryallerin geliştirilmesinde alternatif yaklaşımlar geliştirilmiştir. Nano düzeyde moleküler baskılamada, birim hacimdeki alan daha yüksek olduğu için kalıp molekül tamamen ayrılabilir, baskılanmış bölgeler daha kolay ulaşılabilir ve kütle transferinde daha düşük bir dirençle karşılaşılır (Xie vd., 2008). Dolayısıyla moleküler baskılamadaki nanoteknikler, geleneksel baskılama yöntemlerinde karşılaşılan sorunlara çözüm olabilirler (Xie vd., 2006).

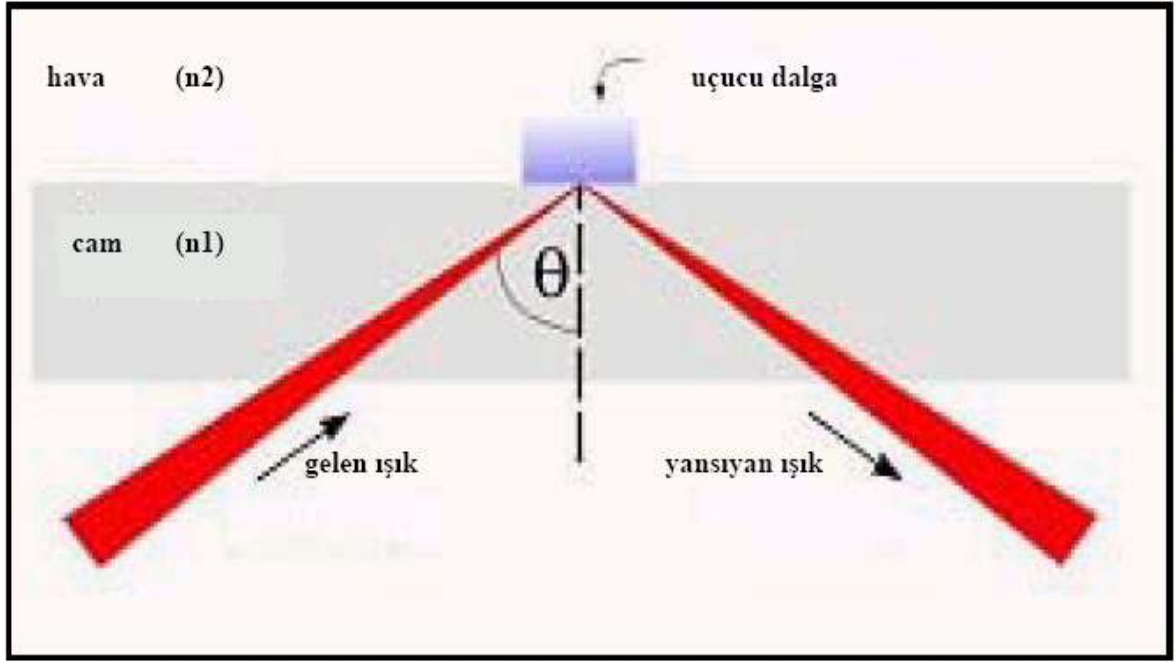
Günümüzde biyosensör teknolojisi giderek gelişmekte ve yaygınlaşmaktadır ancak ticari anlamdaki başarısı bazı biyolojik materyallerin düşük stabilite, yüksek maliyetli olması ve hedef molekülü tanıyacak enzim ya da reseptörlerin olmaması gibi problemlerden dolayı engellenmektedir. Ancak moleküler baskılanmış polimerler yüksek stabilitelerinden dolayı, sensörlerde kullanım amacıyla biyolojik reseptörlere alternatif olabilmektedirler. Ayrıca polimerizasyon basamakları, sensör teknolojisinde kullanılan mikrofabrikasyonla tamamen uyumludur. Herbisitler, şekerler, nükleik asit ve amino asit türevleri, ilaçlar, toksinler ve

Kloramfenikolün kantitatif tayinleri ülkemizde sınırlı sayıda laboratuvarıda yatırım maliyeti yüksek LC-MS-MS cihazıyla gerçekleştirilmektedir. Diğer laboratuvarlarda ise ELISA ve Charm II gibi testlerle sadece tarama yapılmakta ve miktar verilmemektedir. Ayrıca MIP ve SPR teknolojilerinin tarım ve gıda endüstrisine yönelik analitlerin tayiniyle ilgili birçok çalışma olmasına rağmen veteriner ilaç kalıntılarından kloramfenikolün tayininde MIP-SPR kombinasyonunun birlikte kullanıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmayla kloramfenikol tayininde kullanılabilecek MIP esaslı SPR nanosensör hazırlanması amaçlanmış ve analizin daha hızlı, hassas ve düşük maliyetle yapılması hedeflenmiştir. Araştırmada kloramfenikol baskılanmış nanopartiküller hazırlanmış ve bu nano partiküller SPR sensör yüzeyine tutturulmuştur.

1.2. Yüzey Plazmon Rezonans

Polarize ışık, yüzeyi altın kaplı bir prizmaya gönderildiğinde ışığın bir kısmı absorplanır ve bir kısmı da yansır. Geliş açısı değiştirilip yansıyan ışığın şiddeti izlendiğinde yansıyan ışık şiddetinin minimuma kaydığı görülür. Bu geliş açısında ışık, yüzey plazmonlarını (elektron paketçikleri) harekete geçirecek, yüzey plazmon rezonans olayı gerçekleşecek ve yansıyan ışığın şiddetinde bir minimuma ulaşılabacaktır. Yansıyan ışığın şiddetinde maksimum kaybın gerçekleştiği açıya rezonans açısı ya da SPR açısı adı verilir (Spadavecchia vd., 2005). Metaldeki iletken elektronlar (plazmonlar) metal kristal kafesi boyunca serbestçe hareket edebilirler ve bazı zamanlarda kinetik enerjilerinden dolayı metalin yüzeyinden ayrılabilirler. Bir elektron yüzeyden uzaklaştığında değişen yük dağılımından kaynaklanan geri toplama kuvveti elektronu kafesin içine geri çeker. Enerji transferi spesifik bir dalga boyunda gerçekleşir (Diltemiz, 2006). Yüzeydeki elektronların yüzeyin normal düzlemi ile yaptıkları ortalama hareket, harmonik osilatöre benzer şekilde ölçülebilen belirli bir frekanstadır. SPR açısı ortamın ve metalin (genellikle altın) refraktif indisi gibi sistemin optik karakteristiklerine bağlıdır. Prizma tarafındaki refraktif indeks değişmezken metal yüzeyinin hemen yakınında bulunan refraktif indeks yüzeydeki kütle birikiminden dolayı değişecektir. Bu nedenle yüzey plazmon rezonans koşulları değişir ve SPR açısındaki kayma, yüzeyde gerçekleşen adsorpsiyon kinetiği hakkında fikir verir (Schasfoort ve Tudos, 2008).

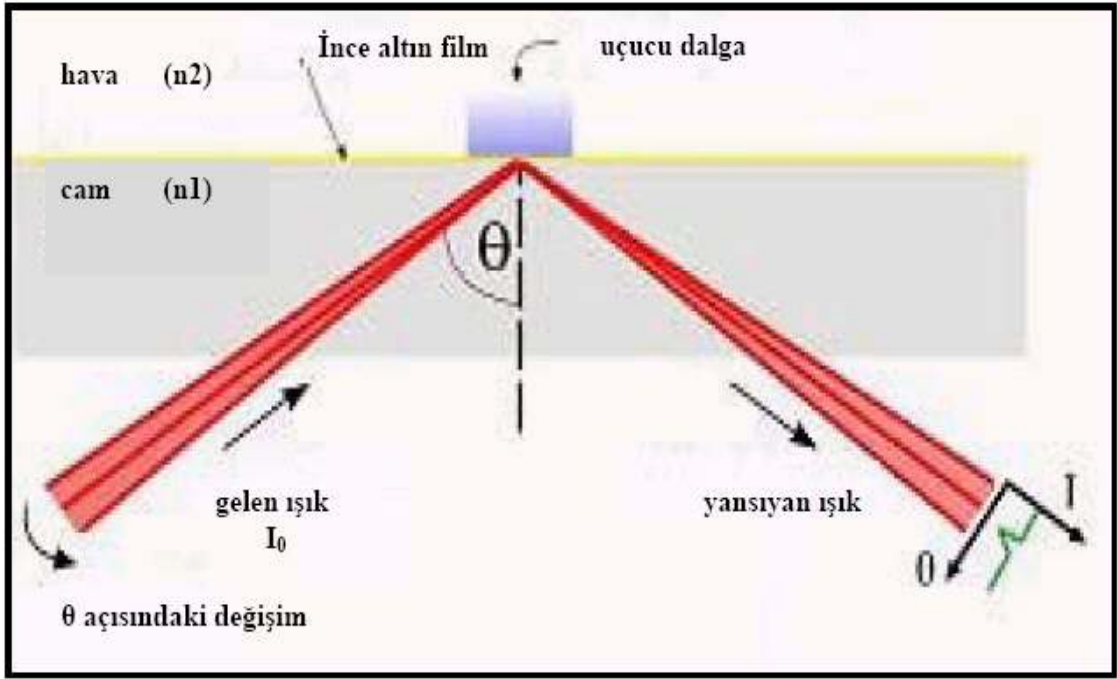
Belirli şartlar altında ışık fotonları tarafından taşınan enerji, metal yüzeyinde bulunan ve plazmon adı verilen elektron paketçiklerine transfer edilir. Enerji transferi ışığın spesifik bir dalga boyunda meydana gelir. Bu rezonans dalga boyu fotonlar tarafından kuantlaşmış enerji seviyesine eşit olduğu dalga boyudur. Yüzey plazmonlarının titreşimi sonucu elektromanyetik dalgalar oluşur (Şekil 1) (URL-3, 2010). P-polarize ışığın fotonları metal yüzeyindeki serbest elektronlarla etkileşime girerek serbest elektronların dalga benzeri salınımlarına neden olur ve böylece yansıyan ışığın şiddeti azalır (Spadavecchia vd., 2005). P-polarize ışık, elektrik vektörü dalga düzlemine paralel ise oluşur. S-polarize ışık ise elektrik vektörü dalga düzlemine dik ise oluşur (Gryczynski vd., 2004).



Şekil 1. Elektromanyetik dalganın oluşumu

Sadece p-polarize ışık yüzey plazmonlarını harekete geçirir, s-polarize ışık geçiremez (Xinglong vd., 2001). Çünkü sadece p-polarize ışık metal film normaline uygun elektrik alan vektör salınımına sahiptir. Yüzey plazmon rezonansı iki optik ortamın ara yüzüne ince iletken bir film yerleştirildiğinde meydana gelir. Spesifik bir geliş açısında metal yüzeyindeki elektronlar (yüzey plazmonları) frekanslarının eşleşmeleri nedeniyle gelen ışık ile rezonans durumuna gelecektir. Bu rezonans durumunda enerji absorblanacağı için yansıyan ışının (I) yoğunluğunda bir azalma meydana gelir (Şekil 2) (URL-3, 2010). Yüzey plazmon rezonansın gözlendiği yansıyan ışın açısını belirleyen 3 tane parametre vardır:

- Metal filmin özellikleri (optik sabitler, kalınlık, tekdüzelik gibi)
- Geliş açısının dalga boyu
- Metal filmin her iki yüzeyindeki ortamın refraktif indeksi

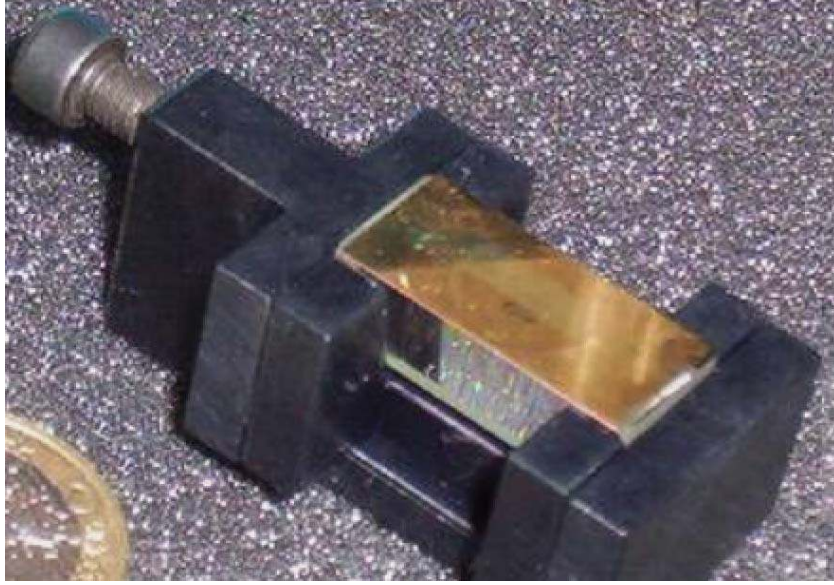


Şekil 2. Yüzey plazmon rezonansın oluşumu

Gerçek zamanlı biyointeraksiyon analizlerinde metal filmin özellikleri, dalga boyu ve yoğun ortamın (cam) refraktif indeksleri sabit tutulur. SPR altın metal yüzeye bitişik sıvı tabakadaki refraktif indeksi ölçer. Altın film yüzeyinden incelenen mesafe, sönümlenen dalganın çözelti içerisine ne kadar penetre olduğuyula belirlenir. Dalga, metal filmden uzaklaştıkça üstel olarak azalır (Biacore AB,1998).

Metal yüzey olarak en yaygın kullanılanı altındır (Şekil 3). Gümüş uzun süre stabil kalacak nitelikte değildir. İndiyum pahalı, Na ise oldukça reaktiftir (Caide ve Sui, 2000; Homola, 1999; Earp ve Dessy, 1996). Altın, kimyasal stabilitesi ve serbest elektron davranışından dolayı çok tercih edilmektedir. Altın filmin kalınlığı genellikle 50-100 nm arasındadır.

SPR açısındaki kaymanın belirlenmesi için SPR sistemleri farklı şekillerde yapılandırılabilirler. Yüzey plazmonlarının uyarılması için kullanılan 3 farklı optik sistem vardır. Bunlar; prizmalar, gratingler ve optik dalgalarıdır (Schasfoort ve Tudos, 2008). Ancak yüzey plazmon rezonansını meydana getirmek için kullanılan iki sistem Kretchman ve Otto prizmalarıdır. SPR cihazlarında en yaygın kullanılanı ise Kretchman prizmasıdır. Kretchman konfigürasyonu yüzey plazmonlarını harekete geçirmek için azaltılmış toplam yansıma prensibini kullanır (Shankaran, 2007).



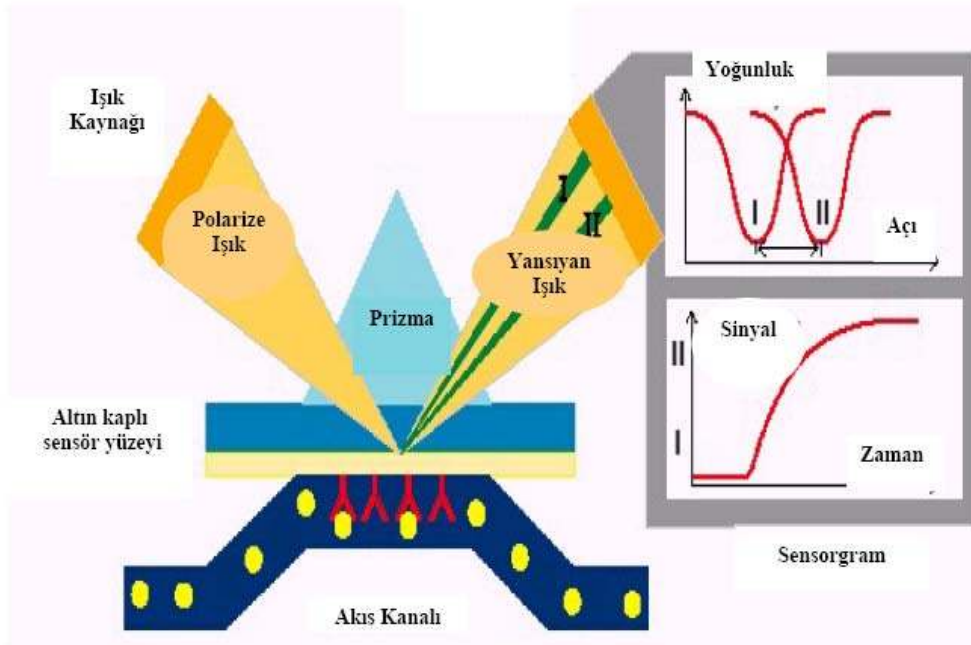
Şekil 3. Yüzeyi altın kaplı SPR sensör çipi

1.2. Yüzey Plazmon Rezonans Sensörler

Biyosensörler; doku, mikroorganizma, organel, hücre reseptörü, enzim, antikor gibi biyolojik bir element ve fizikokimyasal bir dönüştürücüden oluşan analitik cihazlardır. Hedef analit ve biyolojik materyal arasında oluşan spesifik etkileşim fizikokimyasal bir değişim oluşturur ve bu da dönüştürücü (transducer) tarafından dedekte edilir. Transducer daha sonra spesifik analitin konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak analog bir elektrik sinyali oluşturur (Schasfoort ve Tudos, 2008). Yüzey plazmon rezonans ise dönüştürücü yüzeyine çok yakın kısımlarda oluşan, ışık ile metal yüzeyinin etkileşiminden meydana gelen biyomoleküler interaksiyonların izlenmesinde kullanılan yüzey duyarlı optik bir tekniktir (Shankaran, 2007). Başka bir deyişle SPR sensörler prensipte, yüzey plazmonu oluşturan metal filmin yüzeyinde kırılma indisinde meydana gelen değişimleri ölçen ince film refraktometrelerdir (Homola, 2008). Dönüştürücü yüzeyine immobilize edilmiş

biyomolekül ile bu moleküle spesifik analit arasındaki interaksyonu, ara yüzeydeki kırılma indisi değişimlerinden yararlanarak gerçek zamanlı veren, biyomolekülün işaretlenmesine gereksinim göstermeyen bir sistemdir (Shankaran, 2007). Bu sistem sensör yüzeyinde cereyan eden biyomoleküller etkileşimleri incelemek için yüzey plazma dalgalarını kullanır (Homola vd., 2007). Bir SPR sisteminde genel olarak lazer ışık kaynağı, dedektör, cam prizma, altın yüzey, biyomolekül ve akış sistemi bulunmaktadır (Homola vd., 2007; Indyk, 2006) (Şekil 4).

SPR sensörler metal yüzeyindeki sınırlı bir alanı ya da sabit bir hacmi dedekte edebilirler ve direkt olarak refraktif indeksi ölçerler (Homola ve Piliarik, 2006). Sinyalin alınabildiği elektromanyetik alanın (kaybolan, sönümlenen alan) penetrasyon derinliği genellikle birkaç yüz nanometreyi aşmaz ve sensör yüzeyindeki metalden uzaklaştıkça üstel olarak azalır. Sönümlenen alanın penetrasyon derinliği gelen ışığın dalga boyunun bir fonksiyonudur. Sönümlenen alandaki bütün refraktif indeks değişimleri sinyal değişimi olarak yansır. Bu değişimler, ortamların farklı refraktif indekse sahip olmasından kaynaklanabilir. SPR sensör yüzeyinin seçici bir tanıma için hedef molekülü seçici olarak yakalayabilmesi buna karşılık örnekteki diğer bileşenlere bağlanma eğilimi olmayan bir ligand ile modifiye edilmesi gerekir (Schasfoort ve Tudos, 2008).



Şekil 4. Yüzey plazmon rezonans sistemi

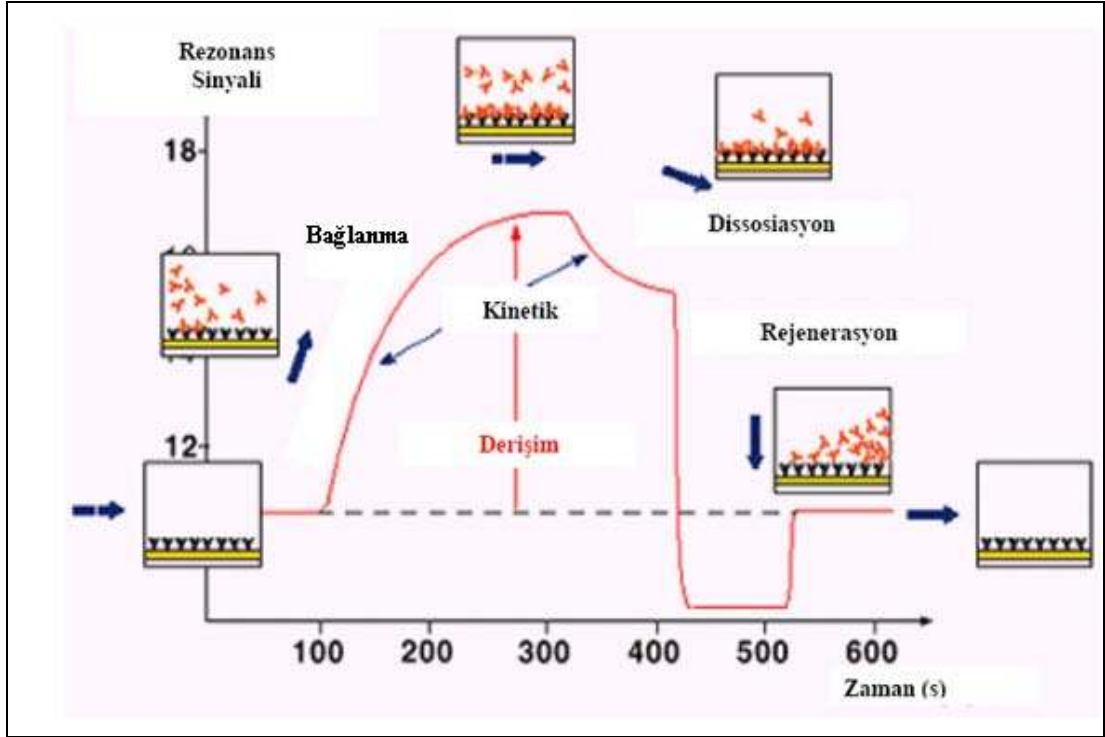
SPR sensörler, uygun biyolojik tanımlayıcı elementlerle birlikte afinite biyosensörleri olarak kullanılabilirler ve analit molekülünün sensör yüzeyine immobilize edilmiş biyolojik tanımlayıcı elementler tarafından yakalanmasıyla dedeksiyon yaparlar. SPR sensörlerinin performans özelliklerinden en önemlileri duyarlılık, ayırım, doğruluk, tekrarlanabilirlik ve tayin limitidir (Homola ve Piliarik, 2006).

1.3. Bir SPR Sensör Sisteminde Deney Adımları

Biomoleküler etkileşim analizlerindeki deney adımları şu şekilde sıralanabilir (URL-1, 2009):

- İmmobilizasyon: Ligandın sensör çip yüzeyine kovalent olarak bağlanması
- Bağlanma: Analitin liganda bağlanması
- Denge durumu: Bağlanma ve ayrılma oranının aynı olması
- Ayrılma: Analitin liganddan ayrılması
- Rejenerasyon: Analitin zorlamalı ayrılması

Bir SPR ölçümünde hedef bileşen ya da analit ligand tarafından yakalanır. Ligand, ölçümden önce sensör yüzeyine immobilize edilir. Ligand immobilize edilmiş çeşitli sensör yüzeyleri ticari olarak da satılmaktadır. Analit liganda bağlandığında ölçülebilir bir sinyal oluşur ve buna direk dedeksiyon adı verilir. Direk dedeksiyondaki aşamalar Şekil 5'te verilmiştir. SPR ölçümlerinde öncelikle sensör yüzeyi uygun bir tampon çözelti ile şartlandırılır. Metal yüzeyine bağlanma gerçekleşmeden önce düzgün bir baseline alınması gerekir. Bu noktada sensör yüzeyi aktif ligandı içermektedir ve hedef analitleri yakalamaya hazırdır. Analiti ya da hedef molekülü içeren çözelti sisteme verildiğinde bu moleküller yüzeye bağlanır. Aynı zamanda örneğin diğer bileşenleri de liganda seçici bir özellikte olmamalarına rağmen sensör yüzeyine bağlanabilirler. Ancak bu bağlanma spesifik değildir ve kolayca kırılabilir. Bu adımda analit molekülün adsorpsiyon kinetikleri gerçek zamanlı belirlenebilir. Sonra sensör yüzeyine tampon gönderilir ve böylece non-spesifik olarak bağlanmış bileşenler uzaklaştırılır. Biriken kütle SPR cevabından belirlenebilir. Aynı zamanda bu aşamada analitin ayrılması başlar ve bu aşamada ayrılma kinetiği incelenebilir. Son olarak analitle ligand arasındaki spesifik bağlanmayı kıran rejenerasyon çözeltisi sisteme verilir.



Şekil 5. Direk dedeksiyon aşamaları

Sensör yüzeyine bağlanma düzgün bir şekilde gerçekleştirilmişse hedef analitler kantitatif olarak uzaklaştırılırken ligand sensör yüzeyinde kalır. Aynı sensörü kullanarak yüzlerce hatta binlerce analizi yapabilmek için liganda zarar vermeyen rejenerasyon çözeltilerinin kullanılması gerekmektedir. Sistemi sonraki analize hazırlamak için sensör yüzeyinden tekrar tampon geçirilir. Rejenerasyon iyi yapılmazsa kalan birikmiş kütle baseline çizgisinin yükselmesine neden olur. SPR ölçümleri sıklıkla bağlanma prosesi kinetiğini saptamak için gerçekleştirilir. Gerçekçi sonuçlar almak için ligand immobilizasyonunun iyi yapılması gerekmektedir. Ayrıca, kinetik deneyler prosesin termodinamiği hakkında da bilgi verir.

SPR ölçümleri kinetik ve termodinamik çalışmalardan başka bir örnekteki analit konsantrasyonunun tayininde de kullanılabilirler (kantitatif analizler). Bu durumda ilk olarak analitin farklı konsantrasyonları ayrı ayrı analiz edilir. Bağlanma basamağının plato değeri analit konsantrasyonuyla artmaktadır. Kalibrasyon eğrisi; sensör cevabının (ΔR) konsantrasyona karşı grafiğe geçirilmesiyle elde edilebilir. Bir örnekteki analitin bilinmeyen konsantrasyonunu tayin ederken genellikle bir seri dilüsyon hazırlanarak ölçümler gerçekleştirilir (Schasfoort ve Tudos, 2008).

Analitin (A) sensör yüzeyinde liganda bağlanması 2 basamaklı bir olaydır. Birincisi; analit çözeltiden ayrılarak sensör çip yüzeyine transfer olur. İkincisi; analitin liganda bağlanması durumudur. Birinci basamak aynı zamanda kütle transferi olarak bilinir, konveksiyon ve difüzyon yolu ile gerçekleşir. Her iki durumun da kendine özgü sabitleri vardır. Kütle transferi katsayısı (k_m) dir ve her iki yönde de aynıdır. Çözeltiden yüzeye difüzyon, analitin liganda bağlanmasından daha yavaştır. Bağlanma ve ayrılma hız sabitleri akış hızından bağımsız olduklarında kütle transfer sınırlaması beklenmez.

Biyomoleküler interaksyon deneylerinde ilk aşama bağlanmadır. Analit ve ligand difüzyondan dolayı çarpıştıklarında ve çarpışma doğru yön ve yeterli enerjiye sahipse bağlanma gerçekleşir.

Bağlanma hızı: $[Ligand].[Analit].k_a$

Bağlanma oluştuğunda, ligand ve analit bir süre birbirlerine bağlı kalırlar.

Ayrılma hızı: $[Ligand-Analit].k_d$

Ayrılma olasılığı sürenin her anında aynıdır. Analit liganda ne kadarlık bir süre zarfında bağlı kalacağını bilemez. Dissoiasasyondan sonra ligand ve analit, bağlanmadan önceki durumlarında kalırlar. Eğer analit ya da ligand kimyasal olarak modifiye edilirse bağlanma, kütle etki yasasına uymaz.



İmmobilize ligand (B) ile analit (A) arasındaki reaksiyonun yalancı-birinci derece kinetiğine uyduğu farzedilir. Bağlanma fazında $[BA]$ kompleksi zamanın bir fonksiyonu olarak aşağıdaki eşitliğe göre artar:

$$\frac{d[BA]}{dt} = k_a \cdot [B] \cdot [A] - k_d \cdot [BA] \quad (1)$$

Bağlanma hız sabiti k_a kompleks oluşum hızı yani B ve A' nın 1 molarlık çözeltisinde sn'de oluşan BA komplekslerinin sayısıdır. k_a değeri biyolojik sistemlerde 10^3 ve 10^7 arasındadır.

Ayrılma sabiti k_d kompleksin stabilitesini tanımlar yani sn' de azalan kompleksin fraksiyonlarını ifade eder. k_d değeri biyolojik sistemlerde genellikle 10^{-1} ve 10^{-6} arasındadır

(URL-1, 2009). Rezonans sinyalindeki değişim rezonans birimi (RU) olarak ifade edilmektedir ve zamanın bir fonksiyonu olarak takip edilebilir ve bir sensogram şeklinde verilebilir. Bu verilerden analit-ligand interaksyonu belirlenebilir.

Bağlanma sabitleri aşağıda verilen denge analizi ve bağlanma kinetik analizleriyle belirlenebilir (Lin vd., 2005).

1.4. Denge Analizi (Scathard modeli)

Toplam ligand miktarı $[B]_0$ yüzeyin maksimum analit bağlama kapasitesi olarak ifade edilirse, başka bir deyişle sensör yüzeyinde kloramfenikölü bağlayan toplam bağlama bölgeleri; kütleyi molar konsantrasyona çevirmeye gerek kalmadan bütün konsantrasyon terimleri SPR sinyali R olarak ifade edilebilir. Serbest analit konsantrasyonu yalancı-birinci derece koşullarında akış hücresinde sabit tutulduğunda, bağlanma řu şekilde ifade edilebilir:

$$d\Delta R / dt = k_a C (\Delta R_{mak} - \Delta R) - k_d \Delta R \quad (2)$$

Bu eřitlikte

$d\Delta R / dt$: SPR sinyalinin değişim hızı

R : Bağlanma ile ölçülen sinyal

R_{mak} : Bağlanma ile ölçülen maksimum sinyal

C: Analit konsantrasyonu (nM)

k_a : Bağlanma hız sabiti (1/nM.s)

k_d : Ayrılma hız sabiti (1/s)

Bağlanma sabiti K_A (nM), k_a ve k_d sabitlerinin oranından hesaplanır ($K_A = k_a / k_d$).

Denge durumunda, $d\Delta R / dt = 0$ dır ve eşitlik řu şekilde yazılabilir:

$$\Delta R_{denge} / C = K_A \Delta R_{mak} - K_A \Delta R_{denge} \quad (3)$$

Bağlanma sabiti K_A , $\Delta R_{\text{denge}} / C$ ' nin ΔR_{denge} ' ye karşı grafiğe geçirilmesiyle ve ayrılma sabiti K_D ise $1 / K_A$ ' dan hesaplanabilir.

1.5. Bağlanma Kinetik Analizi

(1) eşitliği yeniden düzenlendiğinde

$$d\Delta R/dt = k_a C \Delta R_{\text{maks}} - (k_a C + k_d) \Delta R \quad (4)$$

eşitliği elde edilir. Buna göre $d\Delta R/dt$ ' nin ΔR ' ye karşı çizilen grafiğinin eğimi $-(k_a C + k_d)$ olur. Başlangıç bağlanma hızı analit konsantrasyonuyla direkt orantılıdır ve konsantrasyon ölçümlerinde kullanılabilir. R_{maks} değeri bilinirse k_a ve k_d değerleri, tek bir bağlanma sensogramından hesaplanabilir. Bununla birlikte yüzeyi tamamen doymun hale getirmek için yüksek konsantrasyonlarda analite gereksinim olduğundan R_{maks} değerini deneysel olarak hesaplamak zordur. Tercih edilen yaklaşım, birkaç farklı analit konsantrasyonunda bağlanma sensogramlarının alınmasıdır. İleri ve geri yöndeki hızların analizi için $d\Delta R/dt$ 'ye karşı ΔR grafiğe geçirilir ve bu grafiğin eğimi olan S değeri ileri ve geri yöndeki hız sabitleriyle ilişkilidir:

$$S = k_a C + k_d \quad (5)$$

S ' ye karşı C grafiği çizildiğinde eğimi k_a olan bir doğru çıkar. Teorikte y eksenini kestiği nokta k_d değerini verir. Ancak $k_a C \gg k_d$ ise ayrılma sabiti olan k_d değerinin hesaplanması için bu yöntem güvenilir değildir. Daha güvenilir olan yöntem ayrılma kineriğinin incelenmesidir.

$$\ln(\Delta R_0 / \Delta R_t) = k_d (t - t_0) \quad (6)$$

ΔR_0 , t_0 anında ve ΔR_t ise t anında ayrılma eğrisinden elde edilen SPR sinyal değerlerini verir (Lin vd., 2005).

1.6. Denge İzoterm Modelleri

Adsorbsiyon olayı, maddenin ara yüzeyinde bulunan moleküller arasındaki kuvvetlerin dengelenmemiş olmasından ve Van der Waals kuvvetlerinden ileri gelmektedir. Adsorpsiyon, fiziksel ve kimyasal adsorpsiyon olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Fiziksel adsorbsiyonda adsorbant ve adsorbent arasındaki etkileşme zayıftır. Bu tür etkileşmeler Van der Waals türü etkileşmeler olarak ifade edilmektedir. Kimyasal adsorbsiyon ise kimyasal bağların oluşumundan kaynaklanmaktadır. Çeşitli etkenlere bağlı olan adsorpsiyon olaylarındaki davranışlar, adsorpsiyon izotermi olarak adlandırılan bağıntılarla ifade edilmektedir. Sabit sıcaklıkta adsorbant tarafından adsorplanan madde miktarı ile denge basıncı veya konsantrasyonu arasındaki bağıntıya adsorbsiyon izotermi denilmektedir. Adsorplanan ve adsorplayıcı maddelerin özelliklerine göre bir adsorpsiyon, Freundlich izotermi, Langmuir izotermi, BET (Brunauer-Emmett-Teller) denklemi, Polonyi denklemi, Sygin-Frumkin denklemi, Hill denklemi, Temkin denklemi, Fowler denklemi, Harkins-Jura (HJ) denklemi gibi eşitliklerden biri ya da birkaçına uygunluk göstermektedir (URL-4, 2010).

1.6.1. Langmuir Modeli

Langmuir modeli; adsorbentin yüzeyinde adsorpsiyon olayı için aktif merkezlerin olduğunu ve her bir aktif noktanın sadece bir molekül adsorblayabileceğini kabul eder. Böylece adsorbent yüzeyinde meydana gelen adsorbant tabakası bir molekül kalınlığındadır. Ayrıca adsorbent yüzeyindeki tüm aktif noktaların adsorbant moleküllerine karşı aynı ilgiye sahip olduğunu ve adsorplanmış adsorbant molekülleri arasında etkileşim olmadığını kabul eder.

Langmuir izoterminde adsorpsiyon olayı; adsorbantın başlangıç konsantrasyonu ile doğrusal olarak artar. Maksimum doygunluk konsantrasyonunda yüzey, adsorbantın tek tabakası ile kaplanmakta ve yüzeye adsorbe olmuş adsorbant molekülleri hareketsiz kalmaktadır. Ayrıca adsorpsiyon enerjisi sabittir (URL-5, 2010). Bütün interaksiyonların enerjistik olarak eşit olduğunu varsayan Langmuir modeli denge sabitlerinin hesaplanmasında sıklıkla kullanılmaktadır (Sandblad vd., 2009).

1.6.2. Freundlich Modeli

Heterojen yüzey enerjileri için özel bir durumu ifade eden Freundlich modelinin doğrusallaştırılmış şekli kullanılarak adsorpsiyon sabitleri bulunabilmektedir. Bu modelde analit derişimi arttıkça dengede adsorplanan miktarların arttığı, heterojen yüzeylerdeki adsorpsiyonu ifade eden daha gerçekçi bir modeldir. Hem Langmuir hem de Freundlich modeli çalışılan derişim aralığına bağlı olarak deneysel denge değerlerinin değerlendirilmesinde kullanılabilmektedir (Yener, 1999). Freundlich modelinde, adsorbe edilen moleküllerle yüzey adsorpsiyon bölgeleri arasında moleküller arası interaksyonlar vardır (Matharu vd., 2009). Freundlich izotermi genellikle sıvılardan adsorpsiyon durumlarına daha uygundur (Oubagaranadin vd., 2007).

1.6.3. Langmuir-Freundlich (LF) Modeli

Bu model Langmuir modelinde olduğu gibi bazı temel adsorpsiyon kavramları ile Freundlich modelindeki adsorpsiyonda heterojeniteyi ele almaktadır. Langmuir-Freundlich modeli, düşük analit konsantrasyonlarında Freundlich eşitliği, yüksek analit konsantrasyonlarında ise Langmuir eşitliği gibi davranır (Etemadi ve Yen., 2007). LF modeli, çözeltideki bağlanan kalıp molekülün konsantrasyonu ile denge kalıp molekülü konsantrasyonu arasındaki denge ilişkisini açıklamaktadır (Garcia-Calzon ve Diaz-Garcia, 2007) . LF izotermi bir çok heterojen sistemin örneğin; gazların yüzeylere adsorpsiyonu, ligandın poliklonal antikorlara afinitesi ve metal iyonlarının çevresel örneklere adsorpsiyonu gibi davranışların modellenmesinde başarıyla kullanılmaktadır. Ayrıca LF bağlanma modeli hem homojen hem de heterojen bağlama yüzeylerinin modellenmesinde kullanılmaktadır (Umpleby vd., 2001) .

1.7. SPR Uygulamaları ve Gıda Güvenliği Örnekleri

SPR tabanlı biyosensörler, biyomoleküllerin interaksiyonunu işaretlemeye gerek duymadan ölçmektedirler ve bu özelliklerinden dolayı moleküler interaksiyonların karakterizasyonunda önemli birer araçtır. İnteraksiyonları gerçek zamanlı vermeleri kinetik parametrelerin, termodinamiklerin, konsantrasyonun, ligand ve analit arasındaki

ilişkileri kalitatif olarak belirlenmesine olanak sağlamaktadır (Navratilova ve Myszka, 2006).

Protein bağlanması (Ahmad, 2003), bağlanma/ayrılma kinetikleri, afinite sabitleri, gıda analizleri (Spadavecchia, 2005; Homola vd., 2005), klinik teşhis, proteomiks, çevresel izleme, bakteriyoloji, viroloji, hücre biyolojisi, ilaç keşifleri gibi alanlarda SPR sistemlerinden yararlanılmaktadır (Shankaran, 2007). SPR biyosensörler; organik ve inorganik kimyasallar, mikrobiyal patojenler ve toksinler gibi çevresel risk oluşturan kimyasal ve biyolojik kontaminantların tayininde kullanılmaktadırlar. Çevresel risk oluşturan organik kontaminantlar pestisitler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), poliklorlanmış bifeniller (PCB), fenoller, dioksinler ve inorganik kontaminantlar ise ağır metallerdir (Dostálek ve Homola, 2006). Son yıllarda SPR biyosensörler, gıdalardaki kalıntı ve kontaminantların tayininde duyarlılık, çok yönlülük, sağlamlık, hız ve nispeten az maliyetli test olma gibi özelliklerinden dolayı oldukça popüler hale gelmişlerdir. Teşhis elementi olarak antikor kullanan biyosensörlere immunosensör adı verilir. Tipik bir SPR-immunosensör uygulamasında, antijenler sensör yüzeyine immobilize edilir ve bu antijenlerin spesifik antikorlarla etkileşimi ortamın refraktif indisini değiştirir. SPR algılama sisteminin geleneksel ELISA yöntemine üstünlükleri vardır. Çünkü analitik uygulamaları direkt ve işaretlemeye gerek göstermemektedir. Eş zamanlı otomatik tanıma sağlayan SPR ile çok sayıda analizi yapmak mümkündür ve ELISA' dan daha kısa sürede analiz yapılabilir (Petz, 2009). Hepatit B yüzey antikoruna baskılanmış SPR çipinin insan serumunda Hepatit B antikorunun teşhisinde kullanılabileceği belirtilmiştir (Uzun vd., 2009).

SPR biyosensörler, küçük analitlerin, örneğin; simazine, atrazine, morphine, theophylline, fumonisin B₁ teşhisinde kullanılmaktadırlar (Homola, 2003).

Gıda endüstrisinde, hammadde toplama işlemi dahil proses, depolama, taşıma ve tüketiciye ulaşıncaya kadar birçok aşamada basit, hızlı ve otomatik analitik sistemlere gereksinimi vardır. Gıda ürünlerinin kalite, hijyenik koşullar ve saflığının korunması için küçük moleküler organik bileşenler, fungal metabolitler, mikroorganizmalar gibi spesifik analitlerin tayin edilmesi gerekmektedir. Günümüzde HPLC ve kütle spektrometresi ya da spesifik enzimatik metodlar geniş kullanım alanına sahiptirler ancak hâlâ zahmetli, pahalı, zaman alıcı ve uzun hazırlık aşamaları gibi sebeplerden dolayı dezavantajları vardır. Biyosensörler pestisit ya da herbisit içeren ürünler, süt ürünleri, et ve balık gibi ürünlerde bulunan veteriner ilaçları, gıda koruyucuları, katkı maddeleri gibi analitlerin tayininde

kullanılmaktadırlar. Gıda kalitesiyle ilgili birçok küçük moleküler bileşiklerin tayininde indirekt yarışmalı immunoreaksiyon prensibine dayanan SPR immunosensörler yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Deniz ürünlerinde rastlanan domoic asit, 0.5 ppb düzeyinde, toksik fungal bir metabolit olan deoxynivalenol 2.5 ppb, bebek formülasyonlarında, atletikler için hazırlanan karışımlarda ve meyve içeceklerinde geniş kullanım alanı olan folik asit oldukça düşük düzeylerde tespit edilebilmektedir (Shankaran, 2007). Sialik asit tayininde moleküler baskılanmış polimerle kaplı SPR sensör kullanılmıştır (Kugimiya ve Takeuchi, 2001).

SPR kullanımıyla sütte *Salmonella* hızlı ve basit bir şekilde tespit edilmiştir (Mazumdar vd., 2007). Kloramfenikolün gıda matrislerinde hızlı ve duyarlı bir şekilde tayin edilmesi amacıyla yüzey rejenerasyonuna gereksinim göstermeyen SPR çalışmaları yapılmıştır (Yua vd., 2009). Moleküler baskılama tekniği kullanılarak lizozim-seçici SPR sensör çipler geliştirilmiştir (Matsunaga vd., 2007). Çoklu kanallara sahip SPR sensörü kullanılarak elma suyunda *E.coli* 0157:H7, *S. chloeraesuis* serotip typhimurium, *Listeria monocytogenes* ve *C. jejuni* bakterilerinin tayini seçici olarak gerçekleştirilmiştir (Taylor vd., 2006). SPR kullanılarak karides örneklerinde fenol grubu antibiyotik kalıntılarının tayini hızlı ve duyarlı bir şekilde yapılmıştır (Dumonta, 2007). Botulinum nörotoksinleri ve stafilocok enterotoksinleri; mikotoksinlerden fumonisin, deoxynivalenol ve aflatoksin tayinlerinde SPR sensörlerinden yararlanılmıştır (Ladd ve Jiang, 2006).

1.8. Biyolojik Tanıma Elementleri Olarak Kullanılabilecek Ligandlar

Spesifik olmayan bağlanmaları minimize etmek ve spesifik immobilizasyon için reaktif grupları sisteme katmak amacıyla immobilizasyondan önce metali kaplama yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yaklaşımlardan en başarılı olanı metal yüzey üzerinde tiol veya disülfid moleküllerinin kendiliğinden oluşturulmasıdır (SAM: Self Assembled Monolayer). Kararlı SAM, metal ile sülfürün etkileşimi ve van der Waals kuvvetleri ile meydana gelir. Böylece farklı molekülleri analiz etme imkânı ortaya çıkar. Yüzeyi hidrofilik yapmak için dekstran bazlı, ince hidrojel benzeri polimerler geliştirilmiştir. Bu hidrojel benzeri tabaka yüzeyi hidrofilik yapmaktadır. Dekstran polimer, proteinlerin kovalent immobilizasyonuna uygundur ve metal yüzey ile karşılaştırıldığında, ligand bağlama oranı birkaç kat daha yüksektir. Ligandın kovalent immobilizasyonu ile yüzey ve ligand arasında güçlü bir etkileşim kurulur. Bu tür bağlanmanın en büyük avantajlarından

birisi, hemen hemen her protein için uygulanabilmesidir. Fakat iki önemli dezavantajı vardır. Birincisi; kovalent immobilizasyonu ile yüzeye bağlanan moleküllerin rejenerasyonu çok zordur. İkincisi; bu tür bağlanma ile analitin reseptör moleküllere tutunması güçleşir. Eğer ligand, yüzeye bağlanma koşullarında kararlı değil ve bu koşullarda aktif bölge zarar görüyorsa, ligandın kovalent olmayan (hidrojen bağları, van der Waals kuvvetleri) etkileşimlerle immobilizasyonu mümkündür. Hidrofobik etkileşimlerle ligand bağlanması yönteminde yağlar kullanılmaktadır. Bu yöntem hücre zarı ile ilgili proteinlerin immobilizasyonunda kullanılmaktadır (Löfås S ve McWhirter, 2006).

Biyosensörlerde kullanılan biyolojik tanıma elementlerindeki iki önemli özellik, afinite ve seçiciliktir. Ligand değerlendirmesinde en önemli faktörlerden bir tanesi ligandın bağlama afinitesini tayin eden ligand ayrılma sabitidir (K_D). Spesifiteleri, çok yönlülükleri, antijene güçlü ve stabil bir şekilde bağlanmaları sebebiyle antikorlar tanıma elementi olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar. Ancak antikorların heterojeniteleri bağlanmada değişimlere ve yetersiz spesifiteye neden olmaktadır. Ayrıca antikorların raf ömürleri sınırlıdır ve depolamada sıcaklık önemlidir.

Antikorlar en iyi doğal ligandlardır çünkü yüksek afiniteye sahiptirler ve ayrılma sabitleri (K_D) 10^{-9} düzeyindedir. Fakat antikorları büyük miktarlarda üretmek mümkün değildir çünkü ya canlı bir hayvan konakçıya ya da hücre kültürüne gereksinim vardır. Diğer biyolojik tanıma elementleri; enzimler, reseptör proteinler, peptitler, DNA sekanslar, hücreler, moleküler baskılanmış polimerler ve aptamerlerdir. Protein ligandların son zamanlardaki gelişimindeki en büyük dezavantaj ise bu ligandların K_D değerlerinin (10^{-6} - 10^{-7} M) düşük olmasıdır (Petz, 2009).

1.9. Moleküler Baskılama Teknolojisinin Tarihçesi

Moleküler baskılama yeni bir bilim alanı değildir ve baskılamayla ilgili en eski raporlar 1930'lara uzanmaktadır. Bu tarihlerde M.V Polyakov bir seri silika jel hazırlamış ve bu jelleri bir solvent varlığında hazırladığında silikanın bu solvente tercihi olarak bağlandığını gözlemlemiştir. Polyakov 1950' lere kadar bu çalışmayla uğraşmasına rağmen bulguları nadir olarak Doğu Avrupa'nın dışına çıkmıştır. Silikanın kullanıldığı sonraki çalışma daha çok etkili olmuştur. 1949' larda Linus Pauling, Frank Dickey' in içinde bulunduğu grup, boya varlığında hazırladıkları silika jellerle ilgili deney sonuçlarını

yayınlanmışlardır. Dickey, boya şablonu uzaklaştırıldıktan sonra silikanın diğer boyaların varlığında aynı boyayı tekrar bağladığını görmüştür. Silika baskılama 1950 ve 1960’larda da devam etmiş ancak bu alandaki yayın sayısı sınırlı kalmıştır. Bununla birlikte, 1972’ de Guenter Wulf grubu moleküler baskılanmış organik polimeri başarıyla hazırladıklarını açıkladıklarında moleküler baskılama alanında kademe sayılabilecek bir değişim gerçekleşmiştir. Wulf, gliserik asitin enantiyomerlerini ayırt edebilecek kapasiteye sahip moleküler baskılanmış organik polimeri günümüzde kovalent yaklaşım olarak adlandırılan yöntemle hazırlamıştır. 1981’ de Mosbach ve Arshady kovalent olmayan yaklaşımı kullanarak organik moleküler baskılanmış polimerler hazırladıklarını bildirmişlerdir. Kovalent olmayan yaklaşım, 1990’larda moleküler baskılamada patlamayı başlatmıştır. Günümüzde ise hem kovalent hem de kovalent olmayan yaklaşım halen tartışılmaktadır. Ancak, her iki yaklaşımın da artı ve eksileri olduğu kabul edilmektedir. 1995’ te Whitcombe ve arkadaşları her iki yöntemin avantajlarını birleştiren orta bir yaklaşım geliştirmişlerdir. Bu yaklaşım, polimerizasyon basamağında kovalent interaksyona, yeniden bağlanma aşamasında ise kovalent olmayan interaksyonlara dayanmaktadır. Kovalent olmayan yaklaşım, moleküler baskılanmış polimer sentezinde halen en yaygın kullanılan yaklaşımdır. Bu yöntemin birkaç dezavantajı; monomer-kalıp molekül oranlarının stokiometrik olarak ayarlanmasıyla giderilebilir (Sellergren ve Allender, 2005).

1.10. Moleküler Baskılama

Moleküler baskılama, hedef moleküle yüksek spesifite gösteren materyallerin sentezinde kullanılan gelişen bir teknoloji dalıdır (Lok ve Son, 2009).

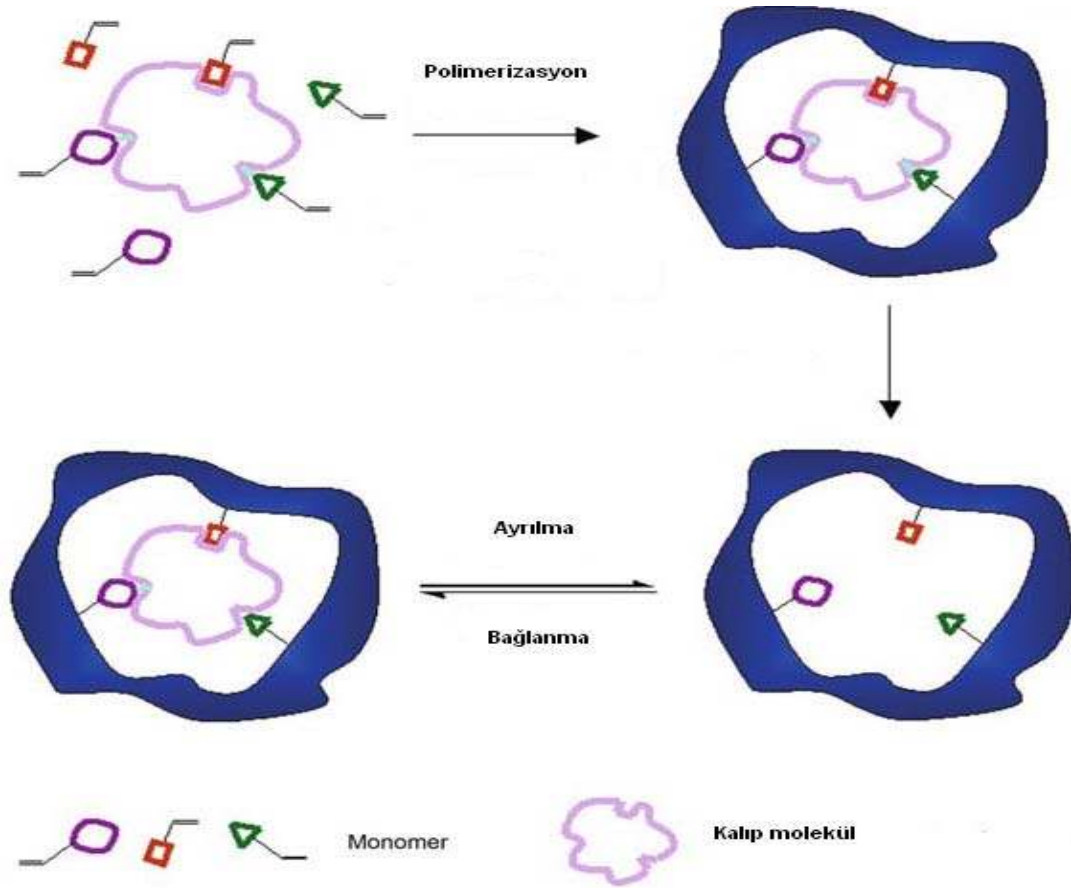
Moleküler baskılama tekniği, sentetik polimer matriksinde kalıp moleküle fonksiyonel ve yapısal olarak komplementer boşlukların oluşmasından ibaret olan bir tekniktir (Nicholls ve Rosengren, 2002; Widstrand vd., 2010; Sellergren ve Allender, 2005; Kindschy ve Alocilja, 2005; Mayes ve Mosbach, 1997).

Moleküler baskılama işlemleri üç basamaktan oluşmaktadır:

1. Fonksiyonel monomer ile kalıp molekül arasında kovalent ya da kovalent olmayan kompleks oluşumu (Ön kompleks oluşumu): Bu aşamada fonksiyonel monomer ve kalıp molekül, kovalent ya da kovalent olmayan interaksyonlarla birbirine bağlanır.

2. Polimerizasyon: Polimerizasyon aşamasında, bu konjugatların yapıları polimerin üç boyutlu ağında dondurulur. Fonksiyonel monomeren gelen fonksiyonel kısımlar kalıp moleküle topoğrafik olarak komplementerdir.

3. Kalıp molekülün polimerden uzaklaştırılması: Üçüncü aşamada, kalıp molekülleri polimerden uzaklaştırılmaktadır. Böylece polimerde kalıp molekülce zapt edilen kısımlar boşluk olarak kalmaktadır. Uygun koşullarda, bu boşluklar kalıp molekülün boyut, yapı ve diğer fizikokimyasal özelliklerini hatırlar ve molekülü ya da analogunu etkili ve seçici olarak bağlar (Komiya vd., 2003). Moleküler baskılamadaki adımlar Şekil 6’da verilmiştir (Xu vd., 2009).



Şekil 6. Moleküler baskılanmış polimerin hazırlanma adımları

1.11. Moleküler Baskılama Çeşitleri

1.11.1. Kovalent Baskılama

Polimerizasyon öncesi fonksiyonel monomer ve kalıp molekül birbirlerine kovalent

bağla bağlanırlar. Sonrasında bu kovalent konjugat, kovalent bağlanmanın tam olarak gerçekleştiği koşullarda polimerize olur. Polimerizasyondan sonra kovalent bağ kırılmakta ve kalıp molekül polimerden uzaklaştırılmaktadır. Kalıp molekül baskılanmış molekülle tekrar etkileşime bırakıldığında kovalent bağ tekrar oluşmaktadır (Komiya vd., 2003).

1.11.2. Kovalent Olmayan Baskılama

Kovalent olmayan baskılamada; fonksiyonel monomer ile kalıp molekül arasında hidrojen bağı, elektrostatik interaksiyon ve koordinasyon bağı olarak adlandırılan kovalent olmayan interaksiyonlar kullanılmaktadır (Komiya vd., 2003; Mosbach ve Ramström, 1996) ve monomer-kalıp molekül arasındaki interaksiyon kolayca sağlanmaktadır (Spivak, 2005). Polimerizasyon basamağından sonra uygun solventin kullanılmasıyla kalıp molekül polimerden ekstrakte edilerek uzaklaştırılmaktadır.

1.12. Kovalent ve Kovalent Olmayan Baskılamanın Avantaj ve Dezavantajları

Genellikle kovalent olmayan baskılama kolaydır ve geniş bir kalıp molekül spektrumuna uygulanabilir özelliktedir. Baskılamanın sıklığı bakımından kovalent baskılama genellikle daha üstündür. İhtiyaca ve gerçekleştirilecek işlemin özelliğine göre örneğin; hedef bileşik, istenen seçicilik, maliyet ve hazırlama aşaması için kabul edilebilir süre gibi, bu iki metottan biri seçilebilir.

Kovalent baskılamanın avantajları:

- Monomer-kalıp molekül konjugatları kararlı ve stokiyometriktir. Böylece moleküler baskılama prosesi nispeten daha düzgündür.

- Konjugatlar kovalent bağlarla oluşturulduğu ve yeterince kararlı oldukları için yüksek sıcaklık, yüksek ya da düşük pH, yüksek polariteye sahip solvent gibi çok çeşitli polimerizasyon koşulları kullanılabilir.

Kovalent baskılamanın dezavantajları:

- Monomer-kalıp molekül konjugatlarının sentezlenmesi genellikle zor ve çok ekonomik değildir.

- Tersinir kovalent bağ sayısı sınırlıdır.

-Kalıp molekülün polimerden uzaklaştırılması aşamasında baskılamanın etkinliği bazı durumlarda azalmaktadır.

-Kovalent bağın oluşması ve kırılması söz konusu olduğu için kalıp molekülün bağlanması ve serbest kalması yavaştır.

Kovalent olmayan baskılamanın avantajları:

-Kovalent monomer-kalıp molekül konjugatlarının sentezlenmesine gerek yoktur.

-Kalıp molekül polimere kovalent olmayan bağlarla zayıf bir şekilde bağlandığı için polimerden kolaylıkla uzaklaştırılabilir.

-Kalıp molekülün bağlanması ve serbest kalması hızlı olduğu için avantajlıdır.

Kovalent olmayan baskılamanın dezavantajları:

-Monomer-kalıp molekül bağı labil olup stokiyometrik olmadığı için baskılama prosesi daha az düzgündür.

-Kovalent olmayan bağların oluşumunu maksimize etmek için polimerizasyon koşullarının çok dikkatli seçilmesi gerekir.

-Bağ oluşumunda denge değişimini sağlamak için fonksiyonel monomer çok kullanılmakta ve bu da spesifik olmayan bağların oluşumuna neden olarak seçici bağlanmayı azaltmaktadır (Komiya vd., 2003).

1.13. Moleküler Baskılamada Kullanılan Materyaller

Kullanılan reaktifler 1) Fonksiyonel monomerler 2) Çapraz bağlayıcılar 3) Polimerizasyon için çözücüler 4) Başlatıcılar 5) Kalıp molekül

1.13.1. Fonksiyonel Monomerler

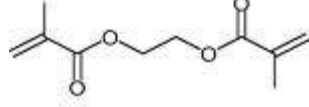
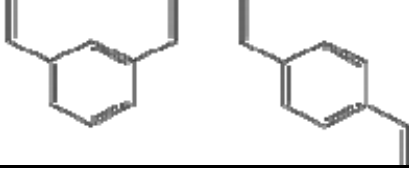
Fonksiyonel monomerler, baskılanmış bağlama bölgelerinde bağlama interaksyonlarından sorumludurlar ve kovalent olmayan moleküler baskılama protokolüne göre fonksiyonel monomerler, kalıp molekülün mol sayısından çok fazla sayıda kullanılmalıdır ki kalıp molekül-fonksiyonel monomer bağlanması gerçekleşsin. Kovalent olmayan baskılamada kalıp molekül/fonksiyonel monomer oranı 1:4 ya da daha fazladır. Kalıp molekül ile fonksiyonel monomer fonksiyonelliklerinin birbirlerini tamamlaması gerekmektedir (Örneğin; hidrojen bağı vericisi hidrojen bağı alıcısıyla eşleşir) ki kompleks oluşumu maksimize ve baskılama etkin olsun. İki ya da daha fazla

monomer kokteyl polimerizasyonunda aynı anda kullanıldıklarında kopolimerizasyonun uygunluğunun sağlanmasında bu monomerlerin reaktivite oranlarına dikkat edilmesi gerekir (Chetanworld, 2010). Kovalent baskılamada, kalıp molekül vinil gruplarına kovalent olarak bağlanır. Monomer olarak genellikle akrilik ya da metakrilik asitin ester ve amidleri kullanılmaktadır. Kovalent olmayan baskılamada uygun fonksiyonel grupları taşıyan vinil monomerleri sentezlenmektedir. Ayrıca birçok fonksiyonel monomeri ticari olarak bulmak da mümkündür. Ticari monomerler genellikle inhibitör ya da stabilizör içerdikleri için kullanılmadan önce distile edilmeleri gerekmektedir (Komiya vd., 2003).

1.13.2. Çapraz Bağlayıcılar

Çapraz bağlayıcılar, baskılanmış polimerde üç önemli fonksiyonu yerine getirmektedirler. 1) Çapraz bağlayıcı, polimer matriksinin morfolojisini (jel tipi, makro gözenekli ya da mikrojel toz formda olup olmaması gibi özelliklerini) kontrol etme açısından önemlidir. 2) Baskılanmış bağlanma bölgelerini stabilize eder. 3) Polimer matriksine mekanik kararlılık verir. Polimerizasyon açısından bakıldığında kalıcı gözenekli materyal elde etmek ve yeterli mekanik stabiliteye sahip polimer elde etmek için genellikle yüksek çapraz bağlayıcı oranları tercih edilmektedir. % 80 ve daha üzerindeki çapraz bağlayıcı oranları sıklıkla kullanılmaktadır. Moleküler baskılamaya uygun birçok çapraz bağlayıcı vardır. Etkin bir baskılama için, çapraz bağlayıcılarla fonksiyonel monomer uyumlu olmalıdırlar (Cormack ve Elorza, 2004). Aksi takdirde fonksiyonel monomer ya da çapraz bağlayıcıdan biri baskın çıkar ve kopolimerizasyon etkin bir şekilde gerçekleşmez. Uygun bir çapraz bağlayıcı ajanın seçimiyle rasgele kopolimerizasyon başarılı bir şekilde gerçekleşir ve fonksiyonel monomerden gelen fonksiyonel gruplar polimer ağında uniform bir şekilde dağılır. Çapraz bağlayıcının fonksiyonel monomere mol oranı da önemlidir. Çapraz bağlayıcı/fonksiyonel monomer oranı çok küçükse kalıp molekülün bağlama grupları birbirlerine o kadar yaklaşırlar ki birbirlerinden bağımsız hareket edemezler. Kalıp molekülün bağlama bölgeleri yakınındaki bağlama bölgelerini komple inhibe eder. Çapraz bağlayıcı/fonksiyonel monomer mol oranı çok büyükse, özellikle çapraz bağlayıcı fonksiyonel monomer ve/veya kalıp molekülle kovalent olmayan interaksyona girdiğinde baskılama etkinliği zarar görür. En sık kullanılan çapraz bağlayıcılar; etilen glikol dimetakrilat (EDMA) ve divinilbenzendir DVB) (Tablo 1) (Komiya vd., 2003).

Tablo 1. Çapraz bağlayıcılar

Etilen glikol dimetakrilat (EDMA)	
Divinylbenzene (DVB)	

1.13.3. Çözücüler

Çözücüler, polimerizasyon sırasında kalıp molekül, fonksiyonel monomerler, çapraz bağlayıcı ve başlatıcı olarak adlandırılan bileşenleri tek fazda tutarlar. Diğer önemli fonksiyonları ise makro gözenekli polimerlerde porları oluşturmalarıdır. Bu nedenle solventler porojen olarak da adlandırılırlar. Kalıp molekülün polimerden ayrılması porozite sayesinde olmaktadır. Termodinamik olarak iyi bir çözücü seçildiğinde daha çok spesifik yüzey alanları oluşur. Porojen hacminin artması por hacmini arttırmaktadır. Çözücüler ayrıca kovalent olmayan baskılamada kalıp molekül-fonksiyonel monomer arasındaki kompleks oluşum olasılığını da arttırmaktadırlar (Cormack ve Elorza, 2004). Çözücü seçimi baskılama türüne bağlıdır. Kovalent baskılamada, bileşenleri çözdükleri sürece birçok solvent kullanılabilir. Kovalent olmayan baskılamada, fonksiyonel monomer-kalıp molekül arasında bağ oluşumunu gerçekleştirme ve baskılama verimini artırma bakımından çözücü seçimi daha önemlidir. En yaygın kullanılan solvent birçok monomeri ve kalıp molekülü çözdüğü ve hidrojen bağı oluşumunu hiç engellemediği için kloroformdur.

Solvent kullanılmadan hazırlanan polimerler sert ve yoğun olurlar ve hemen hemen kalıp molekülü hiç bağlamazlar. Çözücüler ayrıca polimerizasyon sırasında oluşan reaksiyon ısını dağıtarak ısıyı emenler. Aksi takdirde reaksiyon karışımının sıcaklığı bölgesel olarak yükselir ve istenmeyen yan reaksiyonlar oluşur (Komiya vd., 2003).

1.13.4. Başlatıcılar

Farklı özelliklere sahip birçok kimyasal başlatıcı serbest radikal polimerizasyonunda radikal kaynak olarak kullanılmaktadır. Kovalent olmayan baskılamada yaygın olarak kullanılan başlatıcılar: 2,2'-azobis(izobütironitril) (AIBN), 2,2'-azobis(2,4 dimetilvaleronitril) (ADVN), benzoilperoksit, 4,4'-azo(4-siyanovalerik asit).

Başlatıcılar monomerlerle karşılaştırıldıklarında genellikle düşük miktarlarda kullanılmaktadırlar. Başlatıcıların radikallere dekompozisyonu kimyasal yapısına bağlı olarak ısı, ışık, kimyasal, elektrokimyasal yollarla gerçekleştirilebilir. Örneğin; AIBN ultraviyole ile kolaylıkla bozunur, termal ya da fotokimyasal koşullarda metilmetakrilatı polimetilmetakrilata dönüştürür. Oksijen serbest radikal polimerizasyonunu geciktirdiği için çözünmüş oksijenin monomer çözeltisinden hemen uzaklaştırılması gerekir. Oksijenin uzaklaştırılması ultrasonikasyonla ya da monomer çözeltisine inert gazlardan argon ya da azot gazı püskürtülmesiyle gerçekleştirilebilir (Yan ve Row, 2006).

1.13.5. Kalıp Molekül

Bütün moleküler baskılama işlemlerinde kalıp molekül çok büyük önem taşımaktadır ve fonksiyonel monomerdeki fonksiyonel grupların organizasyonunu kontrol eder. Ancak birçok sebeplerden dolayı her kalıp molekül direkt olarak baskılamaya uygun değildir. Serbest radikal polimerizasyonuna uyumluluk açısından kalıp molekülün polimerizasyon koşullarında kimyasal olarak inert olması gerekmektedir. Kalıp molekül radikal reaksiyonlarına katılıyorsa ya da polimerizasyon koşullarında kararsızsa alternatif baskılama stratejileri geliştirilmelidir. İlaçlar, pestisitler, amino asitler ve peptidler, nükleotid bazları, steroidler ve şekerler gibi küçük organik moleküllerin baskılanması artık kolaylıkla ve rutin bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir. Protein, hücre gibi büyük organik moleküller için spesifik protokoller olmasına rağmen bu büyüklükteki moleküllerin baskılanması hâla zordur. Bunun sebebi, büyük kalıp moleküller daha az rijittirler ve baskılama sırasında belirgin kavite oluşumunu zorlaştırırlar. Ayrıca protein gibi sekonder ve tersiyer yapıya sahip büyük moleküllerin yapıları termal ya da fotolitik işlemlerden etkilenebilirler. Peptit ya da protein gibi büyük moleküller bağlanma ceplerine rahatlıkla giremedikleri için tekrar bağlanmaları da zordur (Yan ve Row, 2006).

Kalıp molekül seçimi yapılırken şu soruların sorulması gerekir:

1. Kalıp molekül polimerize olabilecek herhangi bir grup taşıyor mu?
2. Kalıp molekül, serbest radikal polimerizasyonunu inhibe edecek ya da geciktirecek thiol ya da hydroquinone gibi fonksiyonel gruplar taşıyor mu?
3. Kalıp molekül, orta derecede yüksek sıcaklıklarda ya da UV ışımasına maruz kaldığında kararlı mı? (Chetanworld, 2010)

1.14. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Uygulama Alanları

Moleküler baskılama; kromatografi alanında (Ansell vd., 1996; Spivak vd., 1997; Kriz vd., 1994; Baggiani vd., 2000; Lei ve Tan, 2002; Matsui, 2002; Schweitz, 1998), enzimatik katalizlerde ve mimiklerde (Wulf, 2002; Cormack ve Mosbach, 1999; Wulff, 2002; Lele vd., 1999; Motherwell, 2001), katı-faz ekstraksiyonunda (Lanza ve Sellergren, 2001; Masque vd., 2001; Mahony vd., 2005; Schirmer ve Meisel, 2008; Ersöz vd., 2008; Jiang vd., 2001; Takeuchi, T., ve Haginaka, J., 1999; Schirmer, ve Meisel, 2009), antikor/immünolojik çalışmalarda (Ye ve Mosbach, 2001; Piletsky vd., 2001; Haupt ve Mosbach, 1998; Lavignac vd., 2004), MIP esaslı sensörlerde (Haupt ve Mosbach, 2000; Kriz vd., 1997; Wang vd., 2008; Yano ve Karube, 1999) kullanılmaktadır.

Moleküler baskılamanın en çok kullanıldığı alan, seperasyondur ve özellikle rasemik karışımların kiral ayırımında sıkça kullanılmaktadır. Geleneksel kromatografi kullanımlarından başka ince tabaka kromatografisinde de kullanılmaktadır. Seperasyon alanındaki başka bir kullanımı ise kapiler elektroforezdir (Haupt ve Mosbach, 1998).

Baskılanmış polimerlerin katalizör olarak kullanıldığı uygulamalar için geliştirilmiş baskılanmış polimerlere “plastik enzim” denilmektedir. Plastik enzim hedef molekülü tanır ve ona bağlanarak kimyasal tepkimenin aktivasyon enerjisini düşürür; böylece tepkimenin daha hızlı, daha düşük sıcaklıkta ve daha verimli bir şekilde gerçekleşmesini sağlar. Hidrojen florürün bir molekülden ayrıldığı tepkimeyi katalizleyen bir plastik enzim üretilmiştir. Enzimler, yüksek sıcaklık ve organik çözücüler içinde denatüre olur ve işlevlerini yitirirler. Ancak enzimlerin plastik taklitleri organik çözücüler içinde oldukça geniş bir pH aralığında ve yüksek sıcaklıklarda özelliklerini kaybetmeksizin güvenle kullanılabilirler (Gümüşderelioğlu, 2010).

Kafeinin kalıp molekül olarak kullanıldığı moleküler baskılanmış polimer, katı faz ekstraksiyonunda kullanılmış ve bu yöntemle kafein içeceklerden ve insan plazmasından direkt olarak ekstrakte edilmiştir (Theodoridis ve Manesiotis, 2002). Kovalent olmayan

baskılama yöntemiyle quersetin bileşiği baskılanmış ve katı faz ekstraksiyonunda başarıyla kullanılmıştır (Weiss vd.,2002).

İmmunolojik çalışmalarda baskılanmış polimerler antikorlarla yer değiştirebilmektedirler. Moleküler baskılanmış polimerler bir bakıma antikorlardan çok farklılardır ancak ortak birçok yönleri vardır. Moleküler baskılanmış polimerler, antikorlardan daha büyük, rijit ve çözünmez yapıdadırlar fakat doğal reseptör olma ve hedef moleküle spesifik olarak bağlanabilme özellikleri oldukça önemlidir. Günümüzde antikorların çözünür formda kullanıldıkları immunodifüzyon, immunoelektroforez gibi tekniklerde baskılanmış polimerler antikorlarla rekabet edememektedirler ancak immobilize antikora dayalı immunoafinite kromatografi, immunolojik metodlar ve immunosensörler gibi alanlarda baskılanmış polimerler antikora gerçek bir alternatiftirler (Haupt ve Mosbach, 1998).

Moleküler olarak baskılanmış polimerlerin son yıllarda hızla gelişen bir diğer uygulama alanı da hidrojellerdir. Hidrojeller, düşük çapraz bağlı büyük ölçüde sıvı emme özelliğine sahip yapılardır. Hidrojellerle yapılan MIP, moleküler baskılamanın hidrojellerin ilaç yükleme ve salım davranışı üzerinde olumlu gelişmeler sağladığını göstermektedir (Gümüşderelioğlu, 2010).

Moleküler baskılanmış polimerlerin sensör teknolojisinde de bir çok kullanım alanı vardır. Florimetri tabanlı sensörle; triazin, sialik asit, piren, cAMP; kondüktometri tabanlı sensörle atrazin, sialik asit, morfin, L-fenilalanin; spektrometri esaslı sensörle kloramfenikol, testosteron; SPR tabanlı sensörle teofilin analizleri gerçekleştirilmiştir (Yano ve Karube, 1999). Indol-3 –asetik asitin hedef molekül olarak kullanıldığı moleküler baskılanmış polimer piezoelektrik sensörde kullanılmıştır (Kugimiya ve Takeuchi, 1999). Baskılanmış polimerlerin moleküler tanıma elementi olarak kullanıldığı kuvarts kristal mikroterazi (QCM) sensörleri geliştirilmiştir. QCM elektrodunun yüzeyinde sialik asit ve indol asetik asit baskılanmış polimer filmler hazırlanmış ve sialik asit için tayin aralığı 20-250 nmol olarak belirlenmiştir. Herbisitlerden 2,4-diklorofenoksiasetik asitin baskılandığı polimer partikülleri ekran baskılamayla hazırlanmış tek kullanımlık üçlü elektrot sisteminin yüzeyine immobilize edilmişlerdir. Aynı şekilde sialik baskılanmış polimer filmi sensör yüzeyine tutturularak SPR’ de tayin amaçlı kullanılmıştır (Komiya vd, 2003).

1.15. Moleküler Baskılamanın Gıda Güvenliği Amaçlı Uygulamaları

Moleküler baskılama teknolojisi ortaya çıktığı günden bu yana gıda üretimi, analizi ve kalite kontrolü alanlarında da çok geniş uygulama alanları bulmuş ve halen de gelişmektedir. Gıda endüstrisinde gıdanın tüketim açısından güvenilir olup olmadığının test edilmesi açısından kontaminantların tayin edilmesi oldukça önem arz etmektedir. Gereken korumayı sağlamak için gıda endüstrileri ve resmi kurumlar, gıdalarda bulunabilecek kontaminantlar ya da antimikrobiyal ilaçların hızlı, basit ve doğru bir şekilde analiz edilmesini istemektedirler. Kalıntılar çok düşük miktarlarda bulundukları için biyolojik örneklerde temizlik ve ön konsantrasyon amaçlı olarak katı faz ekstraksiyonu rutin bir şekilde kullanılmaktadır. Moleküler baskılanmış katı-faz ekstraksiyonu gıdalarda etkili bir ön işlem metodu olarak görülmektedir (Lok ve Son, 2009). Djozan ve Ebrahimi (2008), atrazinin moleküler olarak baskılandığı yeni bir katı-faz mikro ekstraksiyon fiber hazırlamışlar, su, soğan ve pirincin matriks olarak kullanıldığı ürünlerde atrazin ve analogları olan simazin, triazin ve propazin gibi herbisitleri tayin etmişlerdir. Konserve gıdaların matriks olarak kullanıldığı ürünlerde Bisfenol-A moleküler baskılanmış ve katı-faz ekstraksiyonunda kullanılmıştır (Martin-Esteban ve Tadeo, 2006). Kloramfenikolün moleküler olarak baskılandığı mikroküreler, süt ve karides örneklerinde HPLC' ye enjeksiyon yapılmadan önceki aşamalarda temizlik ve ön konsantrasyon amaçlı olarak kullanılmışlardır (Shi vd., 2007). Sütten sülfametazinin tayini ve ön konsantrasyonu için hazırlanan moleküler baskılanmış polimer, seçici katı faz ekstraksiyonunda sorbent olarak kullanılmıştır (de Prada vd., 2005).

Mikrobiyolojik analizlerde kullanılan klasik metodlar oldukça yavaş ve zaman alıcıdır. Yeni metotlardan sayılan ELISA ve polimeraz zincir reaksiyonlarının da sektörde yaygın bir şekilde yerini almamıştır. Hangi metot olursa olsun gıda örneklerinden mikroorganizmaların ayrılması ve kontrol edilmesi hâlâ problem teşkil etmektedir. Whitcombe ve ark. tanıma elementi olarak uygun antikor ya da lektini taşıyan çözünür bir polimer kullanılarak mikroorganizmaları baskılanmışlardır (Whitcombe vd., 1997). Son zamanlarda β -laktam grubu antibiyotikler için moleküler baskılanmış polimerler geliştirilmiştir (Ramstrom vd., 2001). Penisilin V kullanılarak hazırlanan moleküler baskılanmış polimerlerin penisilin G, penisilin V ve oksasilin gibi farklı penisilinleri dahi seçici olarak ayırt edebildiği belirlenmiştir (Skudar vd., 1999). Lübke ve ark. da sulu çözeltilerden β -laktam grubu antibiyotiklerinden ampisilini etkin bir şekilde

baskılanmışlardır (Lübke vd., 2000). Kloramfenikolün kalıp molekül olarak kullanıldığı moleküler baskılanmış polimerler, yer değiştirme kromatografi tekniği ile HPLC’de floresan dedeksiyonda kullanılmışlardır (Levi vd, 1997). Başka bir çalışmada nikotinli sakızlarda nikotin ve nikotinin oksidasyon ürünleri, nikotin baskılanmış polimerle katı-faz ekstraksiyonunda ön saflaştırma işlemine tabi tutulmuştur (Zander vd., 1998).

Gıdaların önemli lipid bileşenlerinden biri olan kolesterol de moleküler olarak baskılanmıştır. Bu bileşiğin serumdaki seviyesinin izlenmesi ve steroid formundaki bir yağ olarak diyet ürünlerinden seçici olarak uzaklaştırılması açısından analitik uygulamalarda hayli ilgi görmüştür. Kolesterol baskılanmış polimerle hazırlanan filmler altın elektrot yüzeyine immobilize edilerek 5 dk içinde 15-60 µmol aralığında tayin yapılabilmektedir (Ramstrom vd., 2001). Flavonolle zenginleştirilmiş zeytinyağı örneklerinden moleküler baskılanmış polimerler kullanılarak floroseans dedeksiyonla flavonol tayini duyarlı ve seçici bir şekilde gerçekleştirilmiştir (Suárez-Rodríguez ve Díaz-García, 2000). Gıda analizlerinde kontaminant olarak ağır metallerin tayin edilmesi de önem arz etmektedir. Kurşunun ayrılması amacıyla kurşun baskılanmış iyon değişim rezinlerinin sentezlendiği çalışma moleküler baskılanmanın ağır metal tayinlerindeki örneklerinden bir tanesidir.

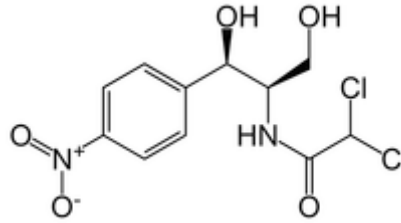
Polistren mikroküreciklerinin yüzeyinde papain baskılanmış 60-100 nm kalınlığında poli-3-aminofenilboronikasitin (pAPBA) nanofilmi başarıyla sentezlenmiştir. Baskılanmış kürecikler, kalıp molekül olarak seçilen papaine yüksek afinite göstermişlerdir (Lu vd., 2009). D-glikoz ve titanyum n-bütoksit’ten hazırlanmış kompozit nanofilm, kuvars kristal mikroterazi (QCM) elektrodunun yüzeyine tutturulmuştur. Kalıp molekül olarak kullanılan glikozun uzaklaştırılmasından sonra kalıp molekül ve D-mannoz, D-galaktoz ve D-fruktoz monosakkaritlerinin bağlanma davranışları incelenmiştir (Yang vd., 2008).

1.16. Kloramfenikol

Kloramfenikol (CAP), beyazdan grimsi beyaza ya da sarımsı beyaza değişen renklerde, ince kristal toz formda 150.5 ile 151.5 °C erime noktasına sahip bir antibiyotiktir. Yüksek vakum ortamında süblimleşen ve ışığa duyarlı bir madde olan kloramfenikol suda, kloroform ve eterde çözünmekte ancak en iyi çözünürlüğü propilen glikol, % 50’ lik asetamid, metanol, etanol, bütanol, etil asetat ve asetonda göstermektedir. Benzen, petrol eteri ve bitkisel yağlarda çözünmemektedir (2, 2010). CAP, geniş

spektrumlu bir antibiyotik olup doğal yollarla *Streptomyces venezuelae*' dan ya da sentetik olarak elde edilmektedir. Aerobik ve anaerobik mikroorganizmalara karşı aktivite göstermektedirler (Huang vd., 2006).

Kloramfenikol (Şekil 7) ; ciddi enfeksiyonların tedavisinde diğer antibiyotiklerin etkisiz kaldığı ya da kontrendikasyonlara sebep olduğu durumlarda kullanılmaktadır. 1950'lerden beri tifo, menenjit ve bazı merkezi sinir sistemi enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır. Şimdilerde ise göz merhemlerinde (konjunktiva ya da kornea) yüzey oküler enfeksiyonların tedavisinde, dış kulak ya da derinin tedavisinde lokal merhem olarak, ve iç enfeksiyonlarda damar içi süspansiyonların bileşiminde kullanılmaktadır.



Şekil 7. Kloramfenikol

Kloramfenikol veterinerlikte ise oldukça etkili ve iyi tolere edilebilen geniş spektrumlu antibiyotik olarak kullanılmaktadır. Antibiyotiklerin kullanımı, hayvansal kaynaklı gıdalarda bunların kalıntılarının bulunmasına neden olmakta ve halk sağlığını tehdit edici yan etkilere sebep olmaktadır. Antibiyotiklerin muhtemel zararlı etkilerini azaltmak için FDA (Food and Drug Administration) ve Avrupa Birliği (AB) tarafından kabul edilebilir limitler belirlenmiştir. Hatta bazı antibiyotiklerin gıda kaynağı olabilecek hayvanlarda dahi kullanımı A.B.D ve AB' de yasaklanmıştır. Yasaklanan bu antibiyotiklerden biri olan CAP; aplastik anemi olarak adlandırılan kan hücrelerinin yeterince üretilmemesi sonucu gelişen kemik iliği yetmezliğine ve lösemiye sebep olabilmektedir. CAP çocuklarda ve özellikle yeni doğanlarda yetişkinlere göre daha yavaş metabolize olmaktadır. Pediatrik doz aşıldığında gri bebek sendromu ortaya çıkmaktadır. Gri bebek sendromunda aktif kloramfenikolün serumda birikmesi ve ilacın glukuronide çevrilerek karaciğerden atılımının yetersiz olması sonucunda bebeklerde kardiyovaskular sistem çökmektedir. Ayrıca kloramfenikolün insanlarda kansere sebep olduğu sanılmaktadır (URL-2, 2010).

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kalıp molekül olarak kullanılan kloramfenikol (C0378), poli(vinil alkol) (PVA), sodyum dodesil sülfat (SDS), amonyum persülfat (APS), sodyum bikarbonat ve sodyum bisülfat Sigma ‘dan (St. Louis, ABD); etilen glikol dimetakrilat (EDMA) Fluka A.G. (Buchs, İsviçre) ‘den; diğer kimyasal maddeler ise Merck A.G. (Darmstad, Almanya)’ dan temin edildi. EDMA, polimerizasyon inhibitöründen arındırılmak üzere düşük basınçta (100 mmHg) damıtıldı ve kullanılabilecek kadar 4°C’da muhafaza edildi. Deneyler sırasında kullanılan cam malzemeler bir gece boyunca nitrik asitte bekletildi ve tozsuz ortamda kurutuldu. Deneylerde kullanılan su, yüksek akışlı selüloz membranlı Barnstead (Dubuque, IA) Ropure LP[®] ters osmoz ünitesinde işleme tabi tutulduktan sonra Barnstead D3804 NANOpure[®] organik/kolloidal uzaklaştırma ve dolgu iyon değişim sistemi kullanılarak saflaştırıldı. Elde edilen saf suyun iletkenliği 18 megaohm/cm'dir.

2.2. Nanopartiküllerin Hazırlanma Aşamaları

Nanopartiküllerin hazırlanmasında aşağıdaki basamaklar izlenmiştir.

- N-Metakriloil-(L)-Histidin Metil Ester (MAH) Monomerinin Sentezlenmesi
- MAH Monomerinin Karakterizasyonu
- Kloramfenikol Baskılanmış poli(EDMAH) Nanopartiküllerin Hazırlanması
- Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

2.1.1. N-Metakriloil-(L)-Histidin Metil Ester (MAH) Monomerinin Sentezlenmesi

5.0 g L-histidin metil esteri ve 0.2 g hidrokinon 100 ml diklorometan (CH_2Cl_2) içerisinde çözülmüş ve çözelti 0°C'a soğutuldu. Üzerine 12.7 g trietilamin eklendi ve sonrasında bu çözeltiye yavaşça 5.0 ml metakroil klorür ilave edildi. Bu karışım azot atmosferi altında manyetik karıştırıcı (150 rpm) ile oda sıcaklığında 2 saat karıştırıldı. Bu sürenin sonunda reaksiyona girmeyen metakroil klorür % 10'luk NaOH çözeltisi ile

ekstrakte edildi. Sulu faz, döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı ve kalan katı kısım (MAH) etanolde çözüldü.

2.2.2. MAH Monomerinin Karakterizasyonu

2.2.2.1. FTIR Analizi

MAH monomerinin FTIR spektrumu, FTIR spektrofotometresi (FTIR 8000 Series, Shimadzu, Japonya) kullanılarak elde edildi. 2 mg MAH monomeri ile 98 mg KBr (IR Grade, Merck, Almanya) homojen olarak karıştırılmış ve tablet haline getirildi. Sonrasında $4000-450\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında FTIR spektrumu çekildi.

2.2.3. Kloramfenikol Baskılanmış Poli(EDMAH) Nanopartiküllerin Hazırlanması

Polimerizasyon ikili sıvı faz karışımında gerçekleştirildi. Birinci sıvı faz, PVA (0.187 g), SDS (28.9 mg) ve sodyum bikarbonat (23.4 mg)'ın sulu çözeltisidir (10 ml). İkinci sıvı faz, PVA (0.1 g) ve SDS (0.1 g)'nin sulu çözeltisidir (200 ml). Monomer fazı ise; MAH monomeri (5 mg) ve EDMA (2.1 ml) kullanılarak hazırlandı. Hazırlanan monomer fazı, birinci sıvı faza eklendi. Karışım, miniemülsiyon elde edilmek üzere 25.000 rpm'de homojenize (T10, Ika Labortechnik, Almanya) edildi. Daha sonra, kalıp molekül kloramfenikol miniemülsiyona eklendi ve etkin monomer-kalıp etkileşimini gerçekleştirmek için manyetik karıştırıcı ile 2 saat karıştırıldı. Karıştırma işlemi devam ederken kalıp molekülü içeren miniemülsiyon yavaşça ikinci sıvı faza eklendi. Daha sonra karışım cam polimerizasyon reaktörüne (Radleys Carousel 6, Essex, İngiltere) aktarıldı. Reaktör mekanik olarak karıştırıldı (300 rpm) ve 40°C 'ta ısıtıldı (Radleys Carousel 6, Essex, İngiltere). Son olarak, sodyum bisülfat (0.115 g) ve amonyum persülfat (0.126 g) karışıma eklendi. Polimerizasyon 40°C 'ta 24 saat süreyle devam ettirildi. Elde edilen kloramfenikol baskılanmış nanopartiküller 5 kez deiyonize su, 5 kez etil alkol ve tekrar deiyonize su ile yıkanarak reaksiyona girmeyen monomer, yüzey aktif madde ve başlatıcı uzaklaştırıldı. Her bir yıkama basamağı için çözelti 9000 rpm'de 1 saat süreyle santrifüj (Allegra-64R Beckman Coulter, ABD) edildi ve nanopartiküller yıkama ortamından

ayrıldı. Temizlenen nanopartiküller, deiyonize su içerisinde tekrar dağıtıldı ve 4°C’de saklandı.

Kloramfenikol baskılanmamış poli(EDMAH) nanopartiküller polimerizasyon ortamında aynı yöntem ile hazırlandı.

2.2.4. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

2.2.4.1. Zeta Boyut Analizi

Nanopartiküllerin boyut analizi, Nano Zetasizer (NanoS, Malvern Instruments, Londra, İngiltere) ile belirlenmiştir. 3 ml nanopartikül çözeltisi boyut analizörünün örnek yuvasına yerleştirildi. Işığın saçılması 90°’lik geliş açısında 25°C’da tayin edildi. Işığın saçılma sinyali birim saniyedeki partikül sayısı (partikül sayısı/sn) olarak hesaplandı.

2.2.5. Yüzey Plazmon Rezonans Sensör Yüzeyine Nanopartiküllerin Tutturulması

Nanopartiküllerin yüzey plazmon rezonans sensör yüzeyine tutturulmasından önce SPR sensörün altın yüzeyi asidik pirana çözeltisi (3:1 H₂SO₄:H₂O₂, v/v) ile temizlendi. Asidik pirana çözeltisi (20 ml) içerisine daldırılan sensör, 20 saniye çözelti içerisinde bekletildi. Çözeltiden çıkarılan sensör, deiyonize su ve saf etil alkol ile yıkandı ve vakum etüvünde (200 mmHg, 40°C) 3 saat kurutuldu. Yüzeyi temizlenen SPR sensörün altın yüzeyine 100 kat seyreltildi (% 4.2, v/v) nanopartikül çözeltisi damlatıldı (5 µl). Tozsuz ortamda 37°C’de 6 saat kurutuldu. Nanopartiküllerle kaplanmış SPR sensör yüzeyi deiyonize su ve saf etil alkol ile yıkandı ve vakum etüvünde (200 mmHg, 40°C) kurutuldu.

2.3. Kalıp Molekülün Desorpsiyonu

MAH monomeri ve kloramfenikol arasında moleküller arasındaki etkileşimlerden kaynaklanan bir etkileşim söz konusudur. Ancak temel etkileşimler, MAH monomerinde bulunan histidin grubu ile kloramfenikol üzerinde bulunan polar gruplar arasında oluşması muhtemel elektrostatik etkileşimler ve hidrojen bağlarıdır. Kalıp molekül olarak kullanılan kloramfenikolün polimerik yapıdan sökülebilmesi için yukarıdaki etkileşimleri kırabilecek

bir desorpsiyon ajanının kullanılması gerekmektedir. Bu amaçla desorpsiyon ajanı olarak ultra saf su kullanıldı. Kalıp molekülün desorpsiyonu kesikli sistemde gerçekleştirildi. Sensör yüzeyine tutturulan kloramfenikol baskılanmış nanopartiküller üzerine desorpsiyon çözeltisi olarak kullanılan 20 ml su eklendi. Çalkalamalı inkübatörde oda sıcaklığında 2 saat boyunca çalkalandı (200 rpm). Desorbe edilen sensör, deiyonize su ile yıkandı ve vakum etüvünde (200 mmHg, 25°C) kurutuldu.

2.4. Yüzey Plazmon Rezonans Nanosensörün Karakterizasyonu

2.4.1. Atomik Kuvvet Mikroskopisi

SPR nanosensörlerin altın yüzeylerinin karakterizasyonu için yarı degen modda atomik kuvvet mikroskobu (Nanomagnetics Instruments, Oxford, İngiltere) kullanıldı. Atomik kuvvet mikroskobu, serbest kantileverli interferometre özelliği ile 4096 x 4096 piksel gibi çok yüksek çözünürlükte ölçüm alabilmektedir. SPR nanosensör çift yüzlü karbon bant ile örnek tutucuya yerleştirildi. Görüntüleme çalışmaları hava ortamında, yarı degen modda gerçekleştirildi. Salınım rezonans frekansı, 341.30 Hz olarak uygulandı. Titreşim genliği, 1 VRMS ve boş titreşim genliği ise 2 VRMS'dir. Örnekler 2 µm/s tarama hızında, 256 x 256 piksel çözünürlükte, 2 x 2 µm²'lik bir alanın görüntüsü olarak alındı.

2.4.2. Temas Açısı Ölçümleri

Hazırlanan çiplerin yüzey karakterizasyonu için temas açısı ölçümleri de yapıldı. Temas açısı ölçümleri KRUS DSA100 (Hamburg, Almanya) cihazı ile gerçekleştirildi. Temas açıları, yüzeyi modifiye edilmiş ve edilmemiş çiplerin yüzeyine 1 damla su damlatılarak yapışık damla (sessile drop) yöntemiyle belirlendi. Sensör yüzeyinin farklı bölgelerine su damlatılarak 40 ayrı fotoğraf çekilerek her biri için ayrı ayrı temas açısı belirlendi. Belirlenen temas açı değerleri damlacığın katı ile sol temas noktasından alınan soldan temas açısı; sağ temas noktasından alınan sağdan temas açısı olarak belirlendi. Ayrıca her iki noktanın ortalaması olan ortalama temas açısı değerleri elde edildi. Modifiye edilmemiş ve edilmiş sensör yüzeyleri için temas açısı değerleri alınan 40 ölçümün ortalama değerleri hesaplandı.

2.5. Yüzey Plazmon Rezonans Sistemi ile Plazmon Ölçümleri

SPR nanosensörde yüzey plazmon eğrileri, yüzey plazmon rezonans sistemi (SPRiLab (GenOptics, Orsay, Fransa) ile alındı. SPR sensörler, 25.0 x 12.5 mm yüzey alanına sahip 50 nm kalınlıkta altın kaplanmış olarak temin edildi. Plazmon eğrilerinin alınması sırasında SPRview yazılımı kullanıldı. Görüntü alınması sırasında ışığın SPR nanosensöre ulaşma açısı değiştirilerek (48.7-60.7°) ışığın % kırılma değerleri alındı. Elde edilen değerler SPR1001 yazılımı kullanılarak incelendi ve yüzey plazmon eğrileri ışığın geliş açısına karşı % kırılma miktarı ve eğimi grafiğe geçirilerek rapor edildi.

2.6. SPR Nanosensörle Kinetik Analizlerin Gerçekleştirilmesi

Kloramfenikol baskılanmış poli (EDMAH) SPR nanosensörün hazırlanmasından sonra kinetik çalışmalara geçildi. Kinetik çalışmalar, farklı derişimlerde hazırlanan standart kloramfenikol çözeltileri ile gerçekleştirildi. Bu çözeltiler pH: 7.2 fosfat tamponu ve etanol (9 birim fosfat tamponu:1 birim etanol) karışımında 0.155-6.192 nM arasında hazırlanarak SPR sistemine verildi. Şekil 9'da GenOptics SPRiLab sistemi gösterilmiştir. Sistem, lazer kaynağı, ayna sistemi, CCD kamera sistemi, peristaltik pompa ve bilgisayardan oluşmaktadır (Şekil 9). Yüzeyine kloramfenikol baskılanmış poli(EDMAH) nanopartiküller tutturulan SPR sensör, kinetik analiz çalışmalarında kullanıldı. Kinetik analiz çalışmalarında SPRview yazılımının kinetik görüntüleme programı kullanıldı.

Kinetik analiz aşamaları:

- SPR nanosensör yüzeyi deiyonize su (50 ml) ile yıkandı.
- Sistemden fosfat tamponu/etanol karışımı geçerken yüzey plazmon eğrileri alındı ve rezonans açısı belirlendi. Cihaz bu açığa ayarlandı ve kinetik çalışmalar bu açı değerinde gerçekleştirildi.
- Plazmon eğrileri alınması ve aynanın rezonans açısı değerine ayarlanmasının ardından, SPR sisteminden yaklaşık 8 dk süreyle fosfat tamponu/etanol karışımı geçirilmeye devam edildi.
- Bu dengeleme basamağından sonra, farklı derişimlerdeki kloramfenikol çözeltileri teker teker (10 ml, 2.0 ml/dakika akış hızı) sisteme verildi.

-Rezonans frekansındaki kayma değerleri anlık olarak gözlemlendi ve denge durumuna geldiğinde (yaklaşık 40 dakika) sisteme ultra saf su (10 ml, 2.0 mL/dk. akış hızı) verilerek desorpsiyon gerçekleştirildi.

-Desorpsiyon işleminden sonra, SPR nanosensör fosfat tamponu/etanol ile yıkandı.

-Farklı derişimlerdeki kloramfenikol çözeltileri sisteme verilmeden önce adsorpsiyon-desorpsiyon-temizleme aşamaları tekrarlandı. Elde edilen kinetik veriler, SPR1001 yazılımı kullanılarak analiz edildi.

Standart bir ölçümde; sistemden öncelikle denge tamponu, daha sonra, sistem yeniden dengeye ulaşana kadar kloramfenikol çözeltileri geçirildi (b) ve son aşamada desorpsiyon çözeltileri kullanıldı (c). Bütün ölçümlerde sistemin dengeye ulaşması için yaklaşık 40 dakika beklendi. Desorpsiyon ve rejenerasyon işlemleri yaklaşık 5 dakika içinde gerçekleştirildi.

2.6.1. Seçicilik Analizleri

Kloramfenikol baskılanmış nanopartiküllerin seçicilik analizlerinde, yarışmacı bileşen olarak seçilen ve moleküler grupları kloramfenikole benzeyen thiamfenikol (TAP) ve florfenikol (FAP) kullanıldı (Şekil 8). Seçicilik analizlerinde kullanılan TAP ve FAP çözeltileri tekli çözelti halinde 1.858 nM derişiminde fosfat tamponu/etanol karışımında hazırlandı. Baskılanmış ve baskılanmamış polimerler her bir molekülle çalışıldıktan sonra su ile desorbe edildiler. Bu bileşenler hem moleküler baskılanmış (MIP) hem de moleküler olarak baskılanmamış (NIP) polimerin bulunduğu SPR sensör çipin yüzeyinden geçirilerek plazmon eğrileri ve kinetik verileri alındı.

Thiamfenikol ve florfenikolün kloramfenikole göre dağılma katsayısı aşağıdaki eşitliğe göre belirlendi:

$$K_d = [(C_i - C_f) / C_f] \times V / m \quad (7)$$

K_d : Dağılma katsayısı, ml/g

C_i : Analitin başlangıç derişimi, nM

C_f : Analitin bağlanma sonrası derişimi, nM

V : Kullanılan çözelti hacmi, ml

m : Polimerin ağırlığı, g

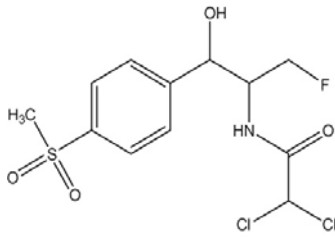
Konsantrasyon terimleri SPR sinyali olarak verilebilmektedir (Johnstone ve Turner, 1997). SPR sinyali dağılma katsayısıyla doğru orantılıdır (Roper, 2007).

Bu durumda yarışmacı bileşenler kullanıldığında seçicilik katsayısı aşağıdaki gibi ifade edilir:

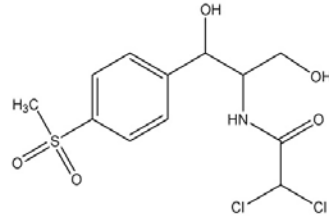
$$k = \Delta R_{\text{katıp molekül}} / \Delta R_{\text{girişimci molekül}} \quad (8)$$

Moleküler baskılanmış nanopartiküllerin seçicilik katsayılarının karşılaştırılması baskılama seçiciliği hakkında fikir vermektedir. Bağlı seçicilik katsayısı aşağıdaki eşitlikle ifade edilmektedir:

$$k' = k_{\text{baskılanmış}} / k_{\text{baskılanmamış}} \quad (9)$$

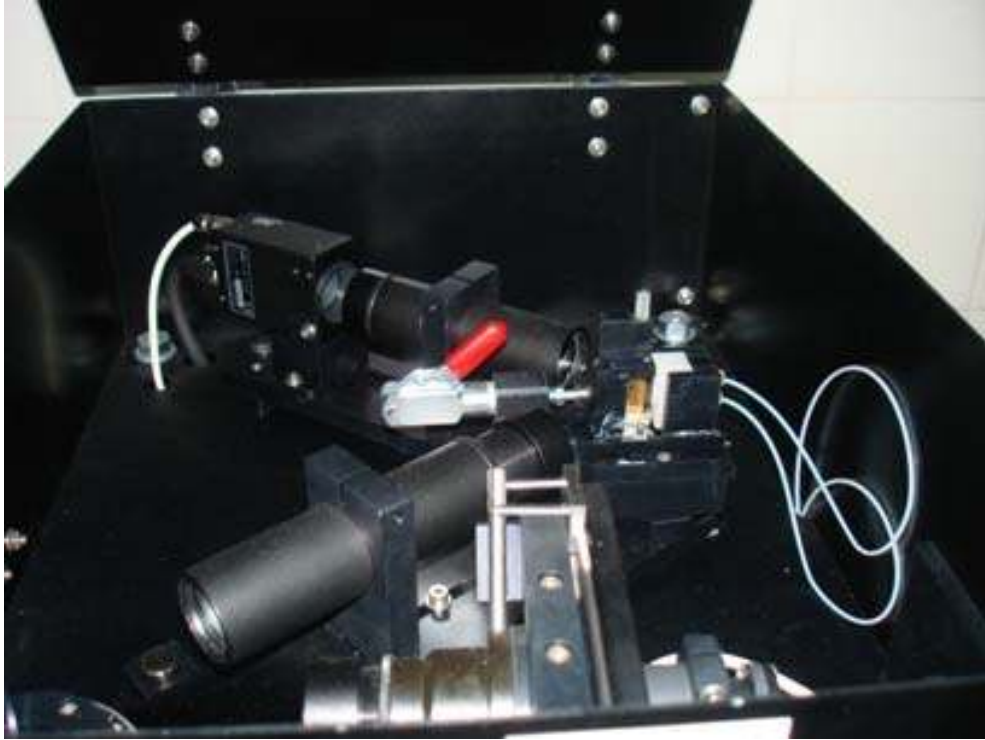


Florfenikol (FAP)



Tiyamfenikol (TAP)

Şekil 8. Yarışmacı bileşen olarak seçilen florfenikol (FAP) ve tiyamfenikol (TAP)



Şekil 9. GenOptics SPRiLab sistemi

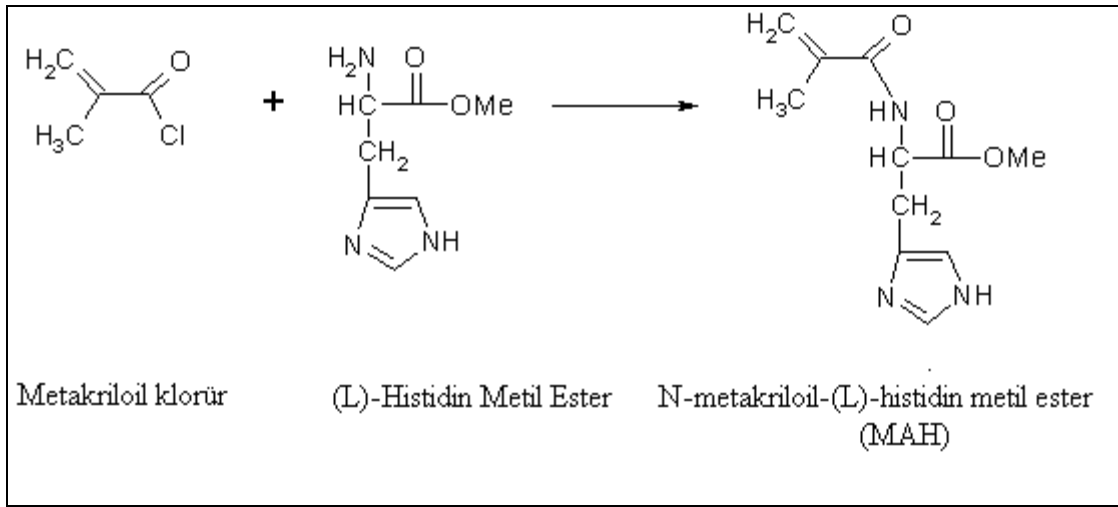
2.7. Bal Numunelerinin Hazırlanması ve Kinetik Analizler

Bal örneklerinin bir kısmı marketlerden bir kısmı da balcılık yapan kişilerden alınmıştır. Ballardan kloramfenikolün ekstrakte edilmesinde Ferguson vd. (2005) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Toplanan ballardan 5 gr (± 0.02) santrifüj tüpüne alınarak 10 ml ekstraksiyon tamponu ilave edilmiş ve çözelti haline gelinceye kadar karıştırılmıştır. Daha sonra 12 ml etil asetat ilave edilmiş ve karışım 30 dk süreyle rotatorde karıştırılmıştır. Sonrasında 10 dk süreyle 4000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Üstte kalan kısımdan 8 ml bir test tüpüne transfer edilmiş ve etüvde 50 °C’de kuruyuncaya kadar bekletilmiştir. Kuruyan kısım tekrar 10 ml fosfat tamponu/etanol’ de çözülmüş ve vortekslenerek SPR sensör sisteminde analiz edilmiştir.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. MAH Monomerinin Sentezi ve Karakterizasyonu

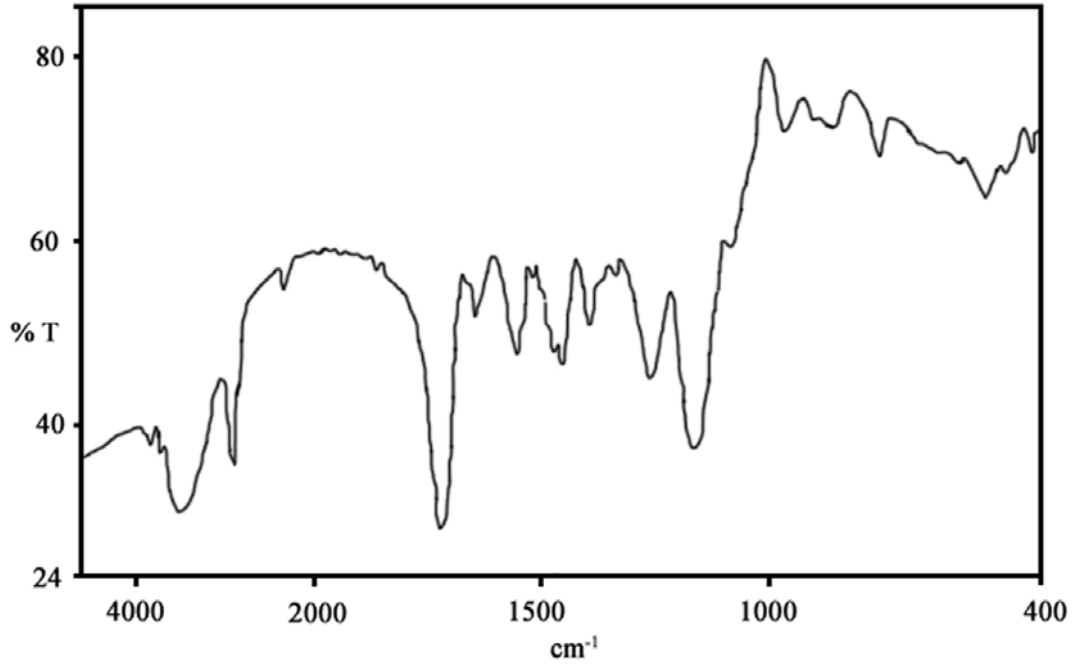
MAH monomeri, L-histidin metil esterin metakriloil klorür ile reaksiyonu sonucu elde edildi (Şekil 10). Elde edilen monomer FTIR ile karakterize edildi.



Şekil 10. MAH monomerinin sentez reaksiyonu

3.1.1. FTIR Analizi

MAH monomerinin karakterizasyonu amacıyla kullanılan FTIR spektrofotometresi 'nden (FTIR 8000 Series, Shimadzu, Japonya) elde edilen FTIR spektrumu Şekil 11' de verilmiştir. Şekil 10 incelendiğinde MAH monomerine ait karakteristik 1724 cm⁻¹'de karbonil bandı; 1558 cm⁻¹ ve 1651 cm⁻¹ amid gerilme titreşim bandları ve 3500 cm⁻¹ civarında geniş hidroksil bandları görülmektedir.



Şekil 11. MAH Monomerinin FTIR spektrumu

3.2. Nanopartiküllerin karakterizasyonu

3.2.1. Zeta Boyut Analizi

Nanopartiküllerin boyutları 1 ile 100 nm arasında değişmektedir. Elde edilen nanoparti-küllerin nanoboyutta olup olmadığının kontrolü amacıyla partiküllerin karakterizasyo-nunun yapılması gerekmektedir. Bu amaçla zeta boyut analizörü kullanılmıştır. Boyut analizörü, dinamik ışık saçılımı metoduna göre seyreltik çözelti içerisindeki küçük parçacıklardan saçılan ışığın şiddetinin ve değişiminin ölçülmesi temeline göre ölçüm yapmaktadır. Saçılan ışığın şiddetindeki değişim, parçacığın hareketine buna bağlı olarak da parçacığın büyüklüğüne, ortamın viskozitesine ve sıcaklığa bağlıdır (URL-7, URL-8).

Kloramfenikol baskılanmış partiküllerin boyutu 52 nm olarak tespit edildi.

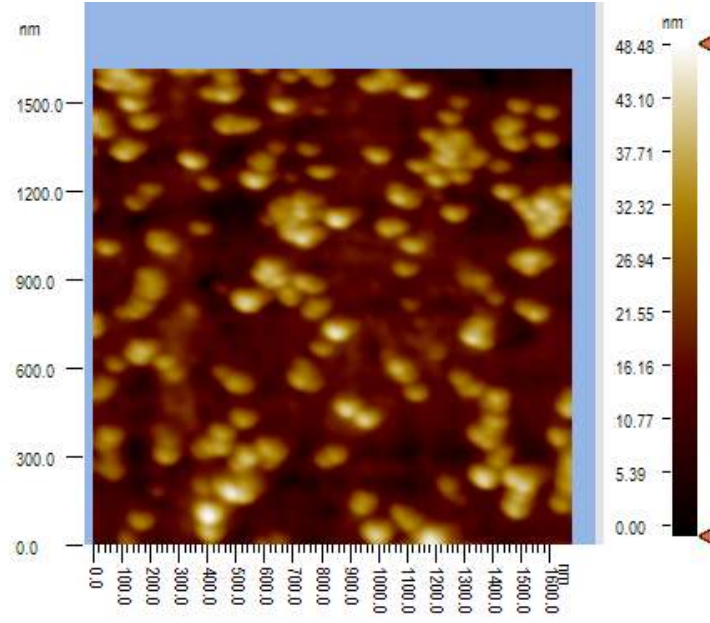
3.3. Kloramfenikol Baskılanmış SPR Nanosensör Yüzeyinin karakterizasyonu

3.3.1. Atomik Kuvvet Mikroskopisi (AFM) Analizi

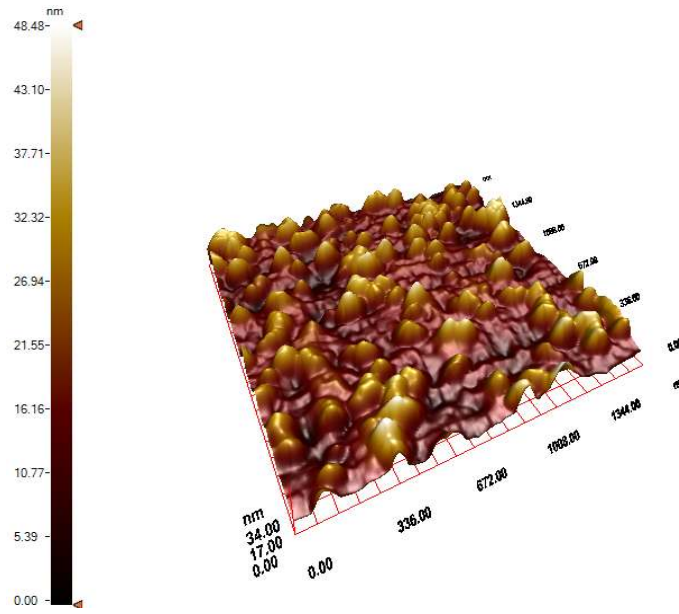
Kloramfenikol baskılanmış ve baskılanmamış sensör yüzeylerinin karakterizasyonu amacıyla kullanılan diğer bir yöntem atomik kuvvet mikroskopisidir. CAP baskılanmış ve baskılanmamış sensörlerin yüzey ve üç boyutlu görüntüleri Şekil 12 ve Şekil 13'te verilmiştir. Tablo 2' de ise AFM analiz parametreleri verilmiştir. Şekil 12 ve Tablo 2 incelendiğinde kloramfenikol baskılanmış nanopartiküllerin tutturduğu sensör yüzeyinin derinliği 48.48 nm olarak belirlendi. CAP baskılanmamış sensör yüzeyinin derinliği ise 40.71 nm'dir (Şekil 13 ve Tablo 2). Bu sonuca göre altın kaplı ve nanopartikül tutturulmuş SPR sensör yüzeyinde pürüzlülüğün oluştuğu, tek tabaka şeklinde yüzeyi kapladığı ve polimerizasyonun gerçekleştiği anlaşılmaktadır. CAP baskılanmamış (NIP) sensörün yüzey derinliği CAP baskılanmış (MIP) sensörden daha düşüktür.

Tablo 2. Atomik kuvvet mikroskopisi analiz parametreleri

Yüzey	Derinlik, nm
CAP baskılanmış SPR Nanosensör	48.48
CAP baskılanmamış SPR Nanosensör	40.71

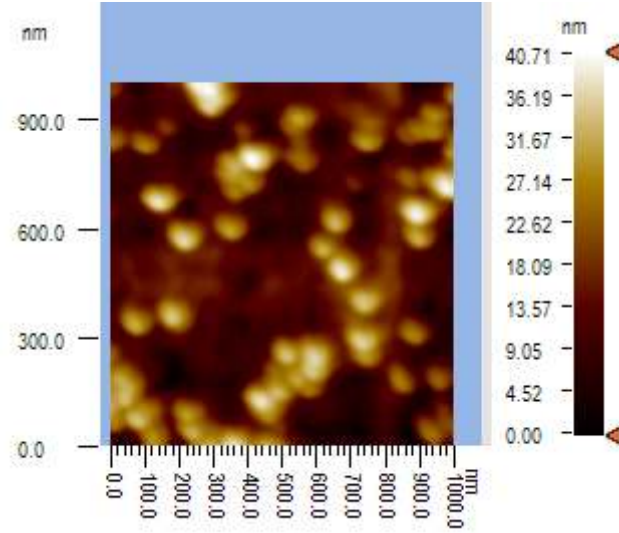


(a)

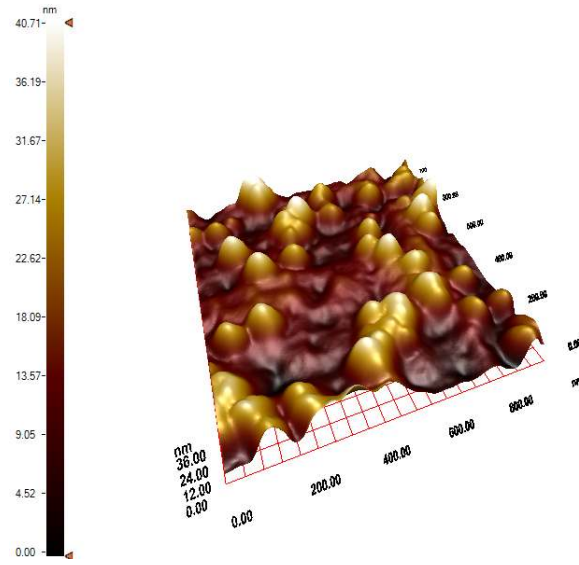


(b)

Şekil 12. Kloramfenikol baskılanmış (MIP) SPR nanosensörün
 (a) Yüzey görüntüsü (b) 3B görüntüsü



(a)



(b)

Şekil 13. Kloramfenikol baskılanmamış (NIP) SPR nanosensörün (a) Yüzey görüntüsü (b) 3B görüntüsü

3.3.2. Temas Açısı Ölçüm Sonuçları

Bir katı yüzeyi ile temastaki bir sıvı yüzeyi bir açı oluşturur. Temas açısı adı verilen bu açının büyüklüğü, sıvının kendi molekülleri arasındaki çekim kuvvetleri (kohezyon kuvvetleri) ile sıvı katı arası çekim kuvvetlerinin (adhezyon kuvvetleri) göreceli büyüklüğüne bağlıdır. Kohezyon kuvvetlerinin büyüklüğü, adhezyon kuvvetlerinin büyüklüğünden ne kadar fazla ise, sıvı katı arasındaki temas açısı da o denli büyük olur. Diğer bir ifade ile büyük bir temas açısı sıvı katı çekim kuvvetlerinin azlığının, küçük bir

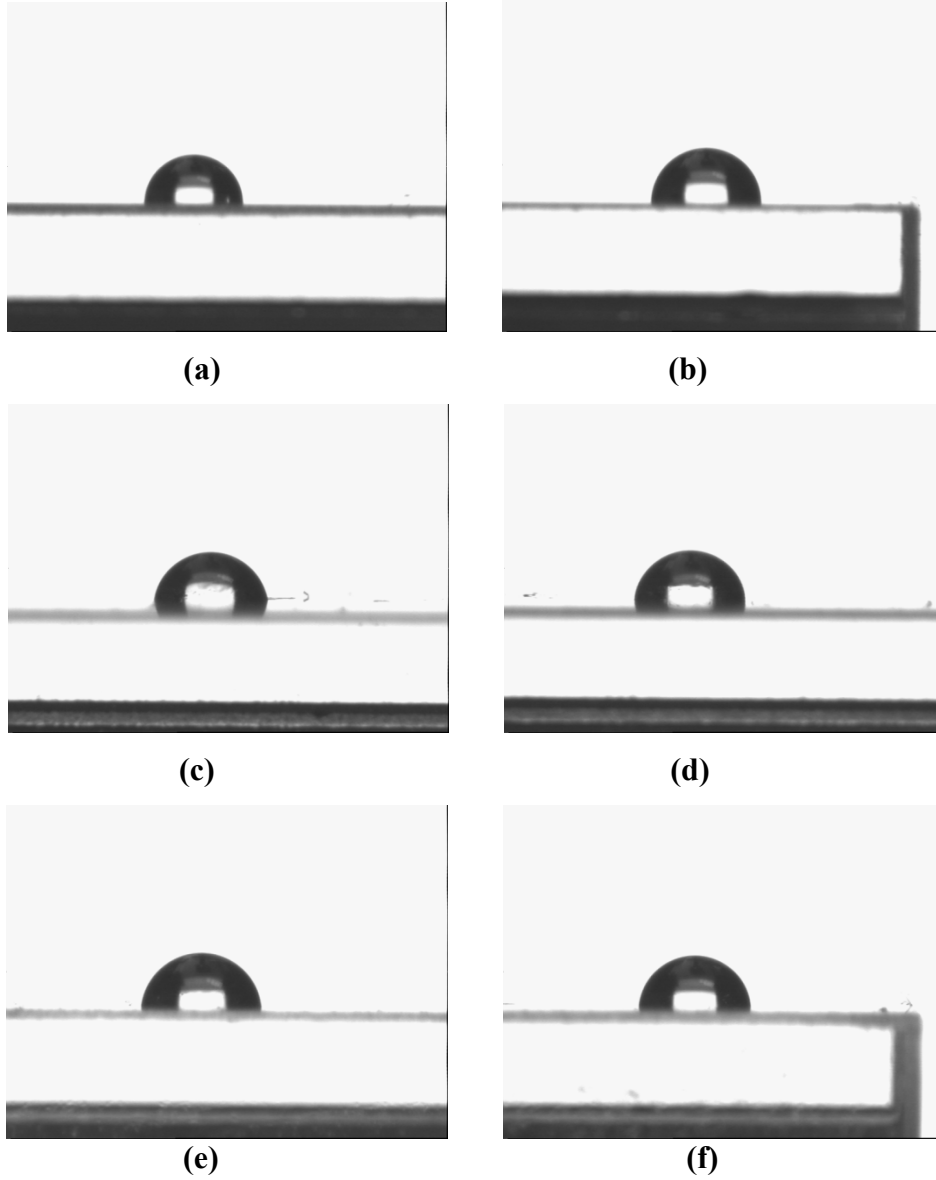
temas açısı ise bu kuvvetlerin büyük olmasının bir göstergesidir. Ayrıca temas açısının büyüklüğü, katı yüzeyin düzlüğü ve temizliğinden başka sıvının saflık derecesine de bağlıdır (URL-6,2010). Katıların sıvılarla ıslanabilirliği önemlidir ve bu da yüzeyde sıvı damlasının şekli izlenerek tanımlanmaktadır. Damlanın şekli ve ıslatabilirliği temas açısı ile belirlenmektedir. Düşük temas açısı katı cismin sıvı ile iyi ıslanabildiğini gösterir. Temas açısı 90 °C'den büyükse ıslatabilirlik zayıftır (Saraçoğlu vd., 2001).

Yüzeyi modifiye edilmemiş, CAP baskılanmış ve baskılanmamış çiplerin yüzey karakterizasyonu KRUS DSA100 (Hamburg, Almanya) ile gerçekleştirildi. Temas açısı değerleri DSA2 yazılımı kullanılarak hesaplandı. Temas açısı ölçüm sonuçları Tablo 3' te verilmiştir.

Tablo 3. Temas açısı ölçümleri

Yüzey	Temas açısı, derece
Modifiye edilmemiş	79.3
Kloramfenikol baskılanmış sensör (MIP)	73.4
Kloramfenikol baskılanmış sensör (NIP)	73.1

Tablo 3' te görüldüğü gibi, yüzeyde CAP baskılaması ile temas açısı MIP için 79.3' ten 73.4'e NIP için ise 73.1' e düşmüştür. Bu da çip yüzeyinin polimer ile kaplandığını ve hidrofilik özelliğin arttığını göstermektedir. Bunun sebebi, hem MIP hem de NIP sensör yüzeyinde hidrofilik özellikteki MAH monomerinin kullanılmasıdır. MAH monomerinin yapısında histidin amino asidi vardır ve bu da yüzeyi hidrofilik yapmaktadır. Dolayısıyla MAH monomerinin yüzeye tutturulması temas açısını düşürmüştür. Modifiye edilmemiş, CAP baskılanmış ve baskılanmamış nanosensörlere ait temas açısı görüntüleri Şekil 13'te verilmiştir.

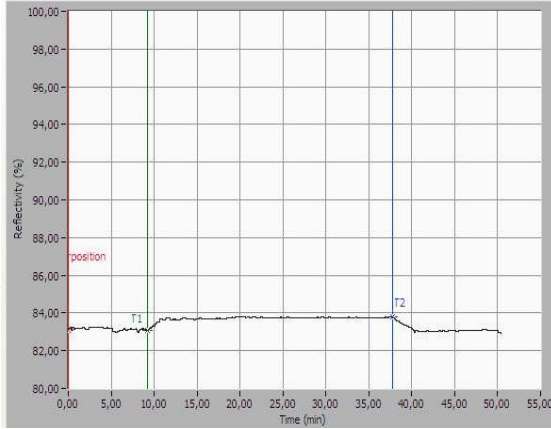


Şekil 14. Temas açısı ölçümleri: a, b: Modifiye edilmemiş nanosensör yüzeyi c, d: CAP baskılanmış nanosensör yüzeyi e, f: CAP baskılanmamış nanosensör yüzeyi

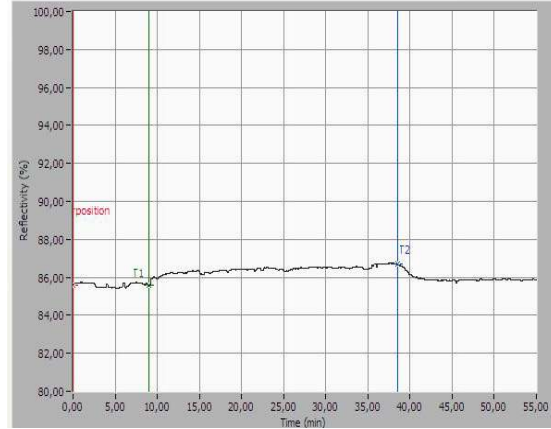
3.4. Kinetik Analizler

SPR sinyali ile kloramfenikol derişimi arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için 0,155-6.192 nM arasındaki derişimlerde standart kloramfenikol kullanılarak bir seri çözelti hazırlandı. Çözeltiler peristaltik pompa aracılığıyla SPR nanosensörle etkileştirildi ve SPRview yazılımı kullanılarak kinetik veriler alındı. Elde edilen ham veriler zamana karşı % R (reflektivite) ve ΔR olarak gösterilmiştir. ΔR , anlık reflektivite değeri ile başlangıç % reflektivite değeri arasındaki farkı ifade etmektedir. Sabit açı modunda gerçekleştirilen

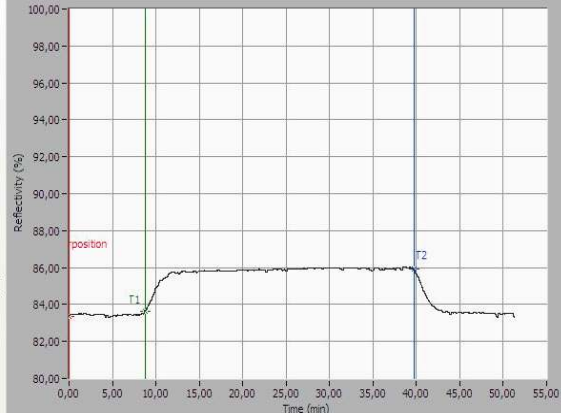
SPR ölçümlerinde SPR açığı kayması reflektivite (R) sinyaline dönüştürülmektedir. SPR açısındaki kayma ya da bu açıdan türetilmiş bir parametre olan reflektivitedeki değişim zamanın bir fonksiyonu olarak grafiğe geçirildiğinde sensogram elde edilmektedir. (Beusink vd., 2008) Şekil 15'te farklı derişimlerdeki kloramfenikol çözeltilerinin SPR nanosensörden elde edilen zamana karşı % R değerlerine ait sensogramları görülmektedir.



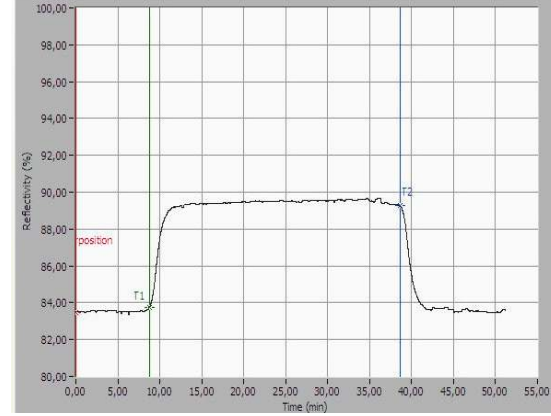
(a) 0.155 nM



(b) 0.310 nM



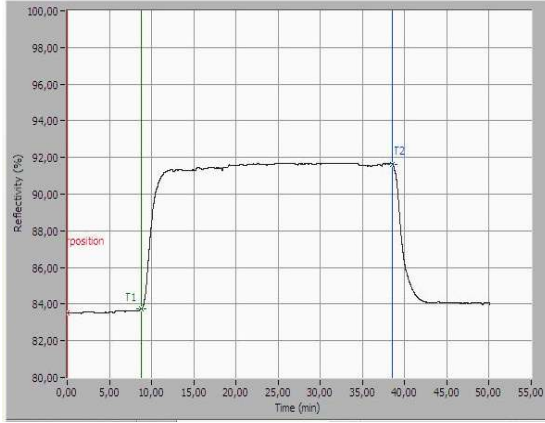
(c) 0.619 nM



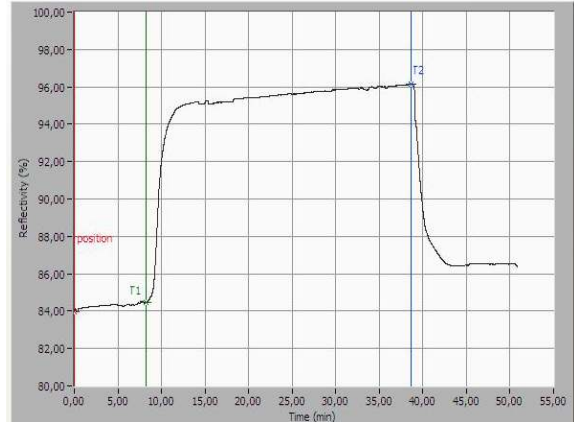
(d) 1.238 nM

Şekil 15. Kloramfenikol çözeltilerinin her birinin kloramfenikol baskılanmış SPR nanosensörden elde edilen zamana karşı % R değerlerine ait sensogramları

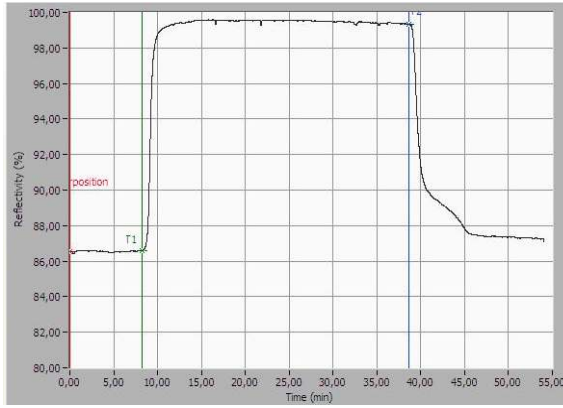
Şekil 15'in devamı



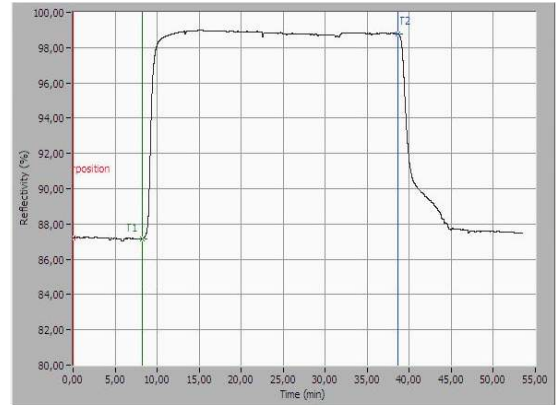
(e) 1.858 nM



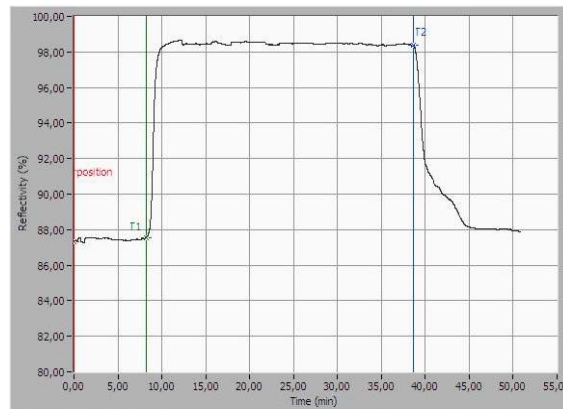
(f) 2.477 nM



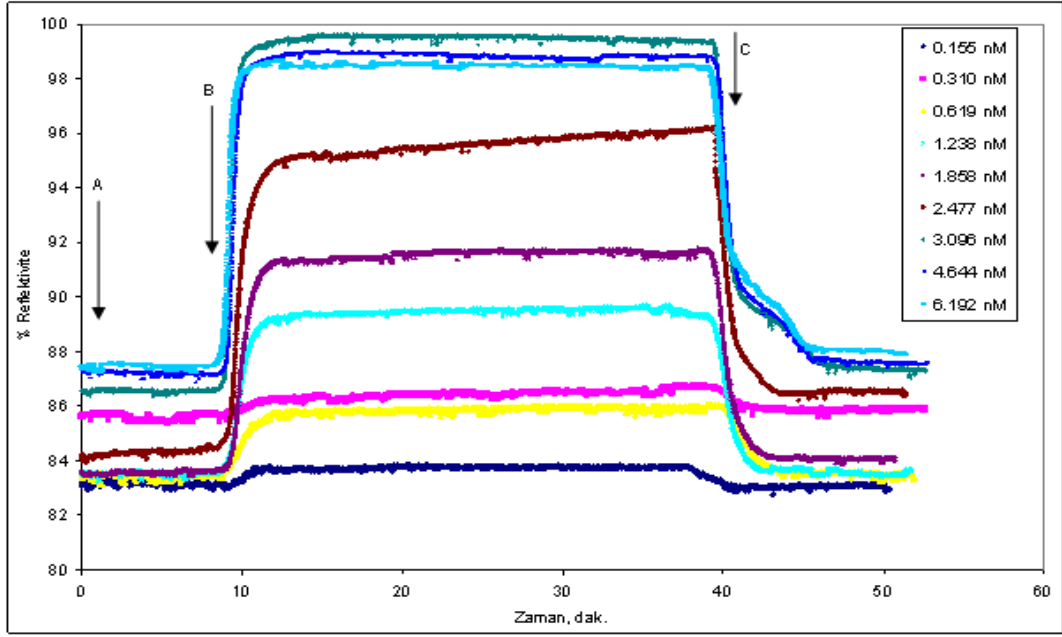
(g) 3.096 nM



(h) 4.644 nM



(i) 6.192 nM

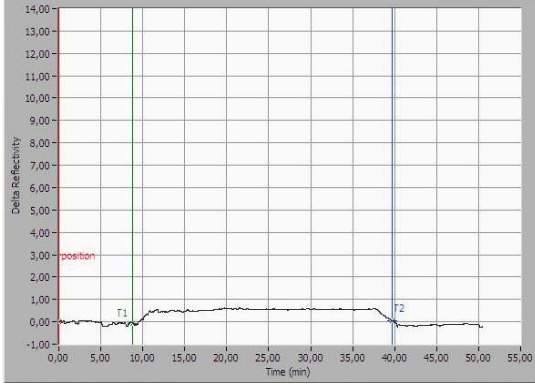


Şekil 16. Kloramfenikol çözeltilerinin hazırlanan bütün derişimlerinin (0.155-6.192 nM) zamana karşı % R değerlerine ait SPR sensorgramları

Şekil 16'da bütün derişimlerden elde edilen sensogramlar bir arada verilmiştir. Şekil 15 ve Şekil 16'da görüldüğü gibi derişim artışıyla birlikte % reflektivite oranları da artmıştır. SPR görüntüleme deneylerinde reflektivitedeki % değişim yüzeye tutunan molekül miktarıyla doğru orantılıdır (Nelson vd., 2001). Chang vd.'lerinin (2010) yaptığı bir çalışmada da antijen derişiminin artmasıyla SPR cevabının da arttığı görülmüştür. İnce altın filmlerin reflektivitesi civanın altın yüzeye adsorpsiyonuyla artmıştır (Butler vd., 1990). Ölçümler sırasında önce denge tamponu verildi. Daha sonra sistem dengeye ulaşınca kadar sensör sisteminden CAP çözeltisi geçirildi. Sonrasında desorpsiyon ve rejenerasyon işlemleri gerçekleştirildi ve bu işlem 5 dk sürdü. Ölçümlerde sistemin dengeye ulaşma süresi 40 dk olarak tespit edildi.

Şekil 17' de CAP çözeltilerinin SPR nanosensörden elde edilen zamana karşı ΔR derişimlerine ait sensogramlar verilmiştir. ΔR derişimlerinin kullanımı verilerin daha duyarlı derişendirilmesine olanak vermektedir.

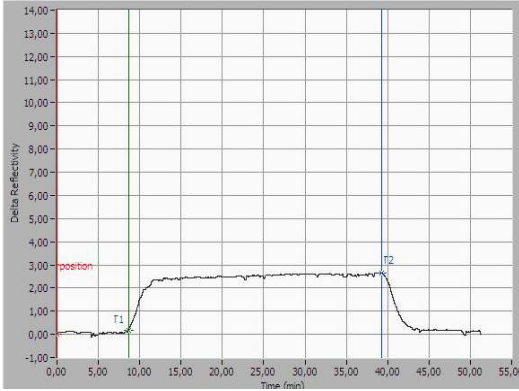
Şekil 17 ve Şekil 18 birlikte incelendiğinde CAP derişimi arttıkça ΔR derişimlerinin de arttığı görülmektedir. Şekil 18' de ise bütün sensogramların bir arada verilmesi verilerin bir arada incelemesini kolaylaştırmıştır.



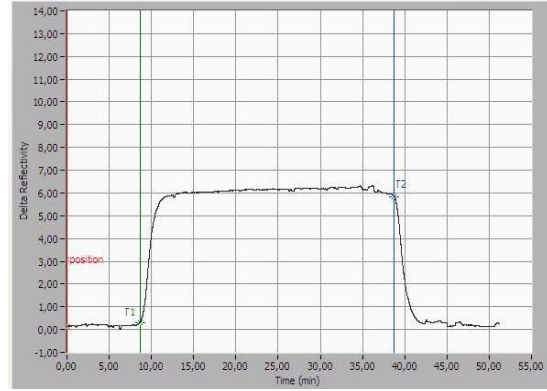
(a) 0.155 nM



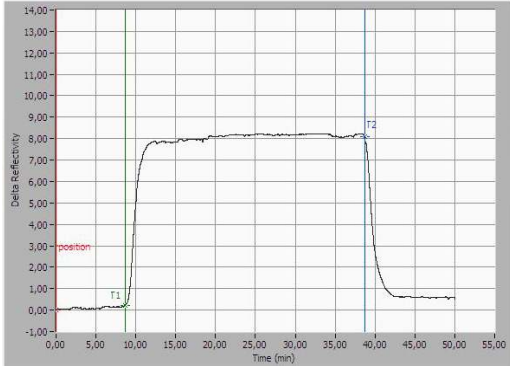
(b) 0.310 nM



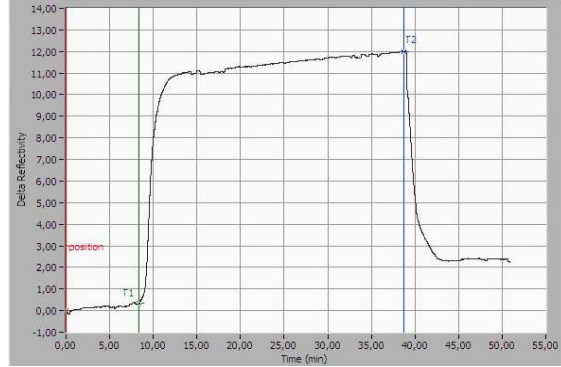
(c) 0.619 nM



(d) 1.238 nM



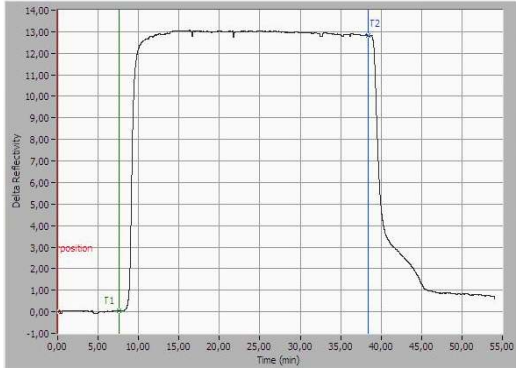
(e) 1.858 nM



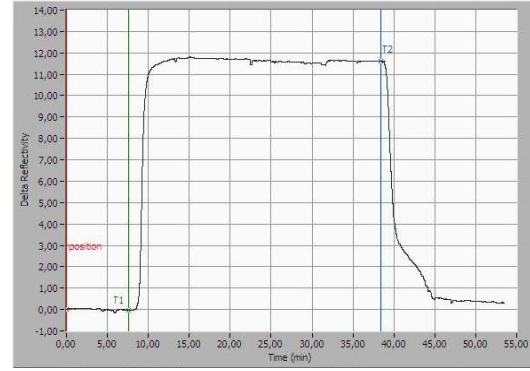
(f) 2.477 nM

Şekil 17. Kloramfenikol çözeltilerinin her birinin kloramfenikol baskılanmış SPR nanosensörden elde edilen zamana karşı ΔR değerlerine ait sensorgramları

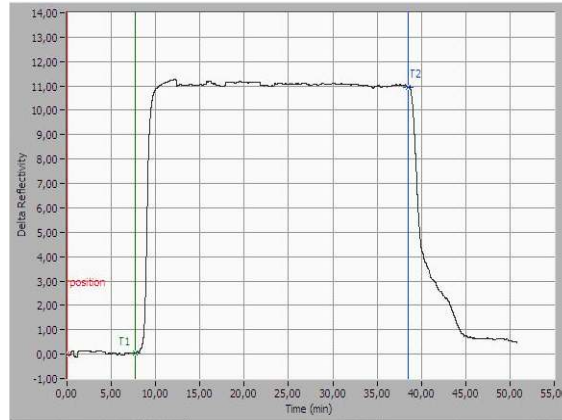
Şekil 17'nin devamı



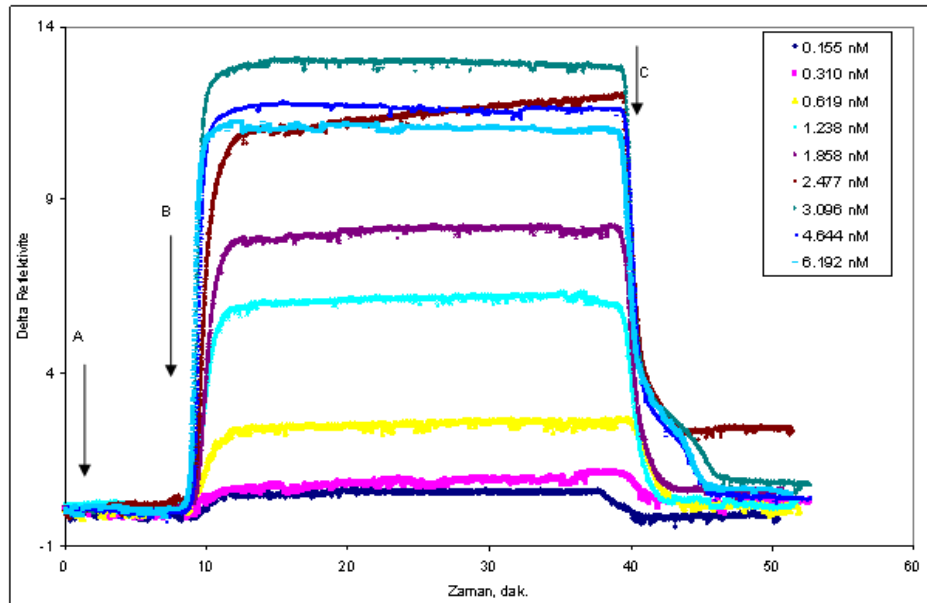
(g) 3.096 nM



(h) 4.644 nM

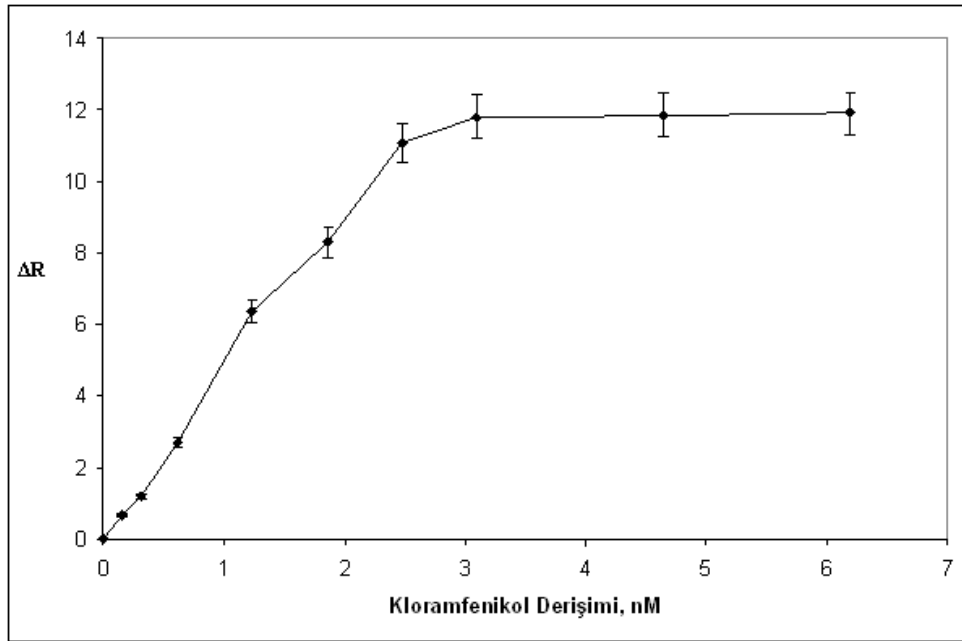


(i) 6.192 nM



Şekil 18. Kloramfenikol çözeltilerinin hazırlanan bütün derişimlerinin (0.155-6.192 nM) zamana karşı ΔR değerlerine ait SPR sensorgramları

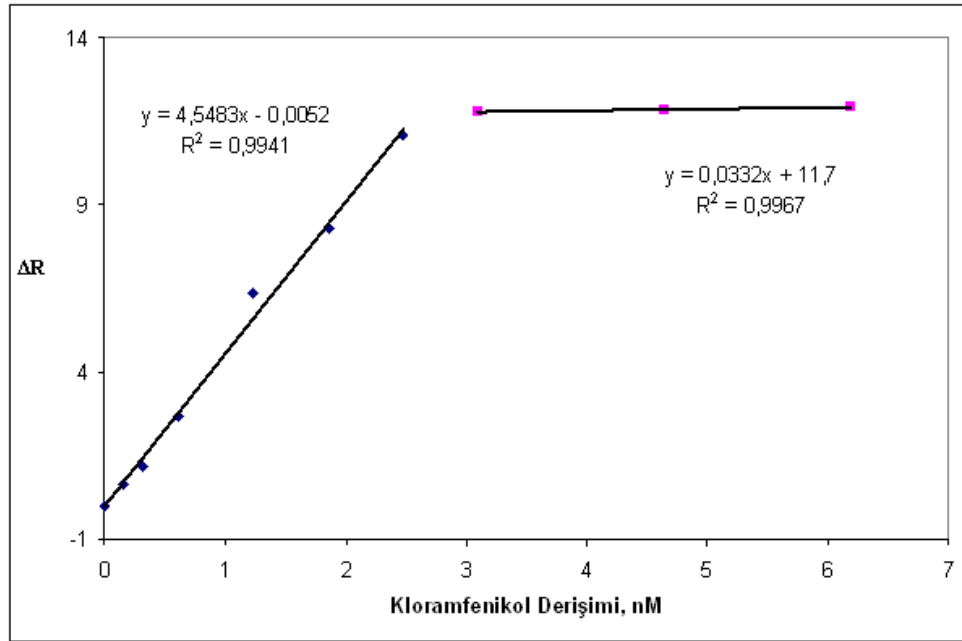
Şekil 19 (a) incelendiğinde kloramfenikol derişimi arttıkça ΔR değerlerinin arttığı görülmektedir. ΔR değeri yaklaşık 11 civarında dengeye ulaşmıştır ve denge derişimi 3.10 nM olarak tespit edildi. Rezonans sinyali, refraktif indeks ve dolayısıyla adsorbe edilen kitleyle doğru orantılıdır. Başka bir deyişle SPR cevabı konsantrasyonla doğru orantılıdır (Arnell vd., 2006). Grosjean vd. (2005)' nin yaptığı bir çalışmada da ΔR ile yumurta lizozimi derişimi arasında korelasyon bulundu. Şekil 19 (b) incelendiğinde ise CAP baskılanmış SPR nanosensörün iki farklı derişim aralığında derişim-sinyal doğrusallığı gösterdiği görülmektedir. 0 - 2.477 nM derişim aralığındaki doğru denklemi $y=4.5483x-0.0052$ olup R^2 değeri 0.9941; 3.096 - 6.192 nM derişim aralığındaki doğru denklemi ise $y=0.032x+11.7$ olup R^2 değeri 0.9967' dir. Bu verilere göre, hazırlanan nanosensör 0 - 2.477 nM derişim aralığında % 99.41; 3.096 - 6.192 nM derişim aralığında ise % 99.67 doğrulukta ölçüm yapmıştır. Bu verilere göre CAP iki farklı bölgeden yüksek afinite ile bağlanmaktadır. Moleküler baskılanmış polimerdeki bölgeler yapı olarak hiçbir zaman tekdüze değildir ve biri yüksek diğeri ise düşük afiniteye sahip en az iki farklı bağlanma bölgesi vardır (García-Calzón ve Díaz-García, 2007).



(a)

Şekil 19. Kloramfenikol derişimi ile ΔR arasındaki ilişki

Şekil 19'un devamı



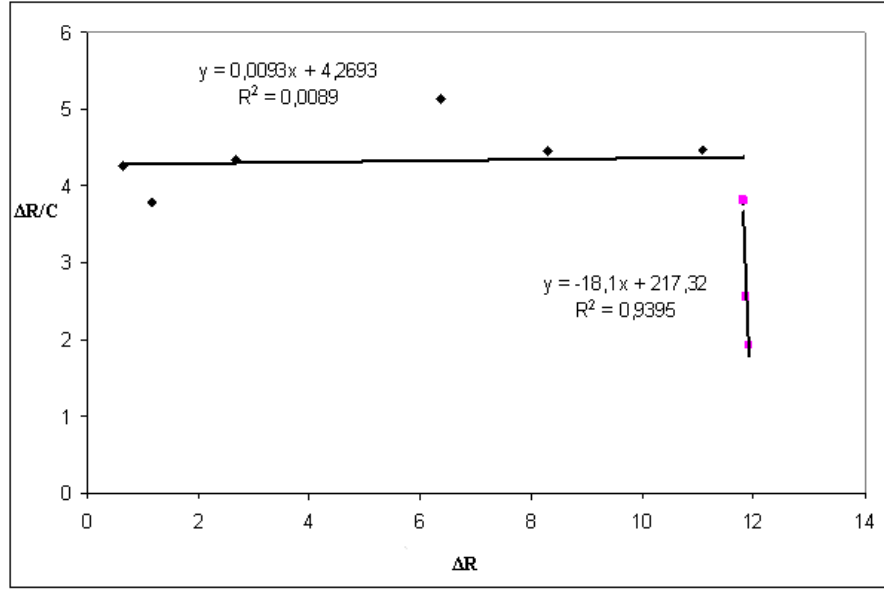
(b)

3.4.1. Denge Analizi ve Bağlanma Kinetik Analiz Sonuçları

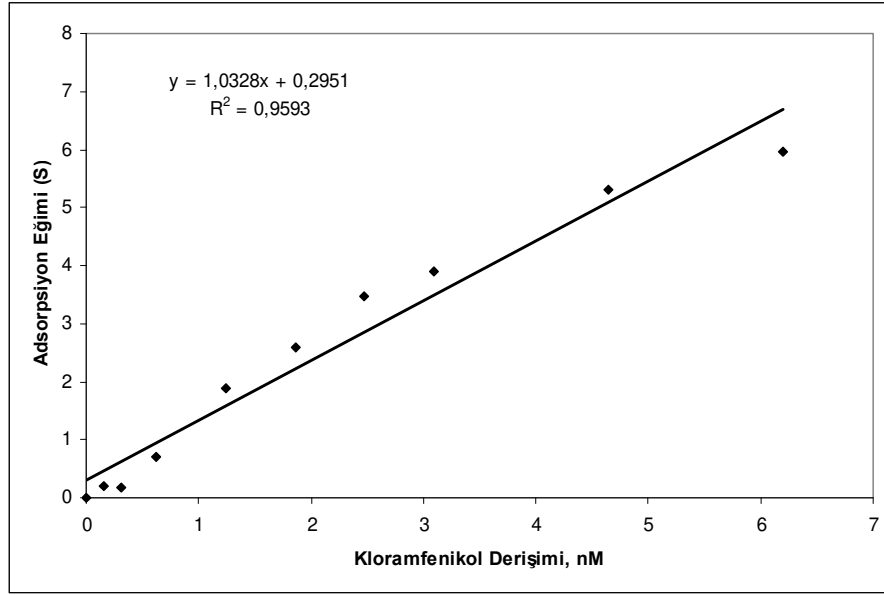
Bağlanma sabitleri aşağıda verilen denge analizi (Scathard) ve bağlanma kinetik analizleriyle belirlendi (Şekil 20). Şekil 20' deki grafiklerden hesaplanan denge analizi ve bağlanma kinetik analizine ait parametreler Tablo 4' te verilmiştir.

Tablo 4. Kinetik hız sabitleri

Denge Analizi (Scatchard)		Bağlanma Kinetik Analizi	
ΔR_{mak}	12.01	k_a 1/nM.s	1.0328
K_A , nM	18.1	k_d 1/s	0.2951
K_D , 1/nM	0.055	K_A , nM	3.5
R^2	0.9395	K_D , 1/nM	0.286
		R^2	0.9593



(a)



(b)

Şekil 20. Kinetik hız sabitlerinin belirlenmesi. (a) Denge analiz yaklaşımı (Scatchard); (b) Bağlanma kinetik yaklaşımı.

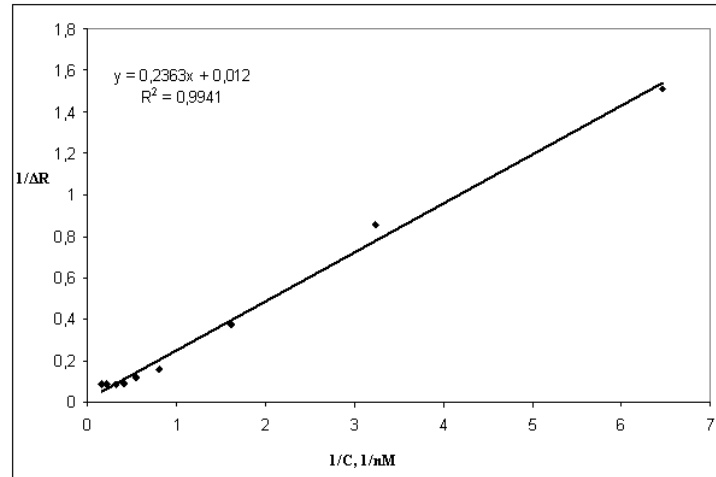
3.4.2. Denge İzoterm Modelleri

Teorikte kinetik modeller, karakteristik adsorpsiyon/desorpsiyon izotermeleri verirler ancak pratikte birçok kinetik modeli ve güvenilir kinetik parametreleri elde etmek zordur (Georgiadis vd., 2000). Çalışmamızda kinetik veriler dört modelle karşılaştırıldı:

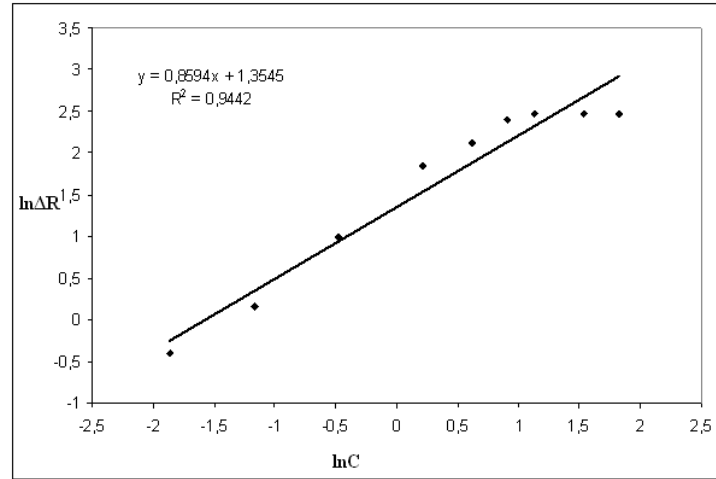
Scatchard	$\Delta R_{\text{denge}} / [C] = K_A (\Delta R_{\text{mak}} - \Delta R_{\text{denge}})$
Langmuir	$\Delta R = \Delta R_{\text{mak}} [C] / K_D + [C]$
Freundlich	$\Delta R = \Delta R_{\text{mak}} [C]^{1/n}$
Langmuir-Freundlich	$\Delta R = \Delta R_{\text{mak}} [C]^{1/n} / K_D + [C]^{1/n}$

ΔR_{mak}	: Maksimum SPR sinyal kayması
ΔR_{denge}	: Denge durumunda SPR sinyal kayması
C	: Analit derişimi, nM
K_A	: Bağlanma denge sabiti, nM
K_D	: Ayrılma denge sabiti, 1/nM
1/n	: Freundlich yüzey heterojenite indeksi

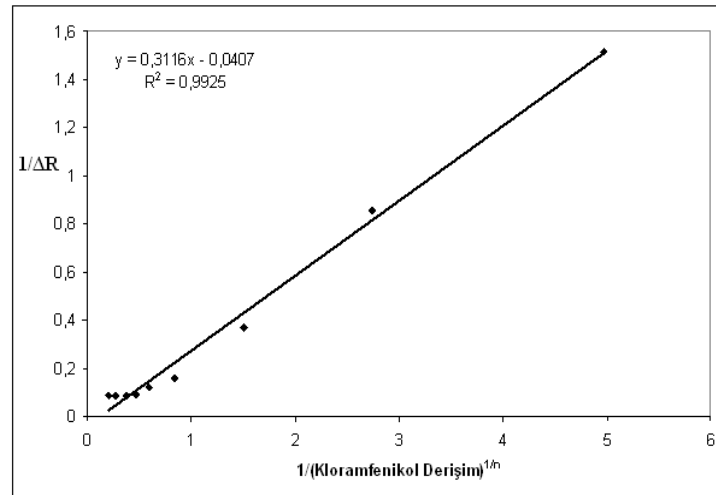
Langmuir, Freundlich, ve Langmuir-Freundlich (LF) izoterm modellerine ilişkin grafikler Şekil 21' de verilmiştir.



(a) Langmuir



(b) Freundlich



(c) Langmuir-Freundlich

Şekil 21. Denge adsorpsiyon izoterm modelleri a) Langmuir, b) Freundlich, c) Langmuir-Freundlich

Her üç izoterm modelinden elde edilen parametreler Tablo 5'te verilmiştir. Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich izoterm modellerinin R^2 değerleri incelendiğinde en yüksek R^2 değerinin Langmuir modelinde (0.9941) tespit edildiği görülmektedir (Şekil 21a). Bu sonuç da elde edilen verilerin Langmuir modeli ile en uyumlu olduğunu göstermektedir. Langmuir modeli, adsorpsiyonun adsorbent üzerindeki homojen bölgelerde gerçekleştiğini ve bir molekül bir bölgeye yerleşmişse bu bölgede başka bir adsorpsiyonun gerçekleşmeyeceğini varsayar (Baskaralingam vd., 2006).

Tablo 5. Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich parametreleri

Langmuir		Freundlich		Langmuir-Freundlich	
ΔR_{mak} , nM	83.33	ΔR_{mak} , nM	3.87	ΔR_{mak} , nM	24.57
K_D , 1/nM	19.69	1/n	0.8594	1/n	0.8594
K_A , nM	0,051	R^2	0.9442	K_D , ml/ μ g	7.656
R^2	0.9941			K_A , nM	0,131
				R^2	0,9925

3.5. Seçicilik Analiz Sonuçları

Baskılama etkinliğinin belirlenmesinin en doğru yöntemi baskılanmış maddelerin dağılım katsayılarının ve seçicilik katsayısının hesaplanmasıdır. Dağılım katsayısı; denge durumunda hedef molekülün MIP'taki miktarının sıvı fazda kalan miktarına oranıdır. Seçicilik katsayısı ise baskılanmış materyalin dağılım katsayısının baskılanmamış durumuna oranıdır (Xie vd., 2008). Dağılım oranı, analitik ayırma işlemlerinde oldukça önemli bir parametredir. Denge durumunda analitin iki fazdaki konsantrasyonu hakkında fikir vermektedir. Ayrıca faz oranları (polimerin sıvı faza oranı) değiştiğinde maddenin dağılımının nasıl değişeceği konusunda da fikir vermektedir (Tóth vd., 2007). Seçicilik, spesifik bağlanma baskın olduğu zaman ki bu da kalıp molekül ve MIP polimerin doğru bir şekilde eşleşmesi ile gerçekleşir (Vaihinger, 2002). Kontrol deneyleri moleküler olarak baskılanmamış referans polimerle ve yapısal benzerlik gösteren FAP ve TAP molekülleriyle gerçekleştirildi. Kloramfenikolün 0.155 nM, 0.619 nM, 1.858 nM, 3.096

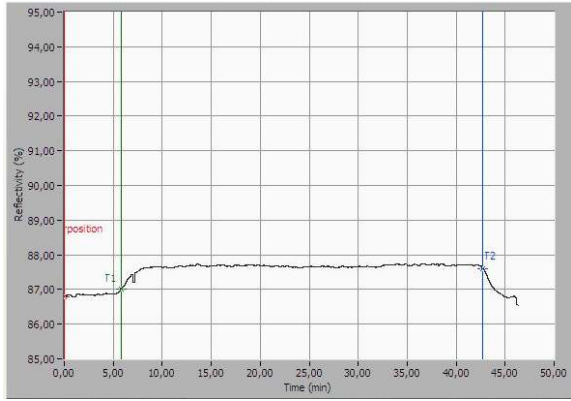
nM ve 6.192 nM derişimlerinin NIP polimerindeki SPR sensogramları (Şekil 22, Şekil 23, Şekil 24 ve Şekil 25'te verilmiştir).



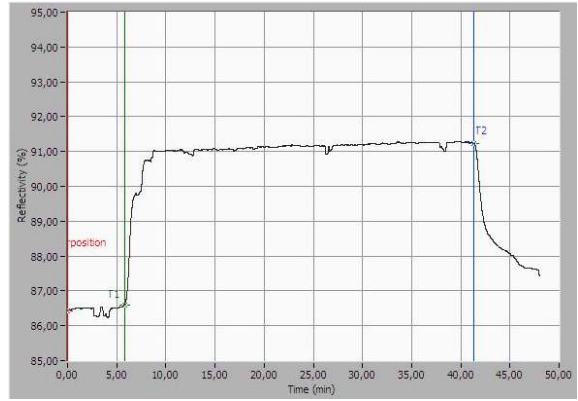
(a) 0.155 nM



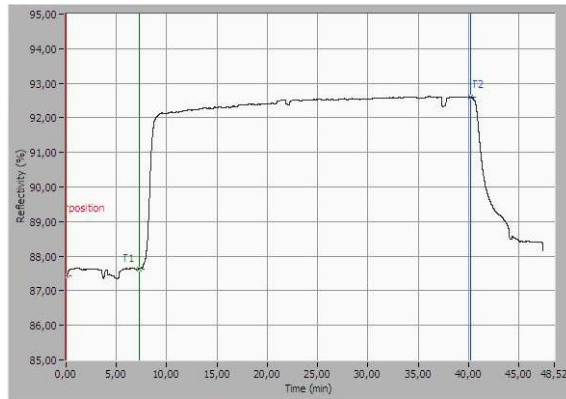
(b) 0.619 nM



(c) 1.858 nM

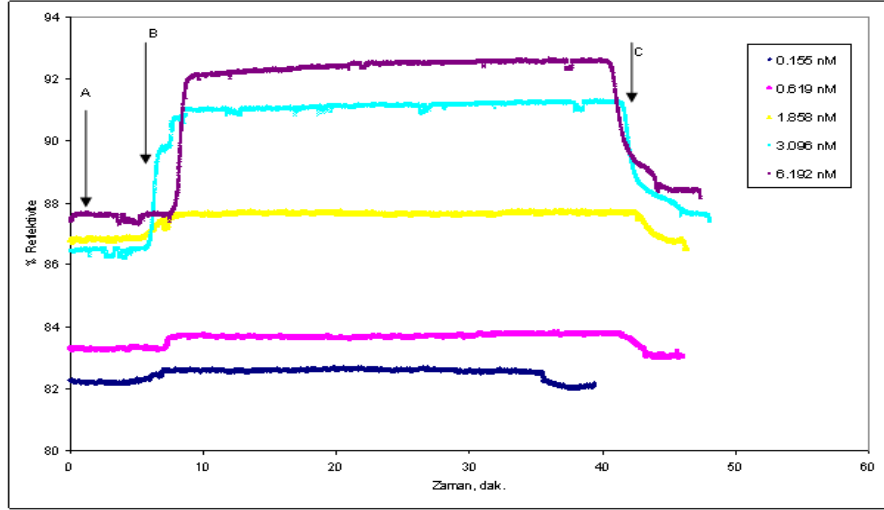


(d) 3.096 nM



(e) 6.192 nM

Şekil 22. CAP molekülünün moleküler baskılanmamış polimerde (NIP) zamana karşı % R değerlerine ait sensogramlar



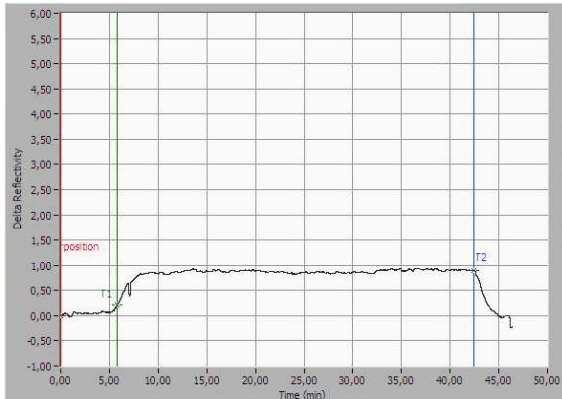
Şekil 23. Kloramfenikol çözeltilerinin 0.155; 0.619; 1.858; 3.096 ve 6.192 nM derişimlerinde moleküler baskılanmamış polimerde (NIP) zamana karşı %R değerlerine ait SPR sensorgramlarının bir arada gösterilmesi



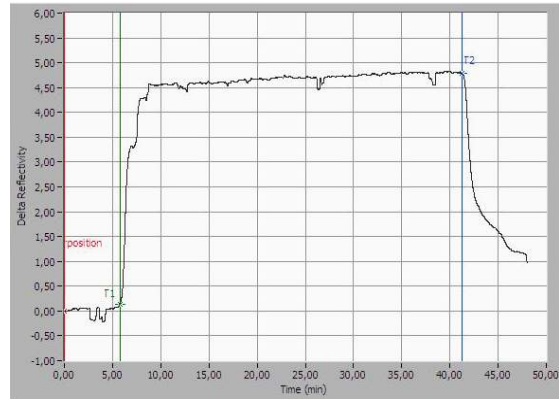
(a) 0.155 nM



(b) 0.619 nM



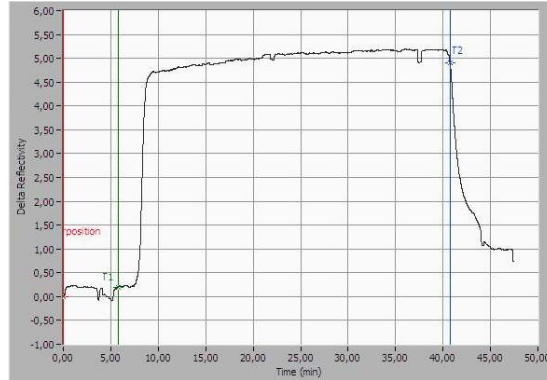
(c) 1.858 nM



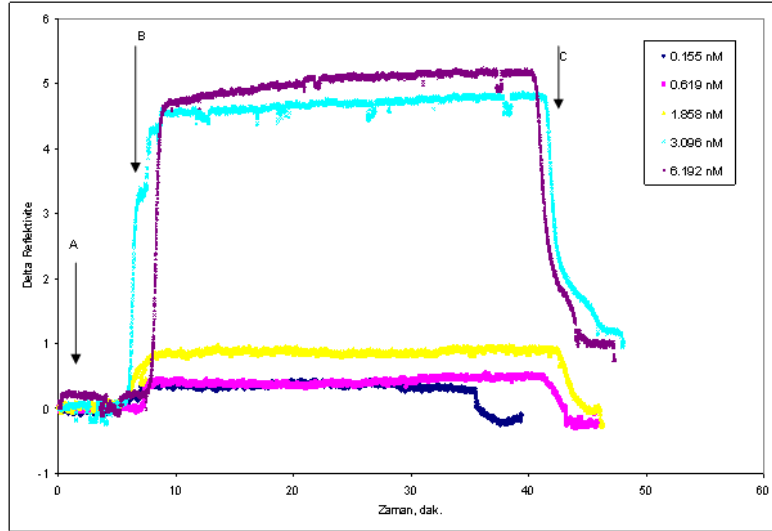
(d) 3.096 nM

Şekil 24. CAP molekülünün moleküler baskılanmamış polimerde (NIP) zamana karşı ΔR değerlerine ait sensogramlar

Şekil 24'ün devamı



(e) 6.192 nM

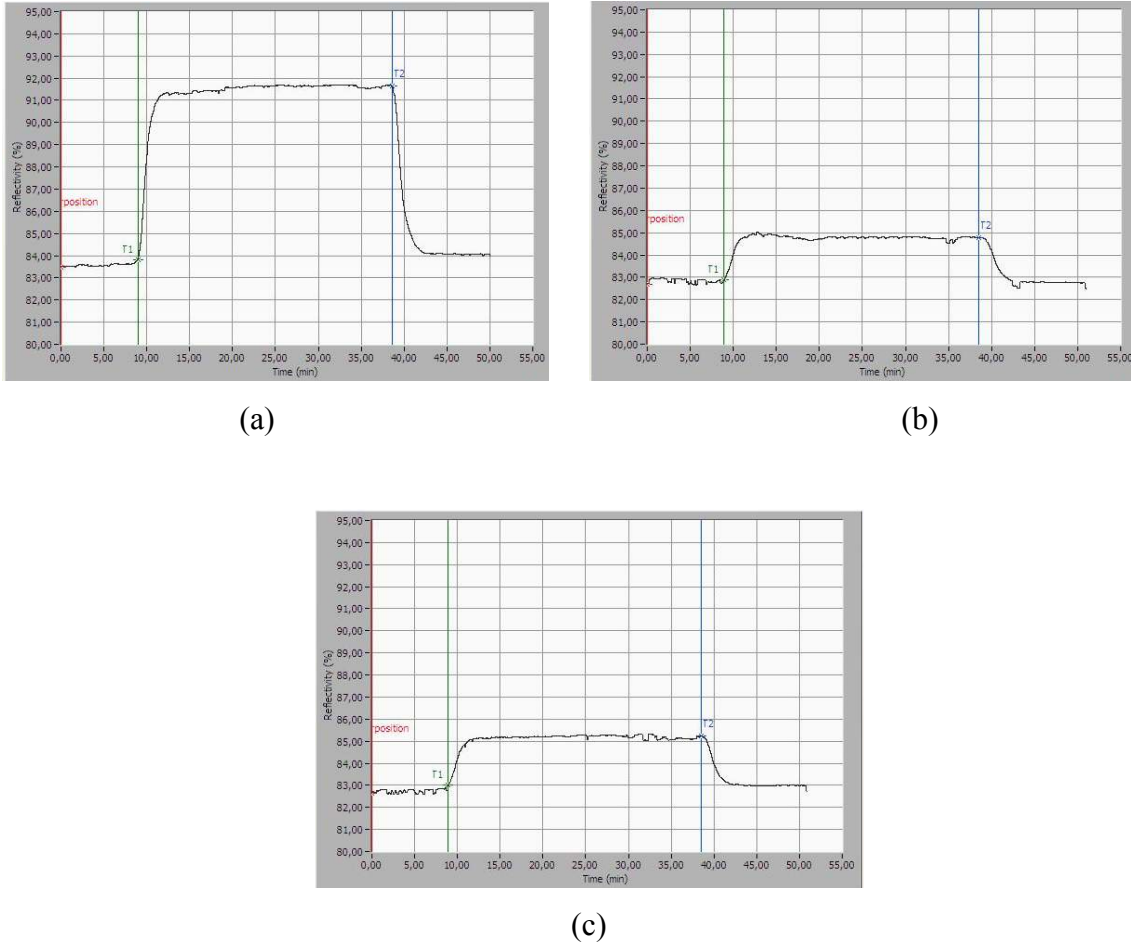


Şekil 25. Kloramfenikol çözeltilerinin 0.155; 0.619; 1.858; 3.096 ve 6.192 nM derişimlerinde moleküler baskılanmamış polimerde (NIP) zamana karşı ΔR değerlerine ait SPR sensorgramlarının bir arada gösterimi

Şekil 22, Şekil 23, Şekil 24 ve Şekil 25 birlikte incelendiğinde beklenen bir sonuç olarak baskılanmamış polimerlerde çalışılan derişimlerde alınan sinyal değerlerinin MIP polimerlerine göre oldukça düşük olduğu görülmektedir. NIP polimerinde alınan sinyallerin ise spesifik olmayan bağlanma bölgelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Piletsky vd. 'nin (1999) yaptıkları bir çalışmada referans polimer olarak seçilen NIP polimerinin karboksil gruplarının rasgele dizilime sahip olduğu ve bunun da spesifik olmayan bağlanma bölgelerine sebep olduğu bildirilmiştir. Moleküler baskılanmamış bir

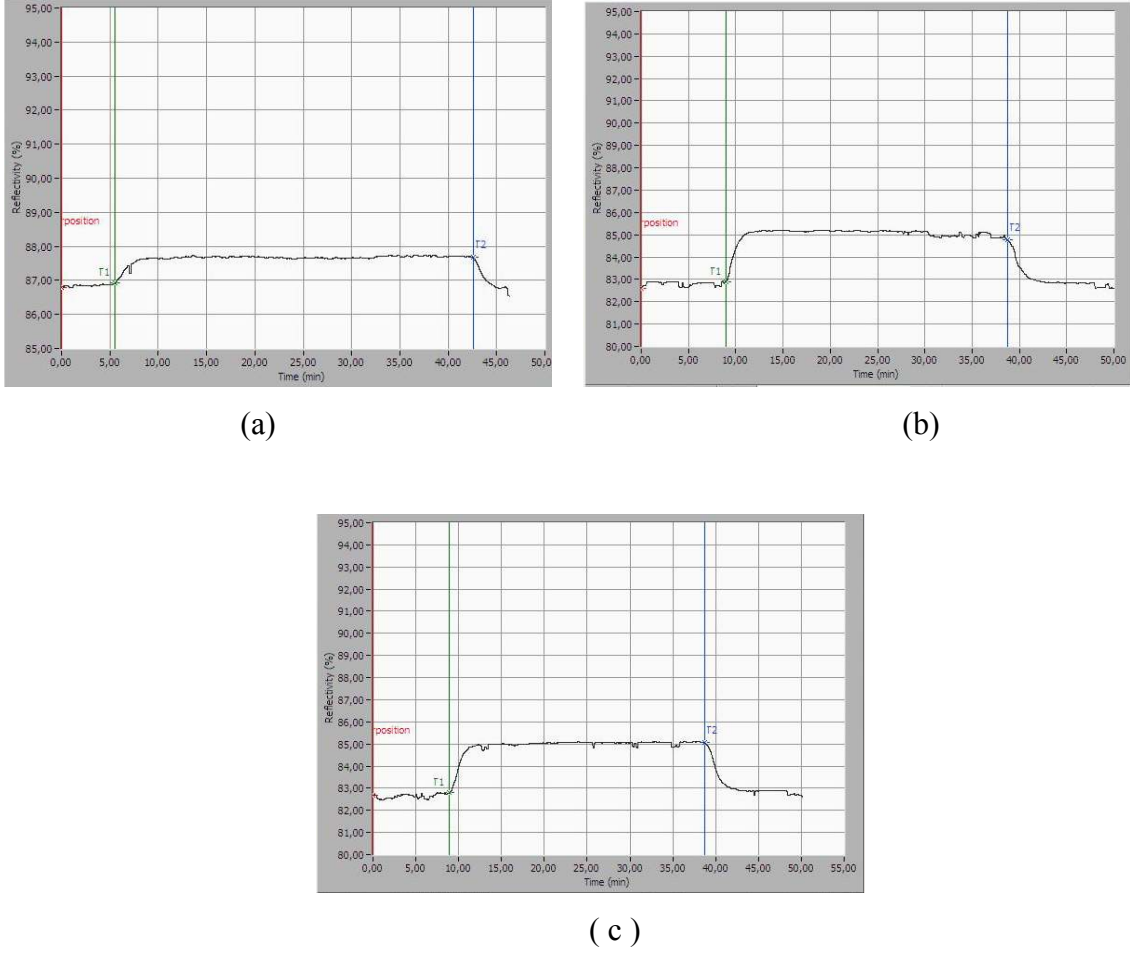
polimere herhangi bir kalıp molekülün bağlanması sebebi spesifik olmayan adsorpsiyondur (Vaihinger vd., 2002).

Yarışmacı bileşen olarak seçilen TAP ve FAP bileşenlerinin CAP molekülü ile karşılaştırmalı olarak MIP polimerinde zamana karşı R değerlerine ait sensogramlar Şekil 26'da verilmiştir:



Şekil 26. Kloramfenikol baskılanmış nanosensör yüzeyinden geçirilen 1.858 nM derişimindeki CAP, FAP ve TAP çözeltilerine ait zamana karşı % R değerlerine ait SPR sensogramlar (a) CAP-MIP (b) FAP-MIP (c) TAP-MIP

Yarışmacı bileşen olarak seçilen TAP ve FAP bileşenlerinin CAP molekülü ile karşılaştırmalı olarak NIP polimerinde zamana karşı % R değerlerine ait sensogramlar Şekil 27'de verilmiştir.



Şekil 27. Kloramfenikol baskılanmamış nanosensör yüzeyinden geçirilen 1.858 nM derişimindeki CAP, FAP ve TAP çözeltilerine ait zamana karşı % R değerlerine ait SPR sensogramlar (a) CAP-NIP (b) FAP-NIP (c) TAP-NIP

Şekil 26 ve Şekil 27 incelendiğinde daha önce de ifade edildiği gibi kloramfenikolün MIP polimerine adsorpsiyonunun NIP polimerinden daha yüksek olduğu görülmektedir. Yarışmacı bileşen olarak seçilen FAP ve TAP antibiyotiklerinin hem MIP hem de NIP polimerindeki % R değerleri oldukça düşüktür. Tablo 6 incelendiğinde kloramfenikolün dağılma katsayısının (K_d) diğer antibiyotiklere göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Yarışmacı bileşenler için moleküler baskılanmış polimerde (MIP) hesaplanan seçicilik katsayıları (k) TAP ve FAP için sırasıyla 3.54 ve 3.26; moleküler baskılanmamış (NIP) polimerde hesaplanan seçicilik katsayıları TAP ve FAP için sırasıyla 0.40 ve 0.39'dur. Bu veriler, kloramfenikolün diğer yarışmacı bileşenlere göre MIP nanopartiküllere daha çok adsorbe olduğunu göstermektedir. Bağlı seçicilik katsayıları değerlendirildiğinde ise kloramfenikol baskılanmış nanopartikülün kloramfenikolü

tiyamfenikole göre 8.86 kat, florfenikole göre 8.36 kat daha yüksek seçicilikte tanınmaktadır. Kloramfenikol ve diğer yarışmacı bileşenlerin molekül yapıları birbirlerine çok yakın olduğu dikkate alınır 8.86 ve 8.36 katlık bir farkın önemli olduğu düşünülmektedir. Bağlı seçicilik katsayısının yüksek olması, kloramfenikol baskılanmış tanıma bölgelerinin afinitesini göstermektedir. Balık dokusundan kloramfenikolün etkin bir şekilde tespit edilmesi amacıyla yapılan bir çalışmada CAP baskılanmış MIP polimeri, miniemülsiyon polimerizasyonu yöntemiyle hazırlanmış ve dedeksiyon amaçlı olarak da HPLC kullanılmıştır. Bu çalışmada CAP baskılanmış polimerinin CAP molekülünü tiyamfenikole göre 2 kat daha yüksek adsorbe ettiği ve dolayısıyla hazırlanan CAP baskılanmış polimerin CAP antibiyotiğini daha yüksek seçicilikle tanıdığı ifade edilmiştir (Guo vd., 2008). Tablo 6 incelenirse TAP ve FAP antibiyotiklerinin MIP' in aktif bölgelerine belli düzeyde tutunduğu görülmektedir. Bu tutunmanın kantitatif düzeyde olmadığı düşünülmektedir. Guo vd.' nin (2008) çalışmasında da TAP molekülünün MIP polimerinde bir dereceye kadar tutunduğu ve bu tutunmanın kantitatif düzeyde olmadığı belirtilmektedir. Şekil 27 incelendiğinde NIP polimerinde CAP, FAP ve TAP antibiyotiklerinin sinyal verdikleri görülmektedir. Ancak bu sinyaller spesifik olmayan bağlanmalardan kaynaklanmaktadır. Moleküler baskılanmış polimerde spesifik ve spesifik olmayan bağlanma bölgeleri vardır fakat NIP polimerinde sadece spesifik olmayan bağlanma bölgeleri vardır. Bu nedenle NIP polimeri CAP ve TAP molekülleriyle interaksiyona girmektedir ve aynı zamanda MIP, spesifik bölgelerden dolayı CAP molekülüne yüksek afinite göstermiştir. (Guo vd., 2008).

Tablo 6. Kloramfenikol antibiyotiğine göre FAP ve TAP antibiyotiklerinin K_d , k ve k' değerleri

	MIP		NIP		k'
	$\Delta R(K_d)$	k	$\Delta R(K_d)$	k	
CAP	8.2837	-	0.9807	-	-
TAP	2.3385	3.54	2.4469	0.40	8.86
FAP	2.5386	3.26	2.4938	0.39	8.36

3.6. Değişik Bal Çeşitlerinden Yapılan Kinetik Analizler

Kloramfenikol baskılanmış SPR nanosensörün gıda güvenliği amaçlı kullanımının test edilmesi amacıyla gıda matriksi olarak bal seçilmiş ve ballarda CAP tayini için çalışmamız kapsamında hazırlanan nanosensör kullanıldı. Hazırlanan bal ekstraktları nanosensörle etkileştirdi ve SPRview yazılımı kullanılarak kinetik veriler alındı. 5 çeşit balda yapılan analizlerin sensogramlarından ΔR değerleri Langmuir denkleminde yerine konuldu ve baldaki CAP miktarları hesaplandı. Türk Gıda Kodeksinin 2002/30 sayılı Hayvansal Kökenli Gıdalarda Veteriner İlaçları Maksimum Kalıntı Limitleri Tebliği'ne göre kloramfenikol yasaklı maddeler grubundadır. Yasaklı maddeler için maksimum kalıntı limiti (MRL) belirtilmemektedir. Avrupa Komisyonunun 2003/181/EC nolu direktifine göre hayvansal orijinli gıdalarda minimum istenen performans limiti $0.3 \mu\text{g/kg}$ 'dir . Gürültü sinyalinin 3 katı olarak tanımlanan tayin limitinin belirlenmesi için denge tamponu SPR sensörle etkileştirildi ve elde edilen ΔR değerlerinin ortalaması alındı ve Langmuir denkleminde yerine konularak tayin limiti $0,04 \mu\text{g/kg}$ olarak bulundu. 5 çeşit baldan yapılan analizlerde ise ballardaki CAP miktarları tayin limitinin altında kalmıştır.

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

❖ MAH monomeri, L-histidin metil esterin metakriloil klorür ile reaksiyonu sonucu elde edilmiştir. Elde edilen MAH monomeri FTIR analizi ile karakterize edilmiştir. FTIR spektrumunda MAH monomerine ait karakteristik 1724 cm^{-1} 'de karbonil bandı; 1558 cm^{-1} ve 1651 cm^{-1} amid gerilme titreşim bandları ve 3500 cm^{-1} civarında geniş hidroksil bandları görülmüştür.

❖ Kloramfenikol baskılanmış nanopartiküllerin karakterizasyonu amacıyla zeta boyut analizörü kullanılmıştır. Partiküllerin boyutu 52 nm olarak tespit edilmiştir.

❖ Kloramfenikol baskılanmış ve baskılanmamış SPR nanosensör yüzeyinin karakterizasyonu amacıyla AFM ve temas açısı ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

❖ Atomik kuvvet mikroskopisi analiz sonucuna göre CAP baskılanmış nanosensörün yüzey derinliği 48.48 nM ve CAP baskılanmamış nanosensörün yüzey derinliği ise 40.71 nM olarak tespit edilmiştir. Bu sonuca göre altın kaplı ve nanopartikül tutturulmuş SPR sensör yüzeyinde pürüzlülüğün oluştuğu, tek tabaka şeklinde yüzeyi kapladığı ve polimerizasyonun gerçekleştiği sonucuna ulaşılmıştır.

❖ Yüzeyi modifiye edilmemiş, CAP baskılanmış ve baskılanmamış çiplerin yüzey karakterizasyonu amacıyla yapılan temas açısı ölçünlerinde modifiye edilmemiş sensörün temas açısı 79.3, CAP baskılanmış sensörün temas açısı 73.4 ve CAP baskılanmamış sensörün temas açısı ise 73.1 derece olarak tespit edilmiştir. CAP baskılamasıyla temas açısı 73.4'e NIP polimerinde ise 73.1'e düşmüştür. Bu da çip yüzeyinin polimer ile kaplandığını ve hidrofilik özelliğin arttığını göstermiştir. Bunun sebebi, hem MIP hem de NIP sensör yüzeyinde hidrofilik özellikteki MAH monomerinin kullanılmasıdır. MAH monomerinin yapısında histidin amino asidi vardır ve bu da yüzeyi hidrofilik yapmaktadır. Dolayısıyla MAH monomerinin yüzeye tutturulması temas açısını düşürmüştür.

❖ SPR sinyali ile kloramfenikol derişimi arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için 0.155-6.192 nM arasındaki derişimlerde standart kloramfenikol kullanılarak bir seri çözelti hazırlanmış ve SPR nanosensör ile etkileştirilmiştir. % refleksivite değerleri CAP konsantrasyonuyla doğru orantılı olarak artmıştır. Ayrıca ΔR değerlerinin kullanılarak da sensogramlar elde edilmiştir. ΔR anlık refleksivite değeri ile başlangıç % refleksivite değeri arasındaki farkı ifade etmekte ve verilerin daha duyarlı değerlendirilmesine olanak

vermektedir. ΔR 'ye karşı konsatrasyon birimlerinin bulunduğu SPR sensogramlarında da CAP konsantrasyonu arttıkça ΔR değeri de artmıştır.

❖ Ölçümler sırasında önce denge tamponu verilmiştir. Daha sonra sistem dengeye ulaşmaya kadar sensör sisteminden CAP çözeltisi geçirilmiştir. Sonrasında desorpsiyon ve rejenerasyon işlemleri gerçekleştirilmiş ve bu işlem 5 dk sürmüştür. Ölçümlerde sistemin dengeye ulaşma süresi 40 dk olarak tespit edilmiştir.

❖ ΔR değeri yaklaşık 11 civarında dengeye ulaşmıştır ve denge derişimi 3.10 nM olarak tespit edilmiştir. CAP baskılanmış sensör, iki farklı derişim aralığında sinyal doğrusallığı göstermiştir. 0 - 2.477 nM derişim aralığındaki doğru denklemi $y=4.5483x-0.0052$ olup R^2 değeri 0.9941; 3.096 - 6.192 nM derişim aralığındaki doğru denklemi ise $y=0.032x+11.7$ olup R^2 değeri 0.9967 bulunmuştur. Bu verilere göre, hazırlanan nanosensör 0 - 2.477 nM derişim aralığında % 99.41; 3.096 - 6.192 nM derişim aralığında ise % 99.67 doğrulukta ölçüm yapmıştır ve CAP iki farklı bölgeden yüksek afinite ile bağlanmıştır.

❖ Kinetik veriler Scathard, Langmuir, Freundlich, Langmuir-Freundlich modelleriyle karşılaştırılmıştır. Bu izoterm modellerinin R^2 değerleri incelendiğinde en yüksek R^2 değerinin Langmuir modelinde (0.9941) tespit edilmiştir. Bu sonuç da elde edilen verilerin Langmuir modeli ile en uyumlu olduğunu göstermektedir. Langmuir modeli, adsorpsiyonun adsorbent üzerindeki homojen bölgelerde gerçekleştiğini ve bir molekül bir bölgeye yerleşmişse bu bölgede başka bir adsorpsiyonun gerçekleşmeyeceğini varsaymaktadır.

❖ Kontrol deneyleri moleküler olarak baskılanmamış referans polimerle ve yapısal benzerlik gösteren FAP ve TAP molekülleriyle gerçekleştirilmiştir. Baskılama etkinliğinin belirlenmesinde seçicilik önemli bir kriterdir. Seçicilik deneylerinde FAP ve TAP moleküllerinin seçilmesinin nedeni moleküler grupların kloramfenikole benzerlik göstermelerindendir. Baskılanmamış polimerlerde çalışılan derişimlerde alınan sinyal değerlerinin MIP polimerlerine göre oldukça düşük olduğu görülmektedir. NIP polimerinde alınan sinyallerin ise spesifik olmayan bağlanma bölgelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

❖ Kloramfenikolün MIP polimerine adsorpsiyonunun NIP polimerinden daha yüksek olduğu görülmüştür. Yarışmacı bileşen olarak seçilen FAP ve TAP antibiyotiklerinin hem MIP hem de NIP polimerindeki % R değerleri oldukça düşük bulunmuştur.

❖ Kloramfenikolün dağılma katsayısının (K_d) diğer antibiyotiklere göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Yarışmacı bileşenler için moleküler baskılanmış polimerde (MIP) hesaplanan seçicilik katsayıları (k) TAP ve FAP için sırasıyla 3.54 ve 3.26; moleküler baskılanmamış (NIP) polimerde hesaplanan seçicilik katsayıları TAP ve FAP için sırasıyla 0.40 ve 0.39'dur. Bu veriler, kloramfenikolün diğer yarışmacı bileşenlere göre MIP nanopartiküllere daha çok adsorbe olduğunu göstermektedir.

❖ Bağlı seçicilik katsayıları değerlendirildiğinde ise kloramfenikol baskılanmış nanopartikülün kloramfenikolu tiyamfenikole göre 8.86 kat, florfenikole göre 8.36 kat daha yüksek seçicilikte tanınmaktadır. Bağlı seçicilik katsayısının yüksek olması, kloramfenikol baskılanmış tanıma bölgelerinin afinitesini göstermektedir.

❖ NIP polimerinde CAP, FAP ve TAP antibiyotiklerinin sinyal verdikleri görülmüştür ancak bu sinyaller spesifik olmayan bağlanmalardan kaynaklanmaktadır. Moleküler baskılanmış polimerde spesifik ve spesifik olmayan bağlanma bölgeleri vardır fakat NIP polimerinde sadece spesifik olmayan bağlanma bölgeleri vardır.

❖ Kloramfenikol baskılanmış SPR nanosensörün gıda güvenliği amaçlı kullanımının test edilmesi amacıyla 5 çeşit balda CAP tayini yapılmıştır. Ballardaki CAP miktarı, tayin limiti olarak belirlenen $0,04 \mu\text{g/kg}$ 'ın altında kalmıştır.

5. KAYNAKLAR

- Ahmak, A., Ramakrishnan, A., McLean, M.A. ve Breau, A.P., 2003. Use of Surface Plasmon Resonance Biosensor Technology As a Possible Alternative to Detect Differences in Binding of Enantiomeric Drug Compounds to Immobilized Albumins, Biosensors and Bioelectronics, 18, 4, 399-404.
- Ansell R.J., Kriz, D. ve Mosbach, K., 1996. Molecularly Imprinted Polymers for Bioanalysis: Chromatography, Binding Assays and Biomimetic Sensors. Current Opinion Biotechnology, 7, 89-94.
- Arnell, R., Ferraz, N. ve Fornstedt, T., 2006. Analytical Characterization of Chiral Drug-Protein Interactions: Comparison Between the Optical Biosensor (Surface Plasmon Resonance) Assay and the HPLC Perturbation Method, Anal. Chem., 78, 1682-1689.
- Ateş, Z. ve Güven, O., 2009. Radiation-Induced Molecular Imprinting of D-glucoseontopoly (2-hydroxyethyl methacrylate) Matrices Using Various Crosslinking Agents, Radiation Physics and Chemistry, In Press.
- Baggiani, C., Giraudi, G., Trotta, F., Giovannoli, C. ve Vanni, A., 2000. Chromatographic Characterization of a Molecular Imprinted Polymer Binding Cortisol, Talanta, 24, 71-75.
- Beusink, J.B., Lokate, A.M.C., Besselink, G.A.J., Pruijn, G.J.M., ve Schasfoort, R.B.M., 2008. Angle-scanning SPR Imaging for Detection of Biomolecular Interactions on Microarrays, Biosensors and Bioelectronics, 23, 6, 839-844.
- Baskaralingam, P., Pulikesi, M., Elango, D., Ramamurthi, V. ve Sivanesan, S., 2006. Adsorption of Acid Dye onto Organobentonite. Journal of Hazardous Materials, B128, 138-144.
- BIAtchnology Handbook version A, 1998, Biacore AB.
- Butler, M. A.; Ricco, A. J. ve Baughman, R. J., 1990. Hg Adsorption on Optically Thin Au Films J. Appl. Phys., 67, 4320-4326.
- Caide, X. ve Sui, S.F., 2000. Characterization of Surface Plasmon Resonance Biosensor. Sensors and Actuators B: Chemical, 66, 1-3, 174-177.
- Chang, C.C., Chiu, N.F., Lin, D.S., Chu-Su, Y., Liang, Y.H. ve Lin, C.W., 2010. High-Sensitivity Detection of Carbohydrate Antigen 15-3 Using a Gold/Zinc Oxide Thin Film Surface Plasmon Resonance-Based Biosensor, Anal. Chem., 82, 4, 1207-1212.

- Chetanworld. Synthesis and Characterization of MIPs - a Viable Commercial Venture. <http://www.pharmainfo.net/reviews/synthesis-and-characterization-mips-viable-commercial-venture> 16 Ocak 2010
- Cormack, P.A.G. ve Mosbach, K., 1999. Molecular imprinting: Recent Developments and the Road Ahead, Reactive & Functional Polymers, 41, 115–124.
- Cormack, P. A.G ve Elorza, A.Z., 2004. Molecularly Imprinted Polymers: Synthesis and Characterisation, Journal of Chromatography B, 804, 173–182.
- de Prada, A.G-V., Martínez-Ruiz, P., Reviejo, A.J. ve Pingarrón, J.M., 2005. Solid-phase Molecularly Imprinted on-line Preconcentration and Voltammetric Determination of Sulfamethazine in Milk, Analytica Chimica Acta, 539, 125-132.
- Diltemiz, S.E., 2006. DNA'yı Tanıma Bölgelerine Sahip Moleküler Baskılanmış Polimer Tekniğine Dayalı Biyosensör Geliştirilmesi, Doktora Tezi, A.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Djozan, D. ve Ebrahimi, B., 2008. Preparation of New Solidphase Micro Extraction Fiber on the Basis of Atrazine Molecular Imprinted Polymer: Application for GC and GC/MS Screening of Triazine Herbicides in Water, Rice and Onion. Analytical Chimica Acta, 616, 152-159.
- Dostálek, J. ve Homola, J., 2006. SPR Biosensors for Environmental Monitoring. Surface Plasmon Resonance Based Sensors. Homola, J.(ed.), 4, 191-206, Springer Berlin Heidelberg.
- Dumonta, V., Huet, A.C, Traynor, I., Elliott, C. ve Delahaut, P., 2006. A Surface Plasmon Resonance Biosensor Assay for the Simultaneous Determination of Thiamphenicol, Florfenicol, Florfenicol Amine and Chloramphenicol Residues in Shrimps, Analytica Chimica Acta, 567, 179–183.
- Earp, R.L. ve Dessy, R.E., 1996. Commercial Biosensors: Applications to Clinical Bioprocess and Enviromental Samples, John Wiley and Sons: New York.
- Ersoz, A., Diltemiz, S.E., Ozcan, A.A, Denizli, A. ve Say, A., 2008. Synergie Between Molecular Imprinted Polymer Based on Solid-Phase Extraction and Quartz Crystal Microbalance Technique for 8-OHdG Sensing, Biosensors and Bioelectronics, 24, 742–747.
- Etemadi, O. ve Yen, T.F., 2007. Surface Characterization of Adsorbents in Ultrasound-assisted Oxidative Desulfurization of Fosil Fuels, Journal of Colloid and Interface Science, 313, 18-25.
- Fish, W.P., 2003. Characterization and Design of a Molecular Imprinted Polymer for Cinchona Alkaloids, Doctor of Philosophy, Seton Hall University, Department of Chemistry and Biochemistry, New Jersey.

- Ferguson, J., Baxter, A., Young, P., Kennedy, G., Elliott, C., Weigel, S., Gatermann, R., Ashwin, H., Stead, S. ve Sharman, M., 2005. Detection of Chloramphenicol and Chloramphenicol Glucuronide Residues in Poultry Muscle, Honey, Prawn and milk using a surface plasmon resonance biosensor and Qflex® kit chloramphenicol, Analytica Chimica Acta, 529, 109-113.
- Garcia-Calzon, J.A. ve Diaz-Garcia, M.E., 2007. Characterization of Binding Sites in Molecularly Imprinted Polymers, Sensors and Actuators B, 123, 1180-1194.
- Georgiadis, R., Peterlinz, K.P. ve Peterson, A.W., 2000. Quantitative Measurements and Modeling of Kinetics in Nucleic Acid Monolayer Films Using SPR Spectroscopy, J. Am. Chem. Soc., 122, 3166-3173.
- Grosjean, L., Cherif, B., Mercey, E., Roget, A., Levy, Y., Marche, P.N., Villiers, M.B. ve Livache, T., 2005. A Polypyrrole Protein Microarray for Antibody-Antigen Interaction Studies Using a Label-Free Detection Process, Analytical Biochemistry, 347, 193-200.
- Gryczynski, I., Malicka, J., Gryczynski, Z. ve Lakowicz, J.R., 2004. Surface Plasmon-Coupled Emission with Gold Films. J. Phys. Chem. B, 108, 12568-12574.
- Guiochon, G., 2007. Monolith Columns in High-Performance Liquid Chromatography. J. Chromatography A, 1168, 101-168.
- Guo, L., Guan, M., Zhao, C. ve Zhang, H., 2008. Molecularly Imprinted Matrix Solid-Phase Dispersion for Extraction of Chloramphenicol in Fish Tissues Coupled with High Performance Liquid Chromatography Determination. Anal. Bioanal. Chem., 392, 1431-1438.
- Gümüşderelioğlu, M., Biyomimetik Moleküller, <http://www.biyolojiegitim.yyu.edu.tr/mk/bmi/bm.htm> 17 Ocak 2010.
- Haupt, K. ve Mosbach, K., 1998. Plastic Antibodies: Developments and Applications, Trends in Biotechnology, 16, 11, 468-475.
- Haupt, K. ve Mosbach, K., 2000. Molecularly Imprinted Polymers and Their Use in Biomimetic Sensors, Chem Rev., 100, 2495-2504.
- Homola, J., Yee, S.S. ve Gauglitz, G., 1999. Surface Plasmon Resonance Sensors: Review. Sensors and Actuators B 54, 3-15.
- Homola, J., Yee, S.S. ve Myszka, D., 2002. Surface Plasmon Resonance Biosensors, Optical Biosensors, Pages 207-251.
- Homola, J., 2003. Present and Future of Surface Plasmon Resonance Biosensors, Anal Bioanal Chem, 377, 528-539.
- Homola, J., Vaisocherová, H., Dostálek, J. ve Piliarik, M., 2005. Multi-Analyte Surface Plasmon Resonance Biosensing, Methods, 37, 26-36

- Homola, J. ve Piliarik, M. Surface Plasmon Resonance (SPR) Sensors. Surface Plasmon Resonance Based Sensors. Homola, J.(ed.), 4, 45-67, Springer Berlin Heidelberg, 2006.
- Homola, J., 2008. Surface Plasmon Resonance Sensors for Detection of Chemical and Biological Species. Chem. Rev., 108, 462-493.
- Huang, J.F., Zhang, H.J. and Feng, Y.Q.2006. Chloramphenicol Extraction from Honey, Milk, and Eggs Using Polymer Monolith Microextraction Followed by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Determination. J. Agric. Food Chem., 54, 9279-9286.
- Indyk, H.E., 2006. Optical Biosensors: Making Sense of Interactions, Chemistry in New Zealand, Analytical Development Group, Fonterra Research Centre, Waitoa.
- Johnstone, A. ve Turner, M.W., 1997. Immuno-chemistry 2, A Practical Approach, Oxford University Press, Great Clarendon Street, Oxford.
- Jiang, X., Jiang, N., Zhang, H. ve Liu, M., 2007. Small Organic Molecular Imprinted Materials: Their Preparation and Application, Anal Bioanal Chem, 389, 355–368.
- Josic, D., Buchacher, A. and Jungbauer, A., 2001. Monoliths as Stationary Phases for Separation of Proteins and Polynucleotides and Enzymatic Conversion. Journal of Chromatography B, 752, 191-205.
- Löfås S. ve McWhirter, A. The Art of Immobilization for SPR sensors. Surface Plasmon Resonance Based Sensors. Homola, J.(ed.), 4, 117-151, Springer Berlin Heidelberg, 2006.
- Karlsson, R. ve Larsson, A., 2004. Protocol Affinity Measurement Using Surface Plasmon Resonance, Book series: Methods in Molecular Biology, Book, Antibody Engineering, 248, 389-415.
- Kindschy, L.M. ve Alocilja, E.C., 2005. A molecularly Imprinted Polymer on Indium Tin oxide and Silicon. Biosensors and Bioelectronics, 20, 2163–2167.
- Komiyama, M., Takeuchi, T., Mukawa, T. and Asanuma, H. 2003. Molecular imprinting Form Fundamentals to Applications, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Kriz, D., Kriz, C. B., Andersson, L.I. ve Mosbach, K.H., 1994. Thin-Layer Chromatography Based on the Molecular Imprinting Technique, Anal. Chem., 66, 17,2636–2639.
- Kriz, D., Ramstrom, O. ve Mosbach, K., 1997. Molecular Imprinting – New Possibilities for Sensor Technology, Anal Chem., 69, A345-A349.

- Kugimiya, A. ve Takeuchi, T., 1999. Molecularly Imprinted Polymer-Coated Quartz Crystal Microbalance for Detection of Biological Hormone. Electroanalysis, 11, 15, 1158 – 1160.
- Kugimiya, A. ve Takeuchi, T., 2001. Surface Plasmon Resonance Sensor Using Molecularly Imprinted Polymer for Detection of Sialic Acid, Biosensors & Bioelectronics, 16, 1059–1062.
- Ladd, J. ve Taylor, A., Jiang, S. SPR Biosensors for Food Safety. Surface Plasmon Resonance Based Sensors. Homola, J.(ed.), 4, 207-226, Springer Berlin Heidelberg, 2006.
- Lanza, F. ve Sellergren, B., 2001. The Application of Molecular Imprinting Technology to Solid Phase Extraction, Chromatographia, 53, 599-611.
- Lavignac, N., Allender, C.J. ve Brain, K.R., 2004. Current Status of Molecularly Imprinted Polymers as Alternatives to Antibodies in Sorbent Assays, Analytica Chimica Acta, 510, 2, 139-145.
- Lei, J.D. ve Tan, T.W., 2002. Enantioselective Separation of Naproxen and Investigation of Affinity Chromatography Model Using Molecular Imprinting. Biochemical Engineering Journal 11, 175–179.
- Lele, B. S., Kulkarni, M. G. ve Mashelkar, R. A., 1999. Molecularly Imprinted Polymer Mimics of Chymotrypsin: 1. Cooperative Effects and Substrate Specificity, Reactive and Functional Polymers, 39, 1, 37-52.
- Levi, R., McNiven, S., Piletsky, S.A., Cheong, S.H, Yano, K. ve Karube, I., 1997. Optical Detection of Chloramphenicol Using Molecularly Imprinted Polymers, Anal. Chem., 69, 11, 2017–2021.
- Li, X. ve Husson, S.M., 2006. Adsorption of Dansylated Amino Acids on Molecularly Imprinted Surfaces: A Surface Plasmon Resonance Study, Biosensors and Bioelectronics, 22, 3, 336-348.
- Lin, L.P., Huang, L.S., Lin, C.W., Lee, C.K., Chen, J.L., Hsu, S.M. ve Lin, S. 2005. Determination of Binding Constant of DNA-Binding Drug to Target DNA by Surface Plasmon Resonance Biosensor Technology. Cur. Drug Target, 5, 61-72.
- Lok, C. M. ve Son, R., 2009. Application of Molecularly Imprinted Polymers in Food Sample Analysis – a Perspective, International Food Research Journal, 16, 127-140.
- Lu, Y., Yan, C-L., Wang, X-J. ve Wang, G-K., 2009. Protein Imprinting and Recognition Via Forming Nanofilms on Microbeads Surfaces in Aqueous Media, Applied Surface Science, 256, 5, 1341-1346.

- Lübke, C., Lübke, M., Whitcombe, M.J. ve Vulfson, E.N., 2000. Imprinted Polymers Prepared with Stoichiometric Template–Monomer Complexes: Efficient Binding of Ampicillin from Aqueous Solutions, Macromolecules, 33, 14, 5098–5105
- Mahony, J.O., Nolan, K., Smyth, M.R. ve Mizaikoff, B., 2005. Molecularly Imprinted Polymers—Potential and Challenges in Analytical Chemistry, Analytica Chimica Acta, 534, 31–39.
- Martin-Esteban, A. ve Tadeo, J.L., 2006. Selective Molecularly Imprinted Polymer Obtained From a Combinatorial Library for Bisphenol A, Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening, 9, 747-751
- Masque, N., Marce, R.M. ve Borrull, F., 2001. Molecularly Imprinted Polymers: New Tailor-made Materials for Selective Solid-Phase Extraction, Trends Anal Chem, 20, 477-486.
- Matharu, Z., Bandodkar, A.J., Sumana, G., Solanki, P.R., Mala Ekanayake, E.M.I., Kaneto, K., Gupta, V. ve Malhotra, B.D., 2009. Low Density Lipoprotein Detection Based on Antibody Immobilized Self-Assembled Monolayer: Investigations of Kinetic and Thermodynamic Properties, J. Phys. Chem. B, 113, 14405-14412.
- Matsunaga, T., Hishiya, T. ve Takeuchi, T., 2007. Surface Plasmon Resonance Sensor for Lysozyme Based on Molecularly Imprinted Thin Films, Analytica Chimica Acta, 591, 63–67.
- Matsui, J., Tamaki, K. ve Sugimoto, N., 2002. Molecular Imprinting in Alcohols: Utility of a Pre-Polymer Based Strategy for Synthesizing Stereoselective Artificial Receptor Polymers in Hydrophilic Media, Analytica Chimica Acta, 466, 11–15.
- Mayes, A.G. ve Mosbach, K., 1997. Molecularly Imprinted Polymers: Useful Materials for Analytical Chemistry. Trends in Analytical Chemistry, 16, 6.
- Mazumdar, S.D., Hartmann, M., Kämpfer, P. ve Keusgen, M., 2007. Rapid Method for Detection of *Salmonella* in Milk by Surface Plasmon Resonance (SPR), Biosensors and Bioelectronics, 22, 2040–2046.
- Mosbach, K. ve Ramström, O., 1996. The Emerging Technique of Molecular Imprinting and Its Future Impact on Biotechnology, Biotechnology, 14, 163-170.
- Motherwell, W. B., Bingham, M. J. ve Six, Y., 2001. Recent Progress in the Design and Synthesis of Artificial Enzymes, Tetrahedron, 57, 22, 4663-4686.
- Navratilova I. ve Myszk, D.G. Investigating Biomolecular Interactions and Binding Properties Using SPR Biosensors. Surface Plasmon Resonance Based Sensors. Homola, J.(ed.), 4, 155-176, Springer Berlin Heidelberg, 2006.

- Nelson, B. P., Grimsrud, T.E., Liles, M.R., Goodman, R. M. ve Corn. R.M., 2001. Surface Plasmon Resonance Imaging Measurements of DNA and RNA Hybridization Adsorption onto DNA Microarrays, Anal. Chem., 73, 1, 1–7.
- Nicholls, I.A. ve Rosengren, J.P., 2002. Molecular Imprinting of Surfaces. Bioseparation, 10, 301–305.
- Oubagaranadin, J.U.K., Murthy, Z.V.P. ve Rao, P.S., 2007. Models for Adsorption of Mercury on Fuller's Earth and Activated Carbon, Indian chemical engineer, 49, 3, 196-204.
- Petz, M., 2009. Recent Applications of Surface Plasmon Resonance Biosensors for Analyzing Residues and Contaminants in Food, Monatsh Chem, 140, 953–964.
- Piletsky, S.A., Terpetschnig, E., Andersson, H.S., Nicholls, I.A. and Wolfbeis, O., 1999. Application of Non-Specific Fluorescent Dyes for Monitoring Enantio-Selective Ligand Binding to Molecularly Imprinted Polymers, Fresenius J Anal Chem., 364, 512–516.
- Piletsky, S.A.; Piletska, E.V., Bossi, A., Karim, K., Lowe, P. ve Turner., A.P. F., 2001. Substitution of Antibodies and Receptors with Molecularly Imprinted Polymers in Enzyme-linked and Fluorescent Assays. Biosensors and Bioelectronics, 16, 9-12, 701-707.
- Piletsky, S.A., Alcock, S. ve Turner, A.P.F., 2001. Molecular Imprinting: At the Edge of the Third Millennium, Trends in Biotechnology, 19,1, 9-12.
- Podgornik, A., Barut, M., Štrancar, A., Josic, D. ve Koloini, T., 2000. Construction of Large- Volume Monolithic Columns. Analytical Chemistry, 72, 5693- 5699.
- Ramstrom, O., Skudar, K., Haines, J., Patel, P. ve Brüggemann, O., 2001. Food Analyses Using Molecularly Imprinted Polymers, Journal of agricultural and food chemistry, 49,5.
- Roper, D., 2007. Determining Surface Plasmon Resonance Response Factors for Deposition onto Three-Dimensional Surfaces, Chemical Engineering Science, 62, 1988-1996.
- Rostagno, M., Monolithic Columns for Fast High-Performance Liquid Chromatography Separations.http://www.scitopics.com/Monolithic_Columns_for_Fast_High_Performance_liquid_chromatography_separations.html, 14 February 2009.
- Sandblad, P., Arnell, R., Samuelsson, J. ve Fornstedt, T., 2009. Approach for Reliable Evaluation of Drug Proteins Interactions Using Surface Plasmon Resonance Technology, Anal. Chem., 81, 3551-3559.
- Saraçoğlu, A., Cura, C. ve Yılmaz G., 2001. Farklı Yüzey Aktif Maddelerin Mumun islanabilirliği üzerine etkisi, EÜ Dışek Fak Derg, 22, 63-66.

- Schasfoort, R.B.M. ve Tudos, A.J., 2008. Handbook of Surface Plasmon Resonance, University of Twente, Enschede, The Netherlands, RSC Publishing.
- Schirmer, C. ve Meisel, H., 2008. Molecularly Imprinted Polymers for the Selective Solid-Phase Extraction of Chloramphenicol, Anal Bioanal Chem, 392, 223–229.
- Schirmer, C. ve Meisel, H., 2009. Chromatographic Evaluation of Polymers Imprinted with Analogs of Chloramphenicol and Application to Selective Solid-Phase Extraction, Anal Bioanal Chem, 394, 2249–2255.
- Shi, X., Wu, A., Zheng, S., Li, R. ve Zhang, D., 2007. Molecularly Imprinted Polymer Microspheres for Solid-Phase Extraction of Chloramphenicol Residues in Foods, Journal of Chromatography B, 850, 24-30.
- Schweitz, L., Andersson, L.I. ve Nilsson, S., 1998. Molecular Imprint-Based Stationary Phases for Capillary Electrochromatography, Journal of Chromatography A, 817, 1-2, 5-13.
- Sellergren, B. ve Allender, C.J., 2005. Molecularly Imprinted Polymers: A Bridge to Advanced Drug Delivery, Advanced Drug Delivery Reviews, 57, 1733– 1741
- Shankaran, D.R., Gobi, K. V. ve Miura, N., 2007. Recent Advancements in Surface Plasmon Resonance Immunosensors for Detection of Small Molecules of Biomedical, Food and Environmental Interest, Sensors and Actuators B, 121, 158–177.
- Skudar, K., Brüggemann, O., Wittelsberger, A. ve Ramström, O., 1999. Selective Recognition and Separation of β -Lactam Antibiotics Using Molecularly Imprinted Polymers. Anal. Commun., 36, 327–331.
- Spadavecchia, J., Manera, M.G., Quaranta, F., Siciliano, P. ve Rella, R., 2005. Surface Plasmon Resonance Imaging of DNA Based Biosensors for Potential Applications in Food Analysis, Biosensors and Bioelectronics 21, 894–900.
- Spivak D, Gilmore M.A. ve Shea K.J., 1997. Evaluation of Binding and Origins of Specificity of 9-Ethyladenine Imprinted Polymers, Journal of the American Chemical Society, 119, 4388-4393.
- Spivak, D.A., 2005. Optimization, Evaluation, and Characterization of Molecularly Imprinted Polymers, Advanced Drug Delivery Reviews, 57, 1779– 1794.
- Suárez-Rodríguez, J.L. ve Díaz-García, M.E., 2000. Flavonol Fluorescent Flow-Through Sensing Based on a Molecular Imprinted Polymer, Analytica Chimica Acta, 405, 1-2, 24, 67-76
- Takeuchi, T. ve Haginaka, J., 1999. Separation and Sensing Based on Molecular Recognition Using Molecularly Imprinted Polymers, Journal of Chromatography B, 728, 1–20.

- Tan, C.J. ve Tong, Y.W., 2007. Molecularly Imprinted Beads by Surface Imprinting, Anal Bioanal Chem, 389, 369–376
- Taylor, A. D., Ladda, J., Yu, O., Chena, S., Homola, J. ve Jiang, S., 2006. Quantitative and Simultaneous Detection of Four Foodborne Bacterial Pathogens with a Multi-Channel SPR Sensor, Biosensors and Bioelectronics, 2006, 752–758.
- Theodoridis, G. ve Manesiotis, P., 2002. Selective Solid-phase Extraction Sorbent for Caffeine Made by Molecular Imprinting, Journal of Chromatography A , 948, 1-2, 163-169.
- Tóth, B., Pap, T., Horvath, V. ve Horvai, G., 2007. Which Molecularly Imprinted Polymer is Better? Analytica Chimica Acta, 591, 17-21.
- Umpleby, R.J., Baxter, S.C., Chen,Y., Shah, R.N. ve Shimizu, K.D., 2001. Characterization of Molecularly Imprinted Polymers with the Langmuir–Freundlich Isotherm. Anal. Chem. 73, 4584–4591.
- URL-1, <http://www.sprpages.nl/Experiments/Experiments.php>., 03.12.2009.
- URL-2, <http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/toc11.html> Report on Carcinogens, Eleventh Edition, 1 Şubat 2010.
- URL-3, <http://people.clarkson.edu/~ekatz/spr.htm>, 30.04.2010.
- URL-4, [http:// w3.balikesir.edu.tr/~ozkan/ads/adsorpsiyon02.pps](http://w3.balikesir.edu.tr/~ozkan/ads/adsorpsiyon02.pps), 16.05.2010.
- URL-5, w3.balikesir.edu.tr/~ozkan/ads/adsorpsiyon01.pps, 16.05.2010.
- URL-6, <http://w3.balikesir.edu.tr/~sedacan/yuzey.html>, 01.04.2010.
- URL-7, <https://www.centallab.metu.edu.tr>, 05.05.2010.
- URL-8, http://www.malvern.com/labeng/industry/nanotechnology/zetasizer_nano_nano-nanoparticles.htm, 06.05.2010.
- Uzun, L., Say, R., Unal, S. ve Denizli, A., 2009. Production of Surface Plasmon Resonance Based Assay Kit for Hepatitis Diagnosis. Biosensors and Bioelectronics, 24, 2878–2884.
- Vaihinger, D., Landfester, K., Kräuter, I., Brunner, H. ve Tovar, G.E:M., 2002. Molecularly Imprinted Polymer Nanospheres as Synthetic Affinity Receptors Obtained by Miniemulsion Polymerisation, Macromolecular Chemistry and Physics, 203, 1965-1973.
- Wang, Y., Zhou, Y., Sokolov, J., Rigas, B., Levon, K. ve Rafailovich, M. A., 2008. Potentiometric Protein Sensor Built with Surface Molecular Imprinting Method, Biosensors and Bioelectronics, 24, 1,162-166.

- Weiss, R., Molinelli, A., Jakusch, M. ve Mizaikoff, B., 2002. Molecular Imprinting and Solid Phase Extraction of Flavonoid Compounds, Bioseparation, 10, 379–387.
- Whitcombe, M.J., Alexander, C. ve Vulfson, E.N., 1997. Smart Polymers for the Food Industry, Trends in Food Science & Technology, 81
- Widstrand, C., Yilmaz, E., Boyd, B., Billing, J. ve Rees, A., Molecularly Imprinted Polymers: A New Generation of Affinity Matrices. http://www.miptechnologies.com/pdf/ALN-Widstrand_Reprint.pdf. 17 Ocak 2010.
- Wulff, G., 2002. Enzyme-like Catalysis by Molecularly Imprinted Polymers, Chem Rev., 102, 1-27.
- Wulff, G., 2002. Molecular Imprinting-A Way to Prepare Effective Mimics of Natural Antibodies and Enzymes. Studies in Surface Science and Catalysis, 141, 35-44.
- Xie, C., Zhang, Z., Wang, D., Guan, G., Gao, D. ve Liu, J., 2006. Surface Molecular Self-Assembly Strategy for TNT Imprinting of Polymer Nanowire/nanotube Arrays, Anal. Chem., 78, 8339-8346.
- Xie, C., Liu, B., Wang, Z., Gao, D., Guan, G. ve Zhang, Z., 2008. Molecular Imprinting at Walls of Silica Nanotubes for TNT Recognition, Anal. Chem., 80, 437-443.
- Xinglong, Y., Lequn, Z., Hong, J., Haojuan, W., Chunyong, Y. ve Shenggeng, Z., 2001. Immunosensor Based on Optical Heterodyne Phase Detection, Sensors and Actuators B: Chemical, 76, 1-3, 199-202.
- Xu, Z., Huang, X. ve Wan, L. Molecularly Imprinted Membranes. Surface Engineering of Polymer Membranes, 225-262, Springer Berlin Heidelberg, 2009.
- Yan, H. ve Row, K.H., 2006. Characteristic and Synthetic Approach of Molecularly Imprinted Polymer, Int. J. Mol. Sci., 7, 155-178.
- Yang, D-H., Takahara, N., Lee, S-W. ve Kunitake, T., 2008. Fabrication of Glucose-Sensitive TiO₂ Ultrathin Films by Molecular Imprinting and Selective Detection of Monosaccharides, Sensors and Actuators B: Chemical, 130, 1, 379-385.
- Yano, K. ve Karube, I., 1999. Molecularly Imprinted Polymers for Biosensor Applications, TrAC Trends in Analytical Chemistry, 18, 3, 199-204.
- Ye, L. ve Mosbach, K., 2001. Molecularly Imprinted Microspheres as Antibody Binding Mimics, Reactive and Functional Polymers, 48, 1-3, 149-157.
- Yener, J. ve Aksu, Z., 1999. Atıksulardaki Fenol ve Klorfenollerin Aktif Karbon ve Kurutulmuş Aktif Çamura Adsorpsiyonu, Tr. J. of Engineering and Environmental Science, 23, 93-104.

- Yuan, J., Addo, J., Aguilar, M.I. ve Wua, Y., 2009. Surface Plasmon Resonance Assay for Chloramphenicol Without Surface Regeneration, Analytical Biochemistry, 390, 97–99.
- Zander, A., Findlay, P., Renner, T. ve Sellergren, B., 1998. Analysis of Nicotine and Its Oxidation Products in Nicotine Chewing Gum by a Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction, Anal. Chem., 70, 15, 3304–3314.
- Zeng X.F. ve Murray, G.M., 1996. Synthesis and Characterization of Site-Selective Ion-Exchange Resins Templated for Lead(II) Ion, Separation Science and Technology, 31, 17, 2403-2418.

ÖZGEÇMİŞ

1972 yılında Konya’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Konya’da tamamladı. 1995 yılında Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümünden lisans, 2001 yılında aynı bölümden yüksek lisans derecesi aldı. 1995-1999 yılları arasında Bifa Bisküvi ve gıda San. A.Ş-Karaman’da Kalite biriminde; 2002 yılında Fatoğlu Un Fabrikası-Giresun’da Kalite biriminde, 2003-2004 yıllarında GıdaSA Sabancı Gıda San. A.Ş’de Ar-ge biriminde; 2004-2007 yıllarında Giresun Üniversitesi Şebinkarahisar Meslek Yüksekokulunda öğretim görevlisi olarak çalıştı. 2007 yılından beri Selçuk Üniversitesi Çumra Meslek Yüksekokulunda öğretim görevlisi olarak çalışmaya devam etmektedir. Ocak 2007’de K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim dalında doktora programına başladı. ISI ve diğer indekslere kayıtlı yayınları vardır. Belli dönemlerde Avrupa Birliği Eğitim ve Gençlik programları Merkezi Başkanlığında bağımsız dış uzman olarak görev almaktadır. İyi seviyede İngilizce bilmektedir.