

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TESTOSTERON TAYİNİNE YÖNELİK
MOLEKÜLER BASKILANMIŞ POLİMERİN
HAZIRLANMASI**

Volkan YETGİN

Mart, 2019

İZMİR

TESTOSTERON TAYİNİNE YÖNELİK MOLEKÜLER BASKILANMIŞ POLİMERİN HAZIRLANMASI

Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Yüksek Lisans Tezi

Biyokimya Anabilim Dalı

Volkan YETGİN

Mart, 2019

İZMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

VOLKAN YETGİN, tarafından **PROF. DR. M. NALAN TÜZMEN** yönetiminde hazırlanan **“TESTOSTERON TAYİNİNE YÖNELİK MOLEKÜLER BASKILANMIŞ POLİMERİN HAZIRLANMASI”** başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.



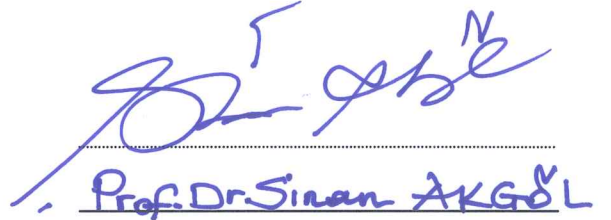
Prof. Dr. M. Nalan TÜZMEN

Yönetici



Prof. Dr. Hülya AYAR KAYI

Jüri Üyesi



Prof. Dr. Sinan AKGÖL

Jüri Üyesi



Prof. Dr. Kadriye ERTEKİN

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca çalışmalarımın her aşamasında bana yol gösteren, bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen saygı değer hocam Prof. Dr. M. Nalan TÜZMEN'e,

Laboratuvarında birlikte uzun çalışma saatleri geçirdiğimiz, samimi ve içten yardımlarını esirgemeyen Elif ESEN'e

Hayatım boyunca yanımda olan, her konuda benden maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli aileme teşekkürlerimi sunarım.

Volkan YETGİN

TESTOSTERON TAYİNİNE YÖNELİK MOLEKÜLER BASKILANMIŞ POLİMERİN HAZIRLANMASI

ÖZ

Yüzde 90 – 95 oranında testislerden salgılanan androjen grubu bir steroid hormon olan testosteron, karbohidrat, lipid ve protein metabolizması üzerinde etkin role sahiptir. Testosteron düzeyindeki anomaliler, diyabet, obezite, osteoproz, kalp yetmezliği ve hatta kardiyal ani ölüm gibi hayati sonuçlar doğurur. Öte yandan testosteron, çevresel örneklerle karışmak suretiyle endokrin bozucu aktivite gösterir. Bu nedenle, testosteronun doğru ve güvenilir tayini büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışmada, serum gibi kompleks biyolojik matrisler ile su, sediment gibi çevresel örneklerdeki testosteronun belirlenme ve kantitatif tayinine olanak sağlayacak testosteron baskılanmış p(HEMA-MAAL) nanopartiküllerin sentezi, süfaktansız emülsiyon polimerizasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, fonksiyonel monomer olarak metakriloilamido-L-alanin (MAAL), monomer olarak 2-hidroksietilmetakrilat (HEMA), çapraz bağlayıcı olarak etilenglikol dimetakrilat (EGDMA) ve kalıp molekül olarak testosteron (TSN) kullanılmıştır. Kalıbın uzaklaştırılmasının ardından sentezlenen TSN baskılanmış p(HEMA-MAAL) nanopartiküller, Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM), boyut analizi (Zeta Sizer), Fourier Dönüşümlü Infrared Spektroskopisi (FTIR) ve termal gravimetrik analiz (DTA-TGA) kullanılarak karakterize edilmiştir. Daha sonra TSN-baskılanmış p(HEMA-MAAL) nanopartiküller ile adsorpsiyon koşullarını optimize etmek amacıyla sorbent miktarı, süre, derişim ve sıcaklık gibi parametrelerin adsorpsiyona etkisi incelenmiştir. Sentezlenen TSN baskılanmış p(HEMA-MAAL) nanopartiküller kullanılarak 2,5 mg gibi çok az miktarda sorbent ile 4 saat gibi bir sürede testosteron adsorpsiyonunun tamamlanabileceği, adsorpsiyon kapasitesinde anlamlı bir değişim olmaksızın TSN baskılanmış p(HEMA-MAAL) nanopartiküllerin etkin şekilde tekrar tekrar kullanılabileceği belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Testosteron, moleküler baskılanmış polimer, adsorpsiyon, katı faz ekstraksiyonu

PREPARATION OF MOLECULARLY IMPRINTED POLYMER FOR TESTOSTERONE DETERMINATION

ABSTRACT

Testosterone which is an androgenous steroid hormone extreted from testis by 90-95 percent has an active role on carbohydrate, lipid and protein metabolism. Testosterone level abnormalities have vital consequences such as diabetes, obesity, osteoporosis, heart failure, and even cardial sudden death. On the other hand, testosterone, exhibits endocrine disrupting activity by interfering with environmental samples. Therefore, accurate and reliable determination of testosterone is of great importance.

In this study, the synthesis of testosterone imprinted p(HEMA-MAAL) nanoparticles that would allow the qualitative and quantitative determination of testosterone in environmental samples such as water, sediment and complex biological matrices such as serum was carried out with surfactant-free emulsion polymerization. For this purpose, methacryloylido-L-alanine (MAAL) as functional monomer, 2-hydroxyethylmethacrylate (HEMA) as monomer, ethyleneglycol dimethacrylate (EGDMA) as crosslinker, and testosterone (TSN) as template molecule were used. After removal of the template, synthesized TSN-imprinted p(HEMA-MAAL) nanoparticles were characterized using Scanning Electron Microscopy (SEM), size analysis (Zeta Sizer), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and thermal gravimetric analysis (DTA-TGA). The effects of some parameters such as sorbent amount, duration, initial concentration and temperature on adsorption were investigated in order to optimize adsorption conditions for TSN-imprinted p (HEMA-MAAL) nanoparticles. It was determined that it can be possible to complete testosterone adsorption with a small amount of sorbent such as 2.5 mg in a period of 4 hours and that TSN-imprinted p (HEMA-MAAL) nanoparticles can be repeatedly used without a significant change in their adsorption capacities.

Keywords: Testosterone, molecularly imprinted polymers, adsorption, solid phase extraction

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZ	iv
ABSTRACT	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
TABLolar LİSTESİ	x

BÖLÜM BİR – GİRİŞ1

1.1 Testosteron.....	1
1.2 Moleküler Baskılanmış Polimerler.....	5
1.2.1 Moleküler Baskılamanın Bileşenl.....	7
1.2.1.1 Kalıp.....	7
1.2.1.2 Fonksiyonel monomerler.....	7
1.2.1.3 Çapraz bağlayıcılar.....	8
1.2.1.4 Çözücüler (porojenler).....	10
1.2.1.5 Başlatıcılar.....	10
1.3 Moleküler Baskılama Yöntemleri.....	11
1.4 Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Sentez Teknikleri.....	11
1.4.1 Yığın (bulk) polimerizasyonu.....	12
1.4.2 Süspansiyon polimerizasyonu.....	12
1.4.3 Çöktürme polimerizasyonu.....	13
1.4.4 Çok adımlı şişme polimerizasyonu.....	14
1.4.5 Yüzey polimerizasyonu.....	15
1.4.6 Emülsiyon polimerizasyonu.....	16

BÖLÜM İKİ - MATERYAL METOD.....18

2.1 Reaktifler.....	18
2.2 Kullanılan Cihazlar.....	18
2.3 Testosteron Baskılanmış p(HEMA-MAAL) Nanopartiküllerin Sentez.....	18
2.4 TSN Baskılanmış p(HEMA-MAAL) Nanopartiküllerin Karakterizasyonu....	20
2.5 TSN Baskılanmış p(HEMA-MAAL) Nanopartiküllere Testosteron Adsorpsiyon ve Desorpsiyon Koşullarının İncelenmesi.....	21
2.5.1 Süresin TSN Adsorpsiyonuna Etkisi.....	21
2.5.2 Sorbent Miktarının TSN Adsorpsiyonuna Etkisi.....	22
2.5.3 Başlangıç Derişiminin TSN Adsorpsiyonuna Etkisi.....	22
2.5.4 Sıcaklığın TSN Adsorpsiyonuna Etkisi.....	22
2.5.6 Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik.....	22
2.6 TSN'un HPLC ile Analiz Koşulları.....	23

BÖLÜM ÜÇ - SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....24

3.1 TSN Baskılanmış p(HEMA-MAAL) Nanopartiküllerin Karakterizasyonu....	24
3.1.1 TSN Baskılanmış p(HEMA-MAAL) Nanopartiküllerin SEM ve Boyut Analizi.....	24
3.1.2 TSN Baskılanmış p(HEMA-MAAL) Nanopartiküllerin FTIR Analizi...	25
3.1.3 TSN Baskılanmış p(HEMA-MAAL) Nanopartiküllerin DTA-TGA Analizi.....	26
3.2 TSN Baskılanmış p(HEMA-MAAL) Nanopartiküllerin Adsorpsiyon ve Desorpsiyon Koşullarının İncelenmesi.....	26
3.2.1 TSN Baskılanmış p(HEMA-MAAL) Nanopartiküllere TSN Adsorpsiyonunun Optimizasyonu.....	26

3.2.1.1 Sürenin TSN Adsorpsiyonuna Etkisi.....	27
3.2.1.2 Sorbent Miktarının TSN Adsorpsiyonuna Etkisi.....	27
3.2.1.3 Başlangıç Derişiminin TSN Adsorpsiyonuna Etkisi.....	29
3.2.1.4 Sıcaklığın TSN Adsorpsiyonuna Etkisi.....	30
3.2.2 Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik.....	31
BÖLÜM DÖRT - SONUÇLAR.....	32
KAYNAKLAR	34
EKLER.....	42
Ek 1: Kısaltmalar.....	42

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1.1 Testosteron molekülünün kimyasal yapısı.....	1
Şekil 1.2 Moleküler baskılama basamakları.....	6
Şekil 1.3 Moleküler baskılamada yaygın kullanılan fonksiyonel monomerler.....	8
Şekil 1.4 Moleküler baskılamada yaygın kullanılan çapraz bağlayıcılar.....	9
Şekil 1.5 Moleküler baskılamada yaygın kullanılan kimyasal başlatıcılar.....	10
Şekil 1.6 Yığın (Bulk) polimerizasyonu.....	12
Şekil 1.7 Süspansiyon polimerizasyonu.....	13
Şekil 1.8 Çöktürme polimerizasyonu.....	14
Şekil 1.9 Çok adımlı şişme polimerizasyonu.....	15
Şekil 1.10 Yüzey polimerizasyonu.....	16
Şekil 1.11 Emülsiyon polimerizasyonu.....	17
Şekil 2.1 TSN baskılanmış p(HEMA-MAAL) nanopartiküllerin sentez şeması.....	20
Şekil 2.2 p(HEMA- MAAL) nanopartiküllerin sentezine ait olası reaksiyon şeması ve olası etkileşimler.....	21
Şekil 3.1 TSN baskılanmış p(HEMA-MAAL) nanopartiküllerin SEM görüntüsü.....	24
Şekil 3.2 TSN baskılanmış p(HEMA-MAAL) nanopartiküllerin boyut analizi.....	25
Şekil 3.3 TSN baskılanmış p(HEMA-MAAL) nanopartiküllerin FTIR spektrumu.....	25
Şekil 3.4 TSN baskılanmış p(HEMA-MAAL) nanopartiküllerin DTA-TGA analizi.....	26
Şekil 3.5 Sürenin TSN adsorpsiyonuna etkisi.....	27
Şekil 3.6 Sorbent miktarının TSN adsorpsiyonuna etkisi.....	28
Şekil 3.7 Derişimin TSN adsorpsiyonuna etkisi.....	29
Şekil 3.8 Sıcaklığın TSN adsorpsiyonuna etkisi.....	30
Şekil 3.9 TSN baskılanmış p(HEMA-MAAL) nanopartiküllerin adsorpsiyon desorpsiyon döngüsü	31

TABLÖLAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1 TSN'un HPLC ile tayininde kullanılan kromatografik koşullar.....	23
--	----

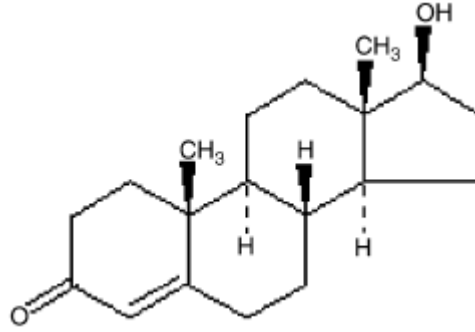


BÖLÜM BİR

GİRİŞ

1.1 Testosteron

Testosteron (17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-one) Şekil 1.1’de gösterilen C₁₉H₂₈O₂ kimyasal formülüne sahip hem erkekte hem de kadında bulunan en önemli androjendir ve % 90 – 95 oranında testislerden salgılanır. Memelilerde testosteron birincil olarak erkeklerin testislerinden az da olsa dişilerin yumurtalıklarından ve adrenal bezden salgılanır. Sağlıklı erkeklerde, testiste bulunan Leydig hücrelerinin mitokondrilerinde kolesterolden enzimatik reaksiyonlar sonucu günde ortalama 2.1 – 11.0 mg arası testosteron sentezlenir ve normal plazma düzeyi 300 – 1000 ng/dl arasındadır (de Souza ve Hallak, 2011).



Şekil 1.1 Testosteron molekülünün kimyasal yapısı (Loi, Vertzoni, Vryonidou ve Phenekos, 2006)

Testosteron lipofilik özelliğe sahip bir molekül olduğundan Leydig hücrelerinden difüzyon yoluyla kana geçer ve sadece % 2’si serbest yani aktif haldedir. Testosteronun % 98’i transport proteinlerine (seks hormonu bağlayıcı globülin ve albümine) bağlı olarak kanda taşınır (Kicman, 2008).

Testosteronun çeşitli özelliklerine sahip yeni türevlerinin sentezlenebilmesi, testosteronun 1935 yılından itibaren izole ve karakterize edilmesiyle başlamıştır. Testosteron ile birlikte tüm türevler kısaca “Anabolik Androjenik Steroidler” (AAS) olarak adlandırılmaktadır (de Souza ve Hallak, 2011). Testosteron da tıpkı diğer androjenler gibi hipofizin Luteinizan hormon (LH) sekresyonu üzerinde inhibitör bir feedback etki oluşturur, protein anabolik, büyümeyi destekleyici bir etki göstererek

erkek sekonder seks özelliklerinin gelişimi ve korunmasında görev alır (Ganong, 1993). Testosteron salgılanmasındaki artmaya bağlı olarak erkek çocuklarda cinsel karakterler ortaya çıkmakta, kemiklerin uzunlamasına büyümesini hızlanmakta ve boyca uzama gerçekleşmektedir (Kayaalp, 2000).

Testosteronun protein anabolizması üzerine etkisinin sonucu protein miktarının, özellikle enzimlerin artışı tüm hücrelerde aktiviteyi artırmaktadır. Yüksek dozda eksojen testosteron enjeksiyonu, bazal metabolizma hızını %15 kadar artırabilmektedir (Guyton ve Hall, 2001). Testosteron protein yıkımını azaltan “anabolizan” etkiye sahip bir steroid olduğundan yağsız vücut kitlesinde azot depolanmasına ve protein sentezine neden olmaktadır. Bu sayede büyümeyi tetikler, protein ve kollajen sentezi ile kas hacminde artış meydana getirir (Sioqvist, Garle ve Rane, 2008). Testosteron ayrıca azotlu maddelerin yanında, Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- ve fosfatın da vücutta tutulmasına neden olur. Testosteron, kemik iliğinde alyuvar üretimini artırır böylece kırmızı kan hücrelerinin kandaki hacim yüzdesini (hematokriti) yükseltir. Alyuvarların 2.3-difosfoglisarat düzeyini artırması hemoglobinin oksijene afinitesini azaltır; bu da dokulara oksijen geçişini kolaylaştırır (Kayaalp, 2000).

Dolaşımdaki testosteronun küçük bir miktarı östrojene dönüştürülürken büyük bir kısmı karaciğerde yıkılır ve 17-ketosteroidlere dönüştürülerek idrarla atılır. Araştırmalar, yaşla birlikte testosteron düzeyinin azaldığını, özellikle otuz yaşından itibaren testosteron ve androjen konsantrasyonlarının düştüğünü göstermektedir. Erkeklerde testosteron düzeyinin 7nmol/L’den aşağıda olması, kemik ve kas kitlesinde azalma, osteoproz, yağ kütlesinde artma, libidoda düşme gibi birçok klinik semptomlara yol açar (Çeviker, 2017; Ganong, 1993). Hipogonadizm, erkeklerde testislerin yetersiz fonksiyon göstermesidir. Hipogonadizm durumunda testisin parakrin, endokrin ve üreme fonksiyonlarında bozulma meydana gelir. Eğer bu durum sadece testis kaynaklı ise hipergonadotropik hipogonadizm (primer), hipotalamus veya hipofiz kaynaklı bir hastalığa bağlı olarak meydana gelmiş ise hipogonadotropik hipogonadizm (sekonder) olarak adlandırılmaktadır. Her iki durumda da, plazma testosteron düzeyi 300 ng/ dL’ in altındadır. Bu durum, erişkin

yaş grubu erkeklerde libido kaybı, seksüel disfonksiyon, infertilite, osteoporoz, anemi ve depresyon gibi bulgulara yol açar (Moss, Crosnoe ve Kim, 2013).

Yüksek düzeyde AAS varlığı ise hipertansiyona, kan yağlarının olması gerektiğinden fazla olmasına, açlık kan glukoz düzenlenmesinin bozulmasına, obeziteye, diyabete, kalp yapısında değişikliklere, sol ventrikül hipertrofisi dahil olmak üzere kasılma ve gevşeme fonksiyonlarında bozulmaya, kalp kasının bir bölümünün yetersiz kan akışına neden olmasına, kardiyal ani ölümlere ve kalp yetmezliğine yol açabilir (Ahlgrim ve Guglin, 2009; De Piccoli, Giada, Benetton, Sartori ve Piccolo, 1991; Figueredo, 2011; Pearson, Schiff, Mrosek, Labovitz ve Williams, 1986).

Bunların yanı sıra, son yıllarda testosteron, östrojen gibi steroid hormonların çevre üzerine olan etkileri oldukça ilgi çekmektedir. Lipofilik özellikleri nedeniyle bu hormonlar toprak ve/veya organik maddeler tarafından sorplanır, yeraltı ve doğal su kaynaklarına karışabilir. Çevresel örneklerde bu hormonların fazla miktarda bulunması insan ve doğal yaşam açısından ciddi sağlık problemlerine yol açabilmektedir. Endokrin bozucu olarak adlandırılan bu hormonlara çevresel örnekler yoluyla maruz kalmak sperm sayısında azalmaya, testis, prostat ve meme kanserlerinde artışa ve üreme bozukluklarına neden olur (Lee, Strock, Sarmah ve Rao 2003; Qi ve Zhang., 2015).

Karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmasındaki etkileri ve fazlalığı ya da eksikliğinin diyabet, obezite, osteoporoz, kalp yetmezliği ve hatta kardiyal ani ölüm gibi hayati sonuçlar doğurması, çevresel örneklere karışmak suretiyle endokrin bozucu aktivite göstermesi nedeniyle testosteronun doğru ve güvenilir tayini büyük önem taşımaktadır.

Testosteron tayini için pek çok metot kullanılmakta ve geliştirilmektedir. İmmünolojik test (IA), testosteron konsantrasyonlarının belirlenmesi için en yaygın kullanılan ölçüm yöntemidir. IA'lar, hormonun işaretli bir analogunun, genellikle antikorlar tarafından sağlanan sınırlı sayıda bağlanma yeri için numunedeki hormon

ile yarışma prensibine dayanır. Bu sözde rekabetçi hormon analizlerinde, bağlanma bölgelerine bağlanan işaretli analogun oranı, numunedeki androjen konsantrasyonu ile ters orantılıdır. Bu yöntem, işaretlemenin özelliklerine bağlı olarak, radyoaktif IA (RIA) ya da kemilüminesans IA olarak da bilinir. Ancak, bu yöntem, steroid hormonlar ile çapraz reaktivite nedeniyle düşük spesifikliğe sahiptir. Öte yandan, IA'dan önce yapılan ekstraksiyon ve/veya kromatografi gibi işlem basamakları, sürenin uzamasına ve maliyetlerin artmasına yol açmaktadır (Shiraishi ve diğer., 2008). Wintersteiger ve Sepulveda tarafından geliştirilen elektrokimyasal yöntem yüksek duyarlığa (12,5 ng/mL) sahip olmakla birlikte katı faz ekstraksiyonu (SPE) ve türevlendirme gibi ön işlemler gerektirmektedir. Ayrıca, bu yöntem genellikle temel stabilite problemleriyle karşılaşılmasına neden olabilmektedir (Wintersteiger ve Sepulveda, 1993). Testosteron tayini amacıyla kullanılan UV spektrofotometrik yöntemler ise ayrıntılı bir numune hazırlama prosedürü ile zaman alıcı işlem basamakları gerektirmektedir (Pascucci ve Yeager, 1983; Suzuki, Hayashi ve Sekiba, 1988).

Son yıllarda testosteron tayini için LC-MS/MS ve GC-MS/MS sistemleri kullanılmakla birlikte, kullanılan yöntemlerin analiz öncesi ekstraksiyon gibi bir çeşit numune hazırlamayı gerektirmeleri nedeniyle zaman alıcı olması ve gerek kullanılan cihazlar gerekse kimyasal ve diğer ekipman açısından yüksek maliyetli olmaları sebebiyle bu sistemler pratikte tercih edilememektedir. Öte yandan, testosteron konsantrasyonlarını ölçmek için referans olarak kullanılan bir diğer yöntem izotop seyreltmeli gaz kromatografi-kütle spektrometri (ID-GC-MS) yöntemidir. Yüksek seçicilik ve doğruluk gibi önemli avantajlara sahip olmasına rağmen bu yöntemin büyük örnek hacimleri ve titiz numune hazırlama adımları gerektirmesi gibi önemli dezavantajları vardır. Bu nedenle, klinik uygulamada ID-GC-MS tercihen kullanılmamaktadır (Bui ve diğer., 2010; Thienpont ve diğer., 1996). Hatta Herold ve Fitzgerald tarafından yapılan çalışmalarda test edilen IA'ların hiç biri, düşük konsantrasyonlu testosteron içeren serumların araştırılması için yeterince güvenilir bulunmamıştır (Herold, 2003). Endokrin Derneği ve diğer destekleyici kuruluşlar (AUA) dahil doğrudan IA yöntemlerinin, tedavisi testosteron düzeylerinin doğru

ölçümüne dayanan hastaların sağlığını tehlikeye attığını belirtmiştir (Rosner ve diğer., 2010).

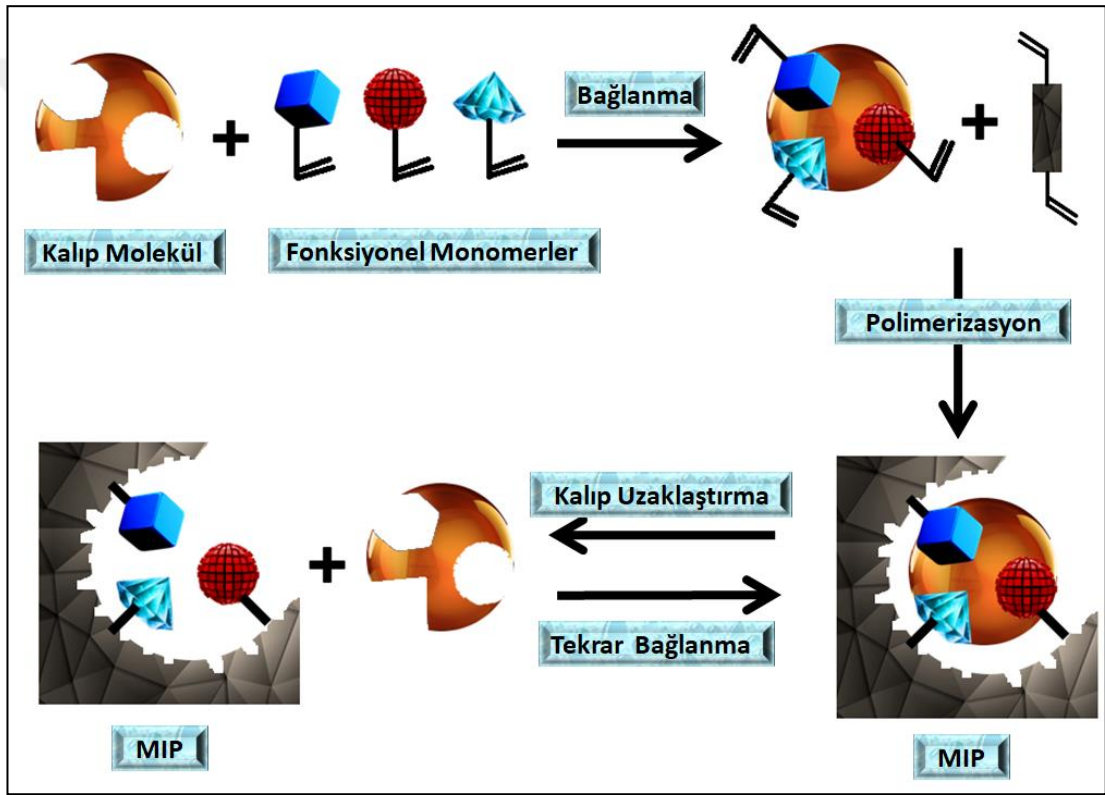
Testosteron tayini amacıyla kullanılan ve yukarıda bahsedilen immünoljik testler ile elektrokimyasal ve kromatografik yöntemler bir ekstraksiyon adımına (genelde SPE) gereksinim duymaktadır. Bu çalışmalarda SPE amaçlı kullanılan ekstraksiyon sorbentleri ticari olarak temin edilmekte, bu da işlem maliyetini oldukça artırmaktadır. Ayrıca mevcut ticari katı faz sorbentlerinin seçiciliği oldukça düşüktür, bu da yöntemin duyarlılığını olumsuz etkilemektedir. Bu dezavantajların üstesinden gelebilmek için son yıllarda moleküler baskılanmış polimerler geliştirilmekte ve çeşitli çalışmalarda farklı amaçlarla kullanılmaktadır.

1.2 Moleküler Baskılanmış Polimerler

Özel fonksiyonel gruplara sahip monomerlerin, analit molekülünü üç boyutlu özelliklerine göre saracak şekilde polimerleştirilmesi ile geliştirilen yapılara “moleküler baskılanmış polimerler” denir. Böylelikle bu polimerlerin üzerine belli moleküllerin girebileceği özelleşmiş oyuklar tasarlamak mümkün olmaktadır. Karmaşık ve kompleks çözeltilerin içinde bulunan bir kalıp molekülün üç boyutlu yapısına uygun şekilde molekülü saracak monomerleri bu kalıp üzerinde üretme teknolojisine ise Moleküler baskılama Teknolojisi (MIT) denir. Bu teknolojiye monomerlerin kimyasal yapısı, bağlanması istenen hedef molekülle etkileşime girecek fonksiyonel grup veya gruplar içermesine göre seçilir. Örneğin, analitin yani hedef molekülün üzerinde amin grupları veya pozitif yük oluşturabilecek gruplar varsa, monomer molekülün hedef molekülle etkileşebilmesi için fonksiyonel olarak negatif yüklü gruplar içermesi gereklidir. Bu sayede hedef molekülün “parmak izi”, polimer yapının üzerinde oluşturularak sadece hedef molekülün girebileceği oyukları içeren yapay bir reseptör elde edilmiş olur. Sonrasında ise üzerinde spesifik oyuklar oluşmuş olan bu dayanıklı polimerler hedef molekülü seçici bir şekilde tanıyıp bağlayabilirler (Haupt ve Mosbach, 2000).

Moleküler baskılama üç basamaktan oluşmaktadır (Şekil 1.2):

- (i) İlk basamakta, kalıp molekülün fonksiyonel grup taşıyan polimerleşebilen bir monomer ile kompleks oluşumu gerçekleşir. Bu etkileşimde kalıp molekülün üç boyutlu yapısı ve kimyasal özellikleri önemli bir yer tutar.
- (ii) İkinci basamakta, oluşan bu kompleks yapı fonksiyonel monomer üzerinden polimerleştirilir.
- (iii) Son basamakta, oluşan polimerik yapıdan, kalıp molekül uzaklaştırılır ve kalıp molekülün yapıdan uzaklaştırılmasından sonra hazırlanan moleküler baskılanmış polimer, farklı kaynaklardan hedef molekülü yüksek seçicilikle tanır ve uzaklaştırır.



Şekil 1.2 Moleküler baskılama basamakları

Günümüzde moleküler baskılanmış polimerler, enantiyomerik ayırmalar için kromatografik sabit faz olarak, katı faz ekstraksiyon sorbenti olarak, katalizde ve sensör tasarımında kullanımının yanı sıra yanı sıra protein, enzim ve antikor saflaştırmalarında ve ilaç salınım sistemlerinde yaygın yer bulmaktadır (AlvarezLorenzo ve Concheiro, 2008; Bruggemann ve diğer., 2004; Hansen, 2007; Haupt, 2003; Mosbach, 2001; Turiel ve Martin-Esteban, 2004; Van Horne, K.C., Ed., 1985; Ye ve Mosbach, 2001a; Ye ve Mosbach, 2008; Yu ve diğer., 2002).

1.2.1 Moleküler Baskılamanın Bileşenleri

Moleküler baskılama teknolojisinde, kalıp molekül (analit), fonksiyonel monomer(ler), çapraz bağlayıcı(lar), çözücü(ler) (porojenler) ve başlatıcı, temel bileşenlerdir. Kalıp moleküle uygun fonksiyonel monomerlerin, çapraz bağlayıcıların, çözücülerin, başlatıcıların ve genel polimerizasyon yönteminin seçilmesine ilişkin dikkat edilmesi gereken faktörler, moleküler baskılanmış polimerlerin verimliliğini etkilemektedir (Cormack ve Florza, 2004).

1.2.1.1 Kalıp

Tüm moleküler baskılama işlemlerinde kalıp molekül, fonksiyonel grupların organizasyonunu fonksiyonel monomerlere yönlendirmesi bakımından merkezi bir öneme sahiptir. İdeal bir kalıp molekülü,

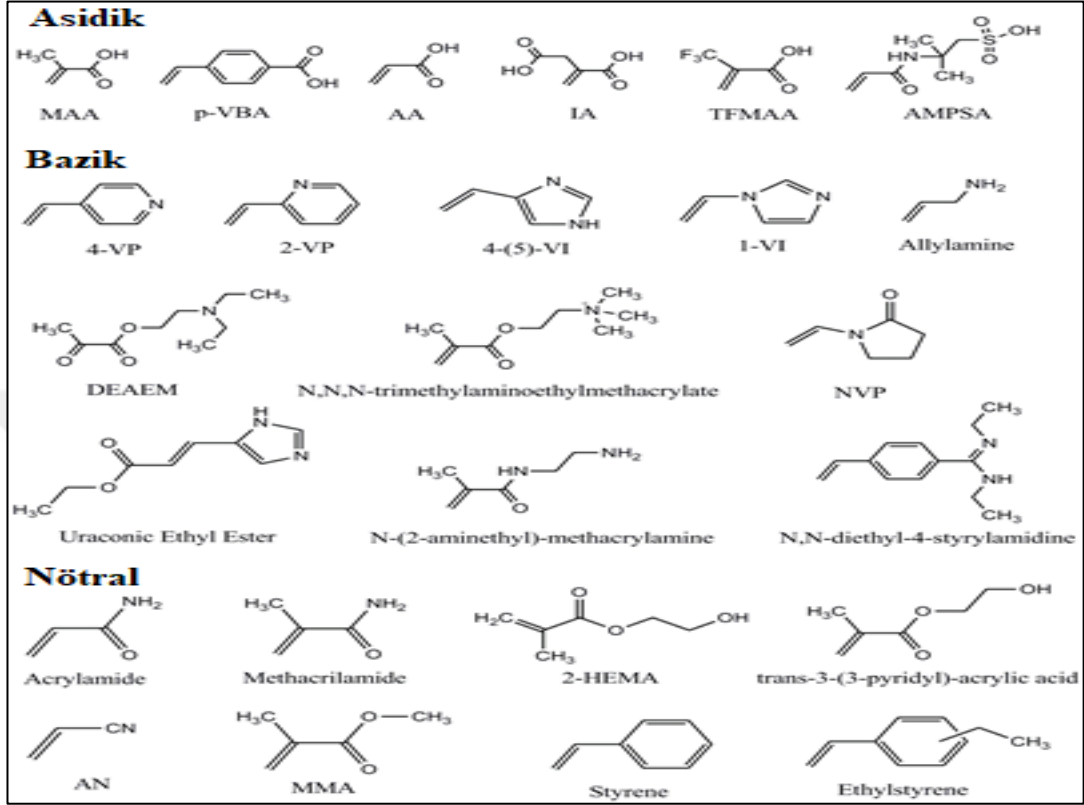
- (1) Polimerizasyona uygun fonksiyonel gruplar taşımalı,
- (2) Polimerizasyon koşulları altında kimyasal olarak inert olmalı,
- (3) Polimerizasyonu engelleyecek ya da yavaşlatacak gruplar içermemeli,
- (3) Sert polimerizasyon koşullarında (60°C ve daha yüksek sıcaklıklar ile UV varlığı gibi) kimyasal kararlılığa sahip olmalıdır (Cormack ve Florza, 2004).

Moleküler baskılama teknolojisinde, ilaçlar, aminoasitler, karbohidratlar, proteinler, nükleotidler ya da bazıları, hormonlar, pestisitler, koenzimler veya iyonlar kalıp molekül olarak kullanılmaktadır.

1.2.1.2 Fonksiyonel monomerler

Moleküler baskılamada fonksiyonel monomer-kalıp önkompleksinin kararlı olabilmesi için monomer seçimi çok önemlidir. Fonksiyonel monomerlerin ve kalıp molekül veya iyonun fonksiyonel gruplarının uyumu, etkin önkompleks oluşması açısından önemlidir ve baskılama verimliliğini etkiler. Öte yandan, uygun kalıp:monomer oranının belirlenmesi de moleküler baskılamada önemli bir diğer

noktadır (Ramström, Andersson ve Mosbasch, 1993). Fonksiyonel monomerler asidik, bazik ve nötral özellik taşıyabilir.



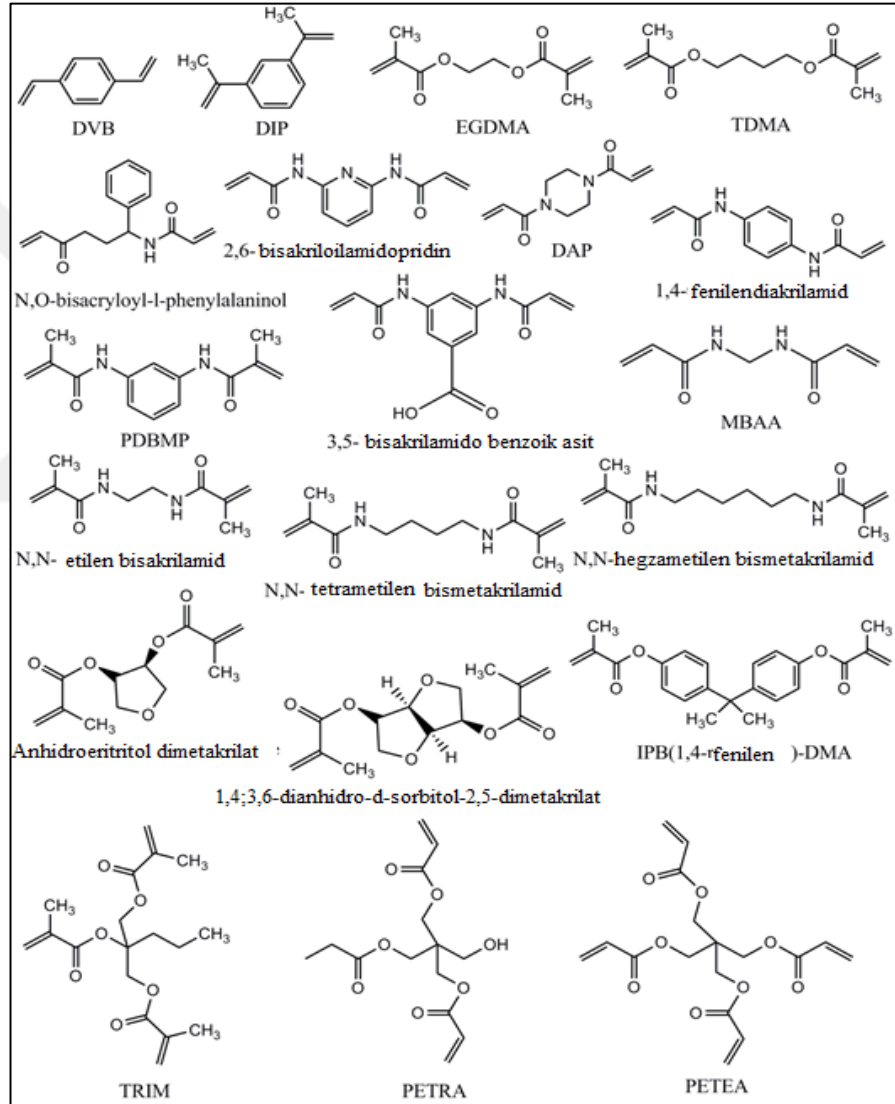
Şekil 1.3 Moleküler baskılamada yaygın kullanılan fonksiyonel monomerler (Wackerlig ve Lieberzeit, 2000)

1.2.1.3 Çapraz bağlayıcılar

Moleküler baskılamada çapraz bağlayıcı üç ana işlevi yerine getirir. Çapraz bağlayıcı, ister jel tipi ister makro gözenekli bir yapı olsun, polimer matrisinin morfolojisini kontrol etmede önemlidir. İkincisi, baskılı bağlanma alanını stabilize eder. Son olarak, polimer matrisine mekanik stabilite kazandırır. Çok büyük mol oranlarında çapraz bağlayıcı kullanıldığında çapraz bağlayıcı fonksiyonel monomer veya kalıp molekülle kovalent olmayan etkileşimlere girer ki bu da baskılamanın etkinliğini azaltır. Bununla birlikte, çok küçük mol oranlarında çapraz bağlayıcı kullanılması durumunda, kalıp molekülün bağlanma bölgeleri birbirlerine çok yaklaşacağı için kalıp molekülün bağlanma bölgeleri komşu bölgeler tarafından

kapatılır ki bu durumda da moleküler baskılama açısından etkin bir sonuç elde edilemez. Bu nedenle, çapraz bağlayıcı ile fonksiyonel monomer arasındaki stokiyometrik denge çok önemlidir (Chapuis ve diğer., 2004).

Moleküler baskılama ile uyumlu bir çok çapraz bağlayıcı bilinmektedir, bunların çoğu ticari olarak temin edilebilir ve bunlardan birkaçı şablonla aynı anda kompleks oluşturabilir ve böylece fonksiyonel monomer olarak işlev görebilir (Şekil 1.4) (Cormack ve Elorza, 2004).



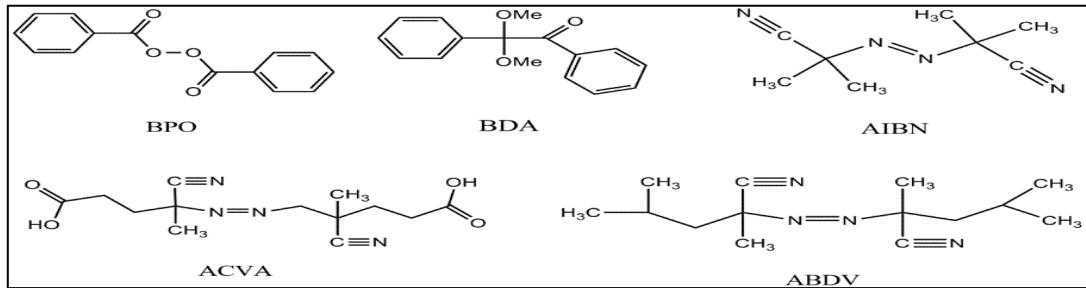
Şekil 1.4 Moleküler baskılamada yaygın kullanılan çapraz bağlayıcılar (Wackerlig ve Lieberzeit, 2000)

1.2.1.4 Çözücüler (Porojenler)

Çözücü, moleküler baskılamadaki tüm bileşenleri, yani kalıp molekül, fonksiyonel monomer(ler), çapraz bağlayıcı ve başlatıcıyı aynı fazda bir araya getirmeye yarar ve polimerizasyon esnasında reaksiyon ısısını eşit yayarak, istenmeyen yan ürünlerin oluşumunu engeller. Bununla birlikte, makro gözenekli polimerlerdeki gözeneklerin oluşturulmasından da sorumludur. Bu nedenle, çözücüler “porojen” olarak da nitelendirilir. Makro gözenekli polimerler hazırlanırken, morfolojinin ve toplam gözenek hacminin kontrol edilmesi için porojenin yapısı ve miktarı dikkate alınmalıdır. Daha spesifik olarak, termodinamik olarak iyi bir çözücünün kullanılması, iyi gelişmiş gözenek yapıları ve yüksek spesifik yüzey alanına sahip polimerlerin oluşumuyla sonuçlanır. Porojen hacmini artırmak, gözenek hacmini artırır. Genellikle, hidrojen bağlarını stabilize ettiği için apolar, protik olmayan çözücü olarak toluen tercih edilir, ancak hidrofobik kuvvetler polimerizasyon kompleksini oluşturmak için kullanılıyorsa, su tercih edilen bir çözücü olabilir.

1.2.1.5 Başlatıcılar

Moleküler baskılamada kullanılabilecek, kimyasal özellikleri birbirinden farklı birçok kimyasal başlatıcı mevcuttur. Başlatıcılar prensip olarak serbest radikal polimerizasyonlarını başlatmak için kullanılır (Şekil 1.5). Ancak, monomer-kalıp etkileşiminin çok zayıf olduğu bazı durumlarda çok yüksek sıcaklıklara çıkılamadığı için radikal başlatıcılı ısıl bozunma yerine UV bozunma tercih edilmektedir (Cormack ve Elorza, 2004).



Şekil 1.5 Moleküler baskılamada yaygın kullanılan kimyasal başlatıcılar (Wackerlig ve Lieberzeit, 2000)

1.3 Moleküler Baskılama Yöntemleri

Moleküler baskılamada temel olarak kovalent ve kovalent olmayan yaklaşımlar tercih edilir. Kovalent baskılamada kalıp molekülün polimerize olabilecek bir ürününü sentezlemek gerekir. Kalıp molekül polimer sentezi tamamlandıktan sonra yapıdan kimyasal olarak uzaklaştırılabilir (Wulff ve diğer., 1977). Kovalent baskılama yaklaşımında polimerizasyondan önce fonksiyonel monomer ile kalıp molekül birbirine kovalent olarak bağlanır. Polimerizasyondan sonra kalıbı uzaklaştırmak için kovalent bağlar kırılır. Kalıp molekül, aynı şekilde kovalent bağ oluşumuyla baskılanmış polimerle etkileşir (Shea ve Dougherty, 1986). Bu yöntemde kalıbı uzaklaştırmak için sert kimyasal koşullar gerekebilir, bu da kalıp moleküle ya da polimere zarar verebilir.

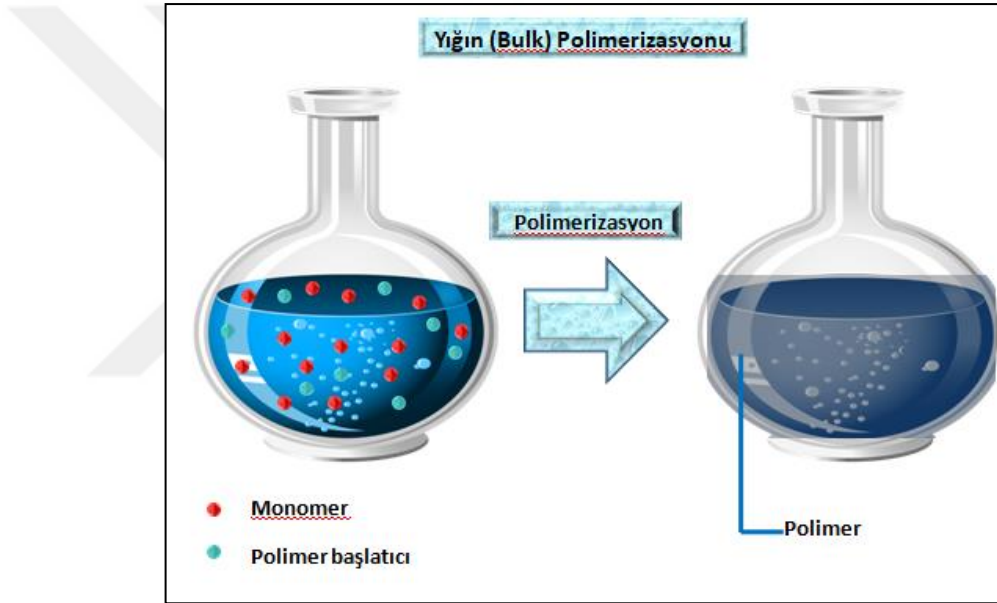
Moleküler baskılamada kullanılan bir diğer yaklaşım kovalent olmayan baskılamadır. Bu yaklaşımda, fonksiyonel monomer ile kalıp molekül arasındaki ön kompleks kovalent olmayan etkileşimlerle (hidrojen bağı, elektrostatik etkileşimler gibi) oluşturulur. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra uygun çözücü/çözücü karışımları ile kalıp molekül kolaylıkla polimerden uzaklaştırılır. Kalıp molekül ile baskılanmış polimer bundan sonraki çalışmalarda kovalent olmayan etkileşimlerle bağlanır (Molinelli, 2004; Öncel ve diğer., 2005). Kovalent baskılama ile kıyaslandığında daha zayıf etkileşimler üzerinden gerçekleşmekle birlikte çok yönlü bağlanma sağlanabilmesi nedeniyle kovalent olmayan baskılama yöntemi dikkatleri üzerine çekmiştir (Shea ve Dougherty, 1986).

1.4 Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Sentez Teknikleri

1. Yığın (Bulk) polimerizasyonu
2. Süspansiyon polimerizasyonu
3. Çöktürme polimerizasyonu
4. Çok Adımlı Şişme Polimerizasyonu
5. Yüzey Polimerizasyonu
6. Emülsiyon Polimerizasyonu

1.4.1 Yığın (Bulk) polimerizasyonu

Yığın (Bulk) polimerizasyonunda polimerizasyon için gerekli tüm bileşenler (kalıp molekül, monomer, porojen, çapraz bağlayıcı ve başlatıcı) karıştırıldıktan sonra azot veya argon gazı kullanılarak ortamda bulunan serbest oksijen uzaklaştırılır (Şekil 1.6). 24 saat süreyle polimerleşmeye bırakılan karışım yığın halindedir, istenilen tanecik boyutuna getirilebilmesi için uygun öğütme yöntemleri kullanılır. Öğütme işlemlerindeki en büyük dezavantaj, polimerin baskılanmış etkileşim bölgelerinin zarar görmesidir; bu durum başlangıç polimerin etkin bölgelerinde % 50-75 e varan kayba neden olabilmektedir (He ve diğer, 2007).

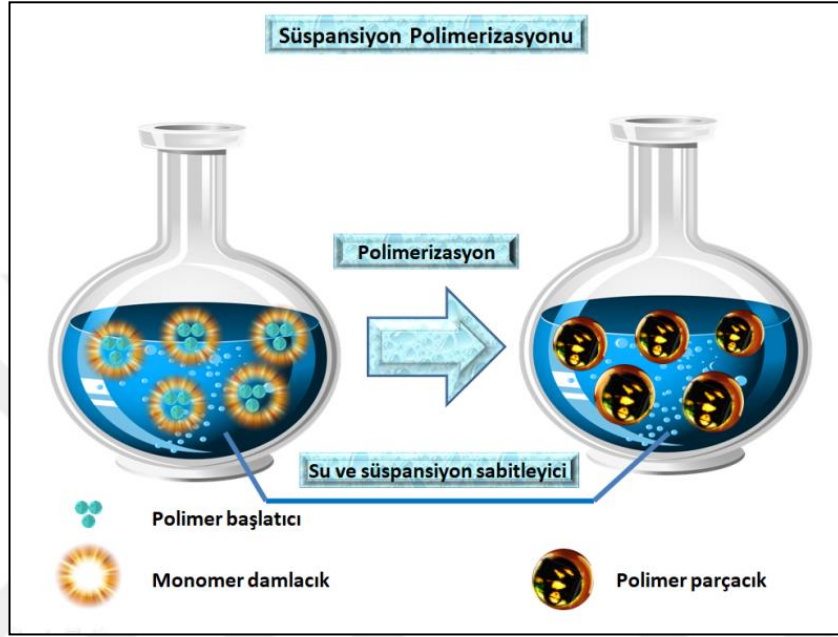


Şekil 1.6 Yığın (Bulk) polimerizasyonu

1.4.2 Süspansiyon polimerizasyonu

Monomer ile karışmayan bir sıvı içerisinde monomerin dağılıp asılı tutulması şeklinde gerçekleşen süspansiyon polimerizasyonunda, mekanik olarak öğütmeye ve elemeye gerek olmadan küresel partiküller elde edilmektedir (Şekil 1.7). Monomerin su içinde damlalar halinde dağılmasıyla monomer süspansiyonu oluşturulur (Huang ve Brittain, 2001). Karıştırma hızı gibi fiziksel faktörler, monomer karışımı ve kullanılan kolloidal stabilizatörlerin kimyasal yapısı gibi parametreler, küresel

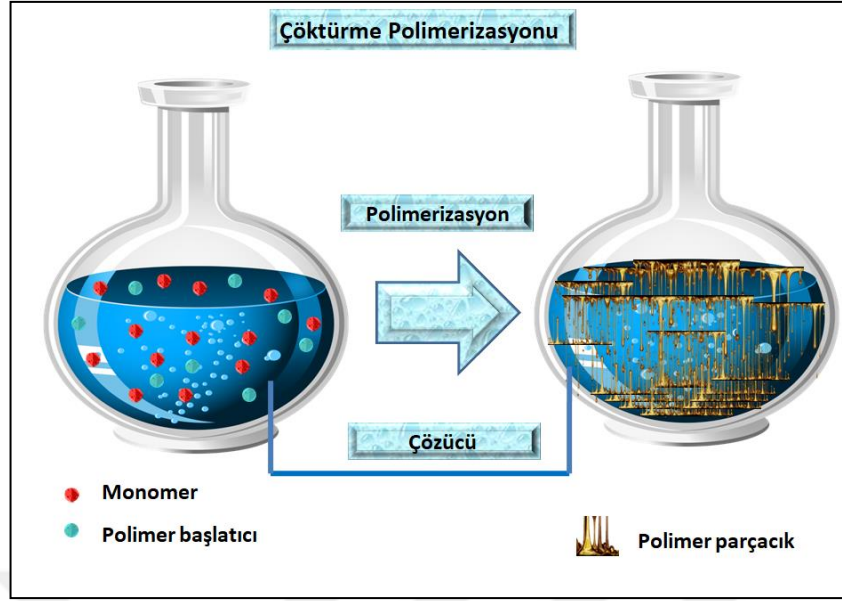
taneciklerin yapısını belirlemede etkindir. Stabilizatör olarak polivinilalkol ve polivinilpirolidon çözeltileri yaygın olarak kullanılır. Mekanik olarak öğütmeye ve elemeye gerek olmaması başlangıç polimerin etkin bölgelerinde verimin düşmesini engellemekte yığın polimerizasyonuna kıyasla avantaj sağlamaktadır (Mosbach ve Ramström, 1996; Whitcombe, Rodriguez, Villar ve Vulfson, 1995).



Şekil 1.7 Süspansiyon polimerizasyonu

1.4.3 Çöktürme polimerizasyonu

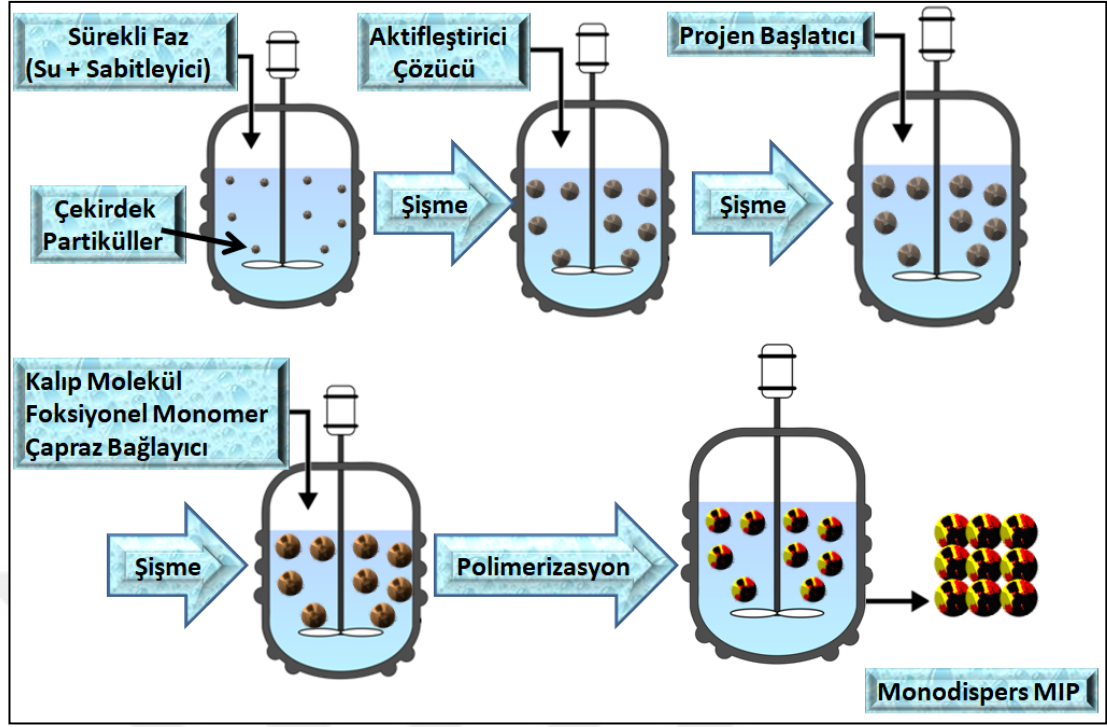
Çöktürme polimerizasyonunda, oligomerlerin oluşması için monomer ve başlatıcı, organik fazda birleştirilir ardından mikrokürecikler oluşur (Şekil 1.8). Çöktürme polimerizasyonu ile sentezlenen mikroküresel polimerler, yüzey aktif maddeye gerek duymadan çapraz bağlı yüzeyleri sayesinde birbirlerine yapışmadan oluşurlar. Çöktürme polimerizasyonu, yüzey aktif madde veya stabilizatöre gerek duymamasıyla süspansiyon polimerizasyonundan farklanır. Sistemde ortama aşırı miktarda porojen (çözücü) eklenmesi ise yığın polimerizasyonuyla arasındaki tek farkı oluşturur (Brüggemann ve diğer., 2000; Cacho ve diğer., 2004; Ye ve Mosbach, 2001).



Şekil 1.8 Çöktürme polimerizasyonu

1.4.4 Çok adımlı şişme polimerizasyonu

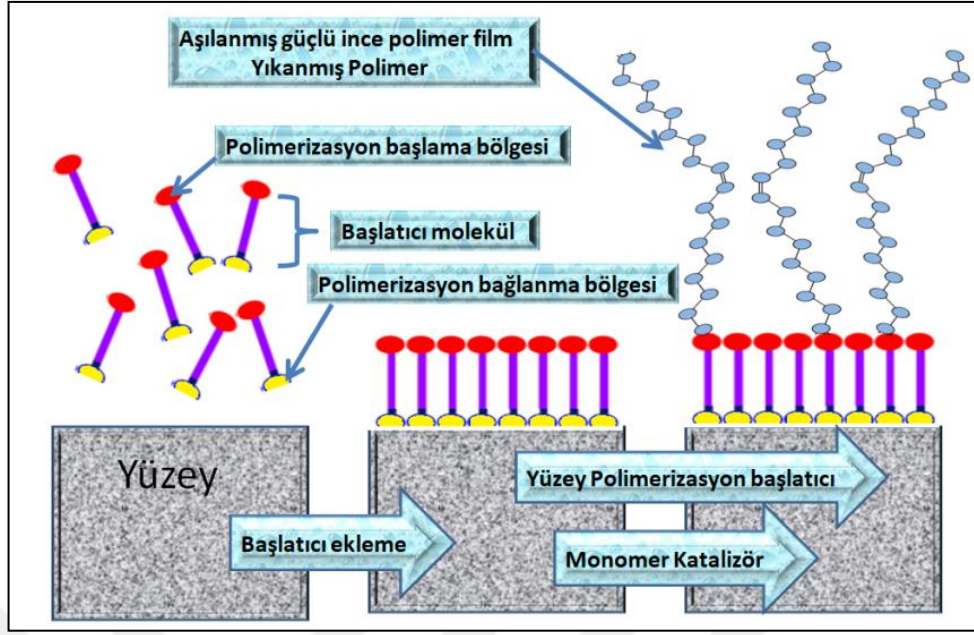
İlk kez Hosoya ve arkadaşları tarafından tanımlanan bu yöntemle, aminofitalin baskılanmış polimer sulu ortamda iki basamaklı polimerizasyon metoduyla hazırlanmıştır (Hosoya ve diğer., 1994). İlk basamakta, aktifleştirici çözücü ve monomer ile polistiren çekirdek parçacığı adım adım şişirilmiş; ikinci aşamada, süspansiyon polimerizasyonu ile hazırlanmış çapraz bağlı olmayan bu parçacıklar, çözücü, kalıp molekül, fonksiyonel monomer ve çapraz bağlayıcı ile termal veya foto polimerizasyona bırakılmıştır (Şekil 1.9). Çok adımlı şişme polimerizasyonu ile istenilen eş boyutlu küresel partiküller elde edilebilir, hazırlanan partiküllere demir oksit eklenmesiyle manyetik özellikler de kazandırılabilir. Sürekli faz olarak su kullanıldığında kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki etkileşimlerin bozulması, bu yöntemin en önemli dezavantajıdır.



Şekil 1.9 Çok adımlı şişme polimerizasyonu

1.4.5 Yüzey polimerizasyonu

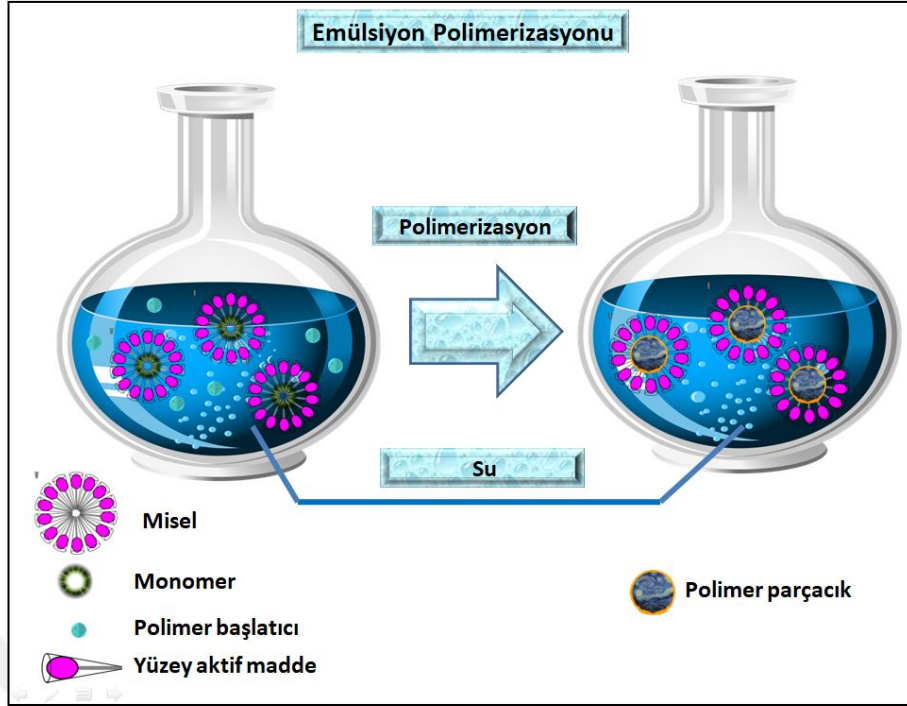
Klasik metotlarda karşılaşılan en büyük problemler, kütle transferinin sınırlı olması ve kalıp molekülün uzaklaştırılma zorluğudur. Bu problemleri çözmek amacıyla geliştirilmiş metotlardan biri de yüzey baskılamadır. Moleküler baskılanmış polimerik filmi oluşturmak için yüzey baskılamada altın veya karbon gibi uygun bir substrat kullanılır (Şekil 1.10). Bu metotla hazırlanan MIP filmleri yüzey plazmon rezonans sensör elektrotları veya kuvarz kristal mikroterazi (QCM) bileşeni olarak kullanılmaktadır (Liu ve diğer., 2006).



Şekil 1.10 Yüzey polimerizasyonu

1.4.6 Emülsiyon polimerizasyonu

Uygun emülsiyon yapıcılar yardımıyla su içinde çok ince dağılmış monomerin polimerleştirilmesi, emülsiyon polimerizasyonu olarak adlandırılmaktadır. Emülsiyon polimerizasyonunda monomer yüzey aktif bir madde (sabun gibi) ile kararlı hale getirilir. Polimerleşme, misel olarak adlandırılan bu damlacıklarda hızlı ve oldukça düşük sıcaklıklarda gerçekleşir. Her bir miselin yapısında 50-100 emülsiyon yapıcı molekül bulunur. Monomer, miseller su içerisinde çözüldükten sonra ortama karıştırılarak ilave edilir. Bir kısmı suda çözünen monomerin diğer kısmı misellerin içine girerek onları şişirir. Emülsiyon yapıcı maddenin ortamda bulunan monomerlere tutunmasıyla polimerizasyon gerçekleşir (Şekil 1.11).



Şekil 1.11 Emülsiyon polimerizasyonu

Emülsiyon polimerizasyonunun en önemli avantajları, polimerizasyon hızının yüksek olması, sıcaklık kontrolünün kolay olması ve organik çözücü kullanılmamasıdır. Öte yandan, polimerden miseli uzaklaştırmak zordur (Baysal, 1994).

Kalıp molekülün boyutunu, yapısını ve fizikokimyasal özelliklerini tanıyarak seçici ve etkin bir şekilde hedef molekülü bağlayan moleküler baskılanmış polimerler son yıllarda kataliz, kontrollü ilaç salınımı, amino asitlerin ayrılması, kiral ayırmalar, geniş bir aralıkta analitlerin ekstraksiyonu, elektrokimyasal ve biyosensörler gibi birçok biyomedikal ve biyoteknolojik uygulamada kullanım alanı bulmuştur. Bu nedenle bu çalışmada, kompleks biyolojik matrislerdeki testosteronun belirlenme ve kantitatif tayinine olanak sağlayacak p(HEMA-MAAL) nanopartiküllerin sentezi, FTIR, SEM ve TG-DTA analizleri ile karakterize edilmesi ve kalıbın uzaklaştırılması ile TSN adsorpsiyon koşullarının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

BÖLÜM İKİ

MATERYAL METOD

2.1 Reaktifler

N-metakriloil-L-alanin metilester (MAAL) monomeri, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Sinan Akgöl'ün laboratuvarında sentezlenmiştir. Testosteron (TSN), metanol (MeOH) ve asetonitril (ACN), HPLC saflıkta olup Sigma Aldrich firmasından temin edilmiştir. Çalışmalarda kullanılan su, Millipore ultra saf su cihazı [Millipore Corporation (France) Elix 5 ® reverse osmos ünitesi, elektrodeiyonizasyon (E.D.I) modülü (Elix ® 5 Water System), organik/kolloid uzaklaştırıcı iyon değişim sistemi] ile üretilmiştir. Kullanılan diğer tüm kimyasallar analitik saflıktadır.

2.2 Kullanılan Cihazlar

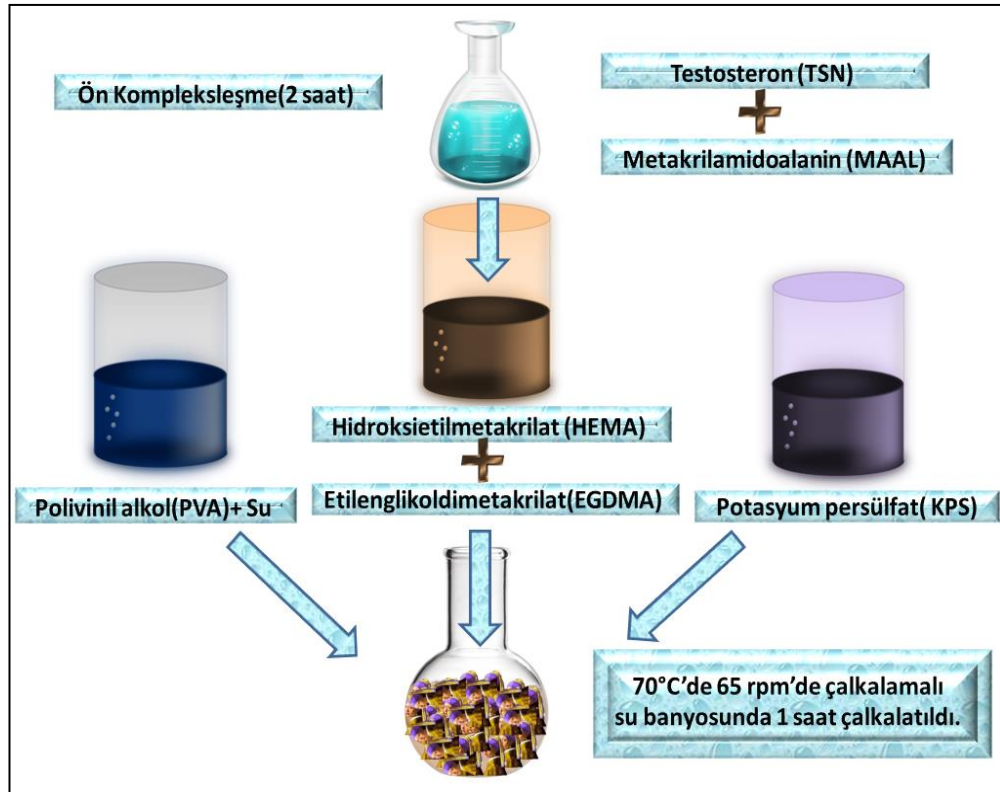
Deneylerde, HPLC (Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 LC), Millipore ultra saf su cihazı [Millipore Corporation (France) Elix 5 ® reverse osmos ünitesi, elektrodeiyonizasyon (E.D.I) modülü (Elix ® 5 Water Purification System), organik/kolloid uzaklaştırıcı iyon değişim sistemi], santrifüj (Hettich Rotina 380R), kuru sistem orbital çalkalayıcı (Barnstead Lab-Line Max Q 4000) kullanılmıştır.

2.3 Testosteron Baskılanmış p(HEMA-MAAL) Nanopartiküllerin Sentezi

Çalışma kapsamında, TSN baskılanmış p(HEMA-MAAL) nanopartikülleri, metakriloilamido-L-alanin (MAAL, fonksiyonel monomer), 2-hidroksietilmetakrilat (HEMA, monomer), etilenglikol dimetakrilat (EGDMA, çapraz bağlayıcı), polivinilalkol (PVA, dispersiyon fazı) ve potasyumpersülfat (KPS, serbest radikal başlatıcı) kullanılarak sürfaktansız emülsiyon polimerizasyonu ile sentezlenmiştir.

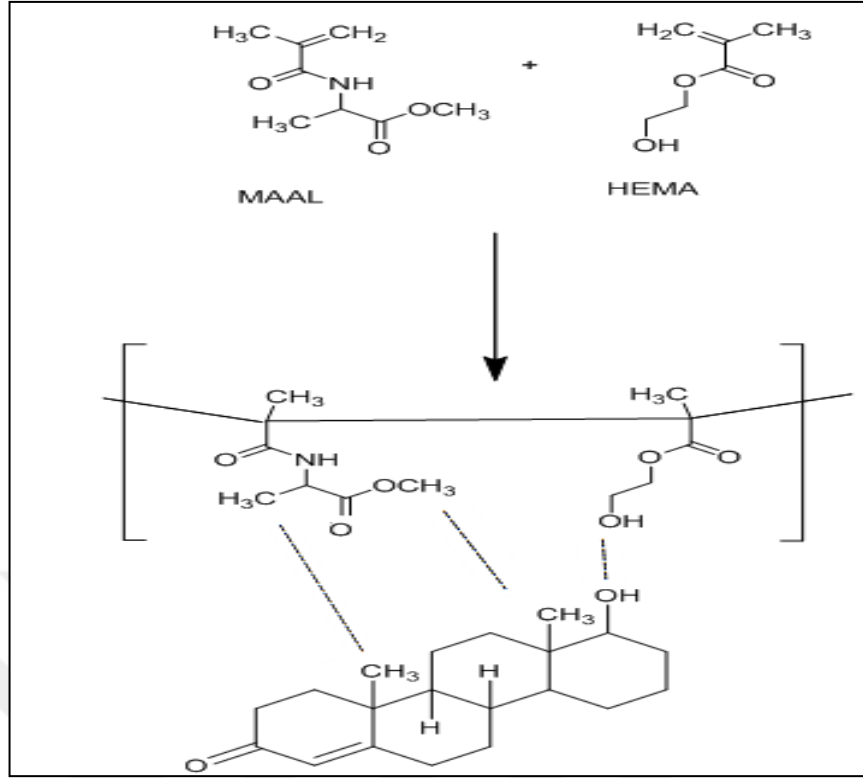
İlk aşamada, mmol oranı 1:4 olarak hesaplanmış olan kalıp/fonksiyonel monomer (TSN/MAAL) karışımı ön kompleks oluşumu için 2 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. 0,0198 g KPS (başlatıcı) 45 mL suda çözölmüş, ayrı bir

beherde 0,275 g PVA 25 mL distile suda çözülerek dispersiyon fazı hazırlanmıştır. Daha sonra, bu çözeltiler ile birlikte 0,6 mL HEMA, ön kompleks çözeltisi ve 0,3 mL EGDMA reaktöre ilave edilmiştir. Reaksiyon için hazırlanmış çözeltiler N₂ gazından geçirilerek O₂ gazının uzaklaştırması sağlanmış ve 70°C’de 65 rpm’de çalkalamalı su banyosunda reaksiyon başlatılmıştır (Şekil 2.1). 1 saat sonunda ortamdaki reaksiyona girmeyen maddeler, 20 dakika 45.000 g’de çöktürülerek ve daha sonra sırasıyla etanol, etanol-su (1:1) ve saf suyla toplamda üç kez yıkanarak ortamdan uzaklaştırılmıştır. Yıkama işleminden sonra kalıp molekül olan testosteronu polimerik yapıdan uzaklaştırmak için desorpsiyon ajanı olarak metanol:asetik asit (% 1’lik) (49:1) karışımı kullanılmıştır. 12 saatlik zaman aralıklarında polimer çöktürölüp taze desorpsiyon çözeltisine aktarılmış ve bu işleme desorpsiyon çözeltisi içerisinde testosteron tayin edilemeye kadar devam edilmiştir. Kalıp molekül uzaklaştırılan nanopartiküller, 70 mL deiyonize su içerisinde tekrar dağıtılıp 4°C’de saklanmıştır.



Şekil 2.1 TSN baskılanmış p(HEMA-MAAL) nanopartiküllerin sentez şeması

p(HEMA- MAAL) nanopartiküllerin sentezine ait olası tepkime ve olası etkileşimler Şekil 2.2’de verilmiştir.



Şekil 2.2 p(HEMA- MAAL) nanopartiküllerin sentezine ait olası reaksiyon şeması ve olası etkileşimler

2.4 TSN Baskılanmış p(HEMA-MAAL) Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Sentezlenen p(HEMA-MAAL) nanopartiküller, Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM), boyut (Zeta Sizer), Fourier Dönüştümlü Infrared Spektroskopisi (FTIR) ve termal gravimetrik analiz (DTA-TGA) kullanılarak karakterize edilmiştir.

p(HEMA-MAAL) nanopartiküllerin yüzey morfolojini belirlemek amacıyla Dokuz Eylül Üniversitesi Elektronik Malzemeler Üretimi ve Uygulama Merkezi'nde (EMUM) SEM görüntüleri alınmıştır. Örnekler analiz öncesi 7 gün süreyle 25°C'de kurutulmuş, iletkenliğini arttırmak amacıyla yüzeye altın kaplama yapıldıktan SEM cihazı (Quanta 250 S FEG) ile görüntü alınmıştır. Örneğin yüzeyi, nanokürelerin morfolojisini belirlemek için istenilen büyüklükte taranmıştır.

TSN baskılanmış p(HEMA-MAAL) nanopartiküllerin boyutları Zeta Sizer (Malvern Instruments, Model 3000 HSA, England) belirlenmiştir.

p(HEMA-MAAL) nanopartiküllerin FTIR spektrumu, FTIR spektrofotometresi (Perkin Elmer 100 FTIR) kullanılarak elde edilmiştir. Bu amaçla, kurutulmuş mikroküreler (0,1 g), KBr (0,1 g, IR Grade, Merck, Almanya) ile homojen olarak karıştırılarak tablet haline getirilip 4000-450 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında FTIR spektrumu çekilmiştir.

TSN baskılanmış p(HEMA-MAAL) nanopartiküllerin termal kararlılığı, EXSTAR S11 7300 DTA-TGA cihazı kullanılarak 10°C/dak ısıtma hızında çalışılarak çizilen termal gravimetrik (TGA) ve türev termal gravimetrik eğrileri kullanılarak belirlenmiştir.

2.5 TSN Baskılanmış p(HEMA-MAAL) Nanopartiküllere Testosteron Adsorpsiyonu ve Desorpsiyon Koşullarının İncelenmesi

TSN-baskılanmış p(HEMA-MAAL) nanopartiküller ile adsorpsiyon koşullarını optimize etmek amacıyla sorbent miktarı, süre, derişim ve sıcaklık gibi parametrelerin adsorpsiyona etkisi incelenmiştir.

2.5.1 Sürenin TSN Adsorpsiyonuna Etkisi

Sürenin TSN adsorpsiyonu üzerine etkisini belirlemek amacıyla 5 mL 50 ppm TSN çözeltisi ve 600 µL p(HEMA-MAAL) nanopartikülleri içeren 6 adet deney tüpü sırasıyla 1, 2, 4, 6, 8, 12 ve 18 saat süreyle 25°C sıcaklıkta 150 rpm hızla çalkalayıcıda çalkalanmış ve süre sonunda örnekler 20 dk 10000 rpm hızla santrifüjlenerek üst fazdaki TSN derişimleri HPLC ile belirlenmiştir. Adsorplanan TSN miktarı aşağıdaki eşitlik kullanılarak % olarak hesaplanmıştır:

$$\% Ads = C_{son}/C_i \times 100 \quad (2.1)$$

Bu eşitlikte, C_i başlangıç TSN derişimini (mg/L); C_{son}, adsorpsiyon sonrası belirlenen TSN derişimini (mg/L) ifade eder.

2.5.2 Sorbent Miktarının TSN Adsorpsiyonuna Etkisi

Adsorpsiyona sorbent miktarının etkisini değerlendirmek üzere 5 mL 50 ppm TSN çözeltisine sentezlenen p(HEMA-MAAL) nanopartiküllerden 100-800 µL aralığında eklenerek 4 saat süre ile 25°C sıcaklıkta 150 rpm hızla çalkalayıcıda çalkalanmış ve sonrasında 20 dk 10000 rpm hızla santrifüjlenerek TSN miktarları belirlenmiştir.

2.5.3 Başlangıç Derişiminin TSN Adsorpsiyonuna Etkisi

Adsorpsiyon üzerine TSN başlangıç derişiminin etkisini değerlendirmek üzere 5-100 ppm derişim aralığındaki TSN çözeltileri hazırlanmış ve her birine 600 µL p(HEMA-MAAL) nanopartikülleri eklenmiştir. Her bir tüp 4 saat süre ile 25°C sıcaklıkta 150 rpm hızla çalkalayıcıda çalkalanmış ve sonrasında 20 dk 10000 rpm hızla santrifüjlenerek TSN miktarları belirlenmiştir.

2.5.4 Sıcaklığın TSN Adsorpsiyonuna Etkisi

Sıcaklığın adsorpsiyon üzerindeki etkisini incelemek için 5 mL 50 ppm TSN çözeltisi ve 600 µL p(HEMA-MAAL) nanopartikül içeren 5 deney tüpü ayrı ayrı sırasıyla 15-55°C sıcaklık aralığında 4 saat 150 rpm hızla çalkalayıcıda çalkalanmış ve sonrasında 20 dk 10000 rpm hızla santrifüjlenerek TSN miktarları belirlenmiştir.

2.5.6 Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

p(HEMA-MAAL) afinite sorbenti üzerinde adsorplanmış olarak bulunan TSN'nin etkin desorpsiyonunu sağlamak amacıyla, metanol:asetik asit (% 1'lik) (49:1) karışımı ile çalışılmıştır. Belirlenen desorpsiyon ajanı ile 5 adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü ile tekrar kullanılabilirliği çalışılmıştır.

2.6 TSN'un HPLC ile Analiz Koşulları

TSN'un HPLC ile analizi, (Jian Lin ve diğer..2012) yöntemi modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. Kromatografik koşullar aşağıdaki gibidir (Tablo 2.1):

Tablo 2.1 TSN'un HPLC ile tayininde kullanılan kromatografik koşullar

Cihaz	Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 LC sistem (diode array dedektör, oto-örnekleyici, kolon fırını)
Akış Hızı (mL/dk)	1,5
Sıcaklık (°C)	30
Enjeksiyon Hacmi (µL)	20
Kolon	ODS (150mm x 4,6mm x 5µm)
Dalga boyu (nm)	240
Çalışma şekli	İzokritik
Mobil Faz	ACN:MeOH: % 1'lik AcAc (40:30:30)
t _R (dk)	3,01

BÖLÜM ÜÇ

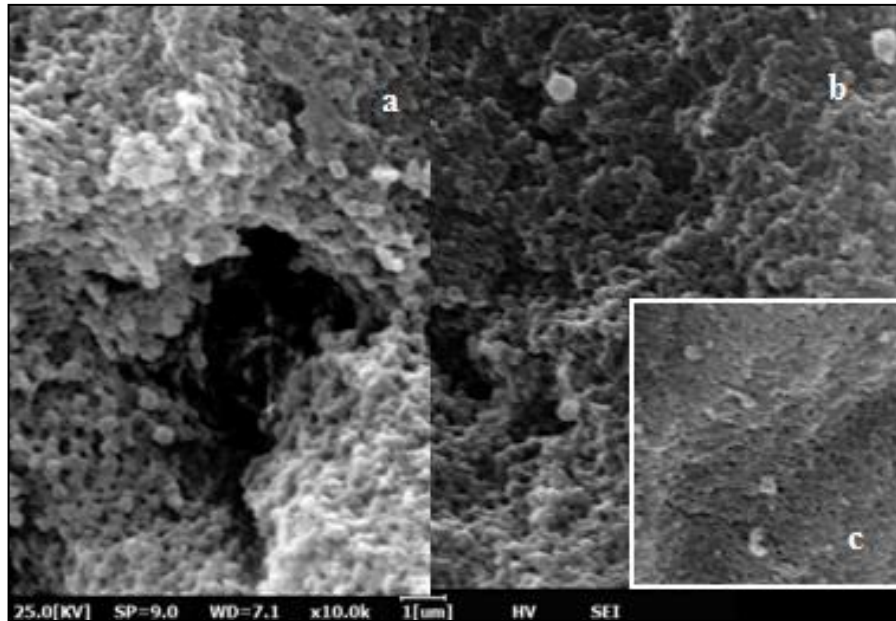
SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3.1 TSN Baskılanmış p(HEMA-MAAL) Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

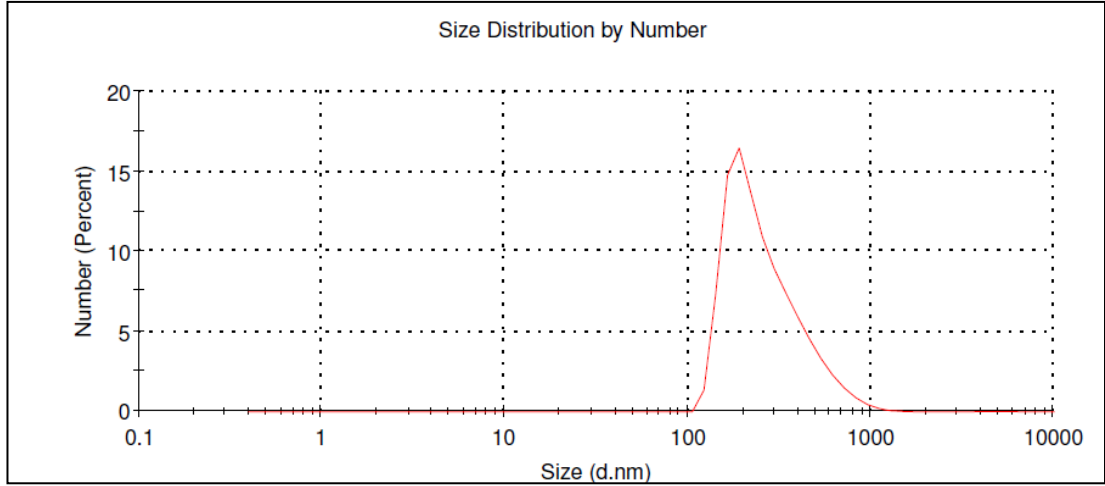
Metakriloilamido-L-alanin (MAAL) ve 2-hidroksietilmetakrilat (HEMA) monomerleri kullanılarak sürfaktansız emülsiyon polimerizasyonu ile sentezlenen TSN baskılanmış p(HEMA-MAAL) nanopartiküllerin karakterizasyonu SEM, Zeta-Sizer, FTIR, DTA-TGA analizleri ile gerçekleştirilmiştir.

3.1.1 TSN Baskılanmış p(HEMA-MAAL) Nanopartiküllerin SEM ve Boyut Analizi

Küresel şekilli p(HEMA-MAAL) nanopartikülleri, sürfaktansız emülsiyon polimerizasyon yöntemi ile hazırlanmıştır. Nanopartiküllerin SEM görüntüsü Şekil 3.1’de gösterilmiştir. SEM görüntülerinden görüldüğü üzere p(HEMA-MAAL) nanopartikülleri, pürüzlü bir yüzeye sahip ve küresel yapılıdır. Boyut analiz sonuçlarına göre TSN baskılanmış p(HEMA-MAAL) nanopartiküllerinin ortalama 278 nm oldukları belirlenmiştir (Şekil 3.2).



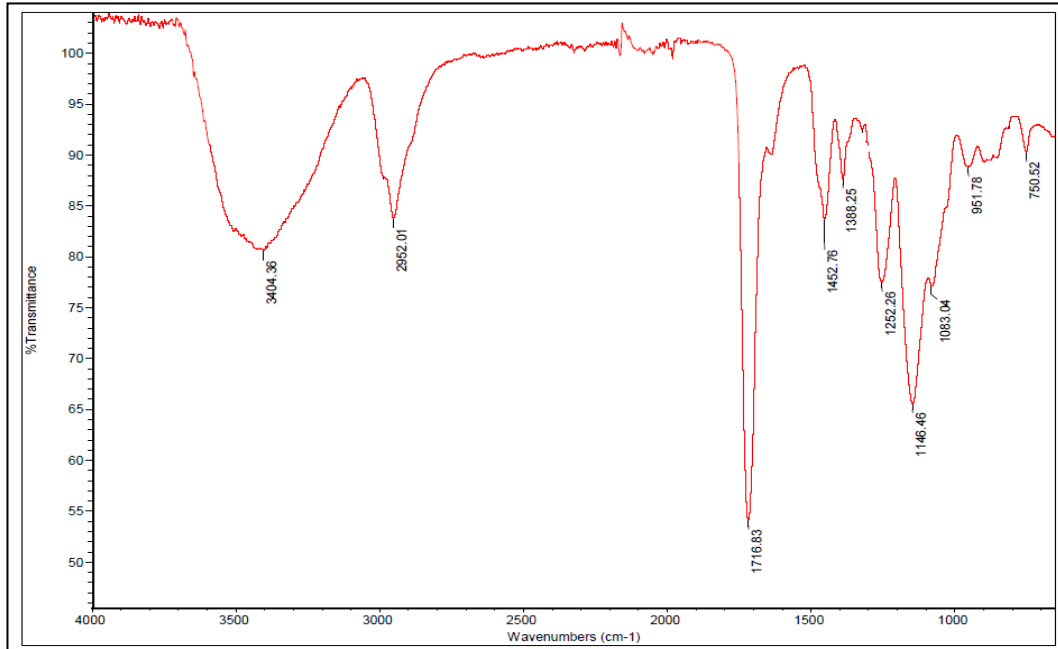
Şekil 3.1 TSN baskılanmış p(HEMA-MAAL) nanopartiküllerin SEM görüntüsü



Şekil 3.2 TSN baskılanmış p(HEMA-MAAL) nanopartiküllerin boyut analizi

3.1.2 TSN Baskılanmış p(HEMA-MAAL) Nanopartiküllerin FTIR Analizi

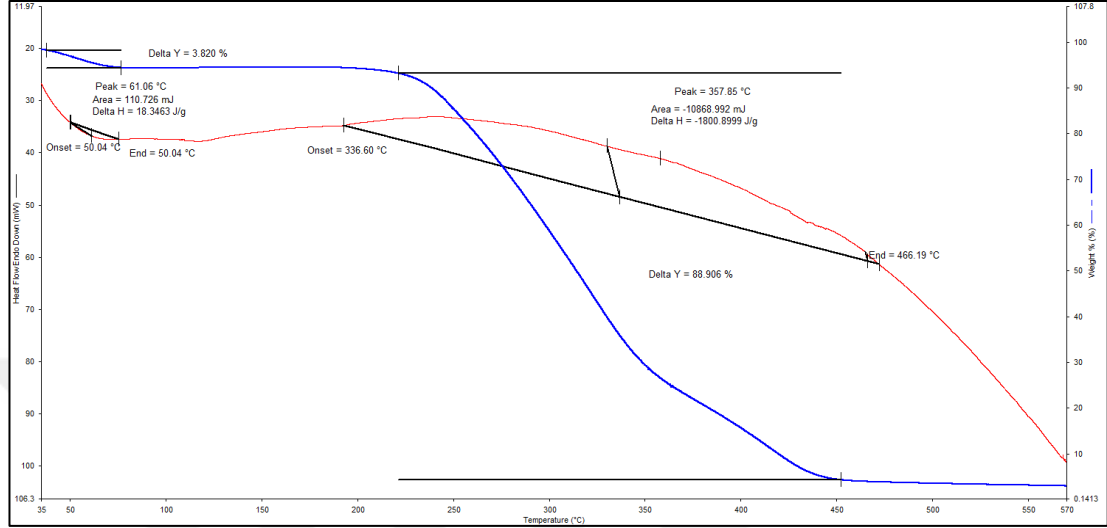
Sentezlenen polimerin FTIR sonuçlarına göre; 3404 cm^{-1} 'deki geniş bant MAAL yapısındaki N-H ve HEMA yapısındaki O-H gerilme, 2950 cm^{-1} bandı C-H gerilme, 1716 ve 1636 cm^{-1} bandı C=O gerilme, 1452 ve 1386 cm^{-1} bandı CH_3 eğilme, 1252 cm^{-1} bandı C-H eğime, 1146 ve 951 cm^{-1} bandı C-O-C gerilme ve 750 cm^{-1} bandı C-H düzlem dışı eğilme varlığını göstermektedir.



Şekil 3.3 TSN baskılanmış p(HEMA-MAAL) nanopartiküllerin FTIR spektrumu

3.1.3 TSN Baskılanmış p(HEMA-MAAL) Nanopartiküllerin DTA-TGA Analizi

TGA analizi ile polimerin kütlesinin sıcaklığa bağlı değişimi incelenmiştir.



Şekil 3.4 TSN baskılanmış p(HEMA-MAAL) nanopartiküllerin DTA-TGA analizi

Şekil 3.4'ten görüleceği üzere, DTA-TGA analiz sonuçlarına göre polimerde 336.6° C'de başlayıp 466.2°C'de tamamlanan kütle kaybı yaklaşık % 88,9 olarak belirlenmiştir. Bu durumda polimerin yaklaşık 300°C'ye kadar termal kararlılığa sahip olduğu söylenebilir.

3.2 TSN Baskılanmış p(HEMA-MAAL) Nanopartiküllerin Adsorpsiyon ve Desorpsiyon Koşullarının İncelenmesi

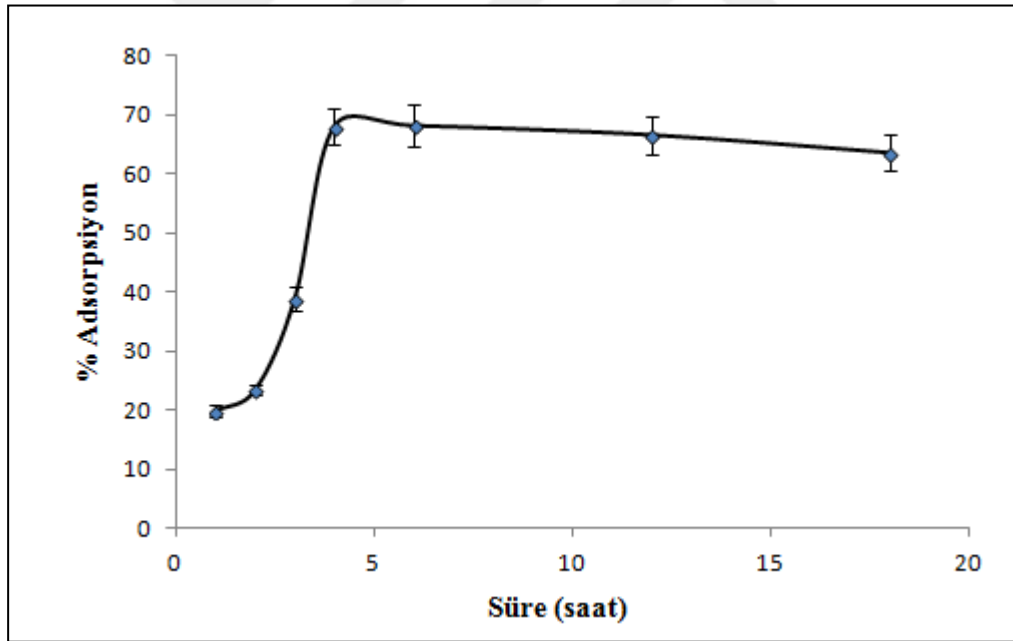
3.2.1 TSN Baskılanmış p(HEMA-MAAL) Nanopartiküllere TSN Adsorpsiyonunun Optimizasyonu

TSN'un en yüksek kapasitede adsorpsiyonunu sağlamak amacı ile süre, sorbent miktarı, başlangıç TSN derişimi ve sıcaklık gibi parametrelerin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. HPLC ile yapılan analiz sonucu TSN miktarları belirlenerek sonuçlar hesaplanmıştır.

3.2.1.1 Sürenin TSN Adsorpsiyonuna Etkisi

Sürenin TSN adsorpsiyonu üzerine etkisini belirlemek amacıyla 5 mL 50 ppm TSN çözeltisi ve 600 µL p(HEMA-MAAL) nanopartikülleri içeren 6 adet deney tüpü sırasıyla 1, 2, 4, 6, 8, 12 ve 18 saat süreyle 25°C sıcaklıkta 150 rpm hızla çalkalayıcıda çalkalanmış ve süre sonunda örnekler 20 dk 10000 rpm hızla santrifüjlendiren üst fazda TSN derişimleri HPLC ile belirlenmiştir.

Şekil 3.5'ten görüleceği üzere adsorplanan TSN yüzdesinde 4. saate kadar artış meydana gelmiş, 4. saatte adsorpsiyon dengeye ulaşmıştır. TSN baskılanmış p(HEMA-MAAL) sorbentindeki tüm bağlanma bölgelerinin dolması nedeniyle doygunluğa ulaştığı ve bu sürenin sonrası adsorpsiyon kapasitesinde değişim gözlenmediği belirlenmiştir. Bu nedenle, adsorpsiyon çalışmaları için optimum süre 4 saat olarak belirlenmiştir.

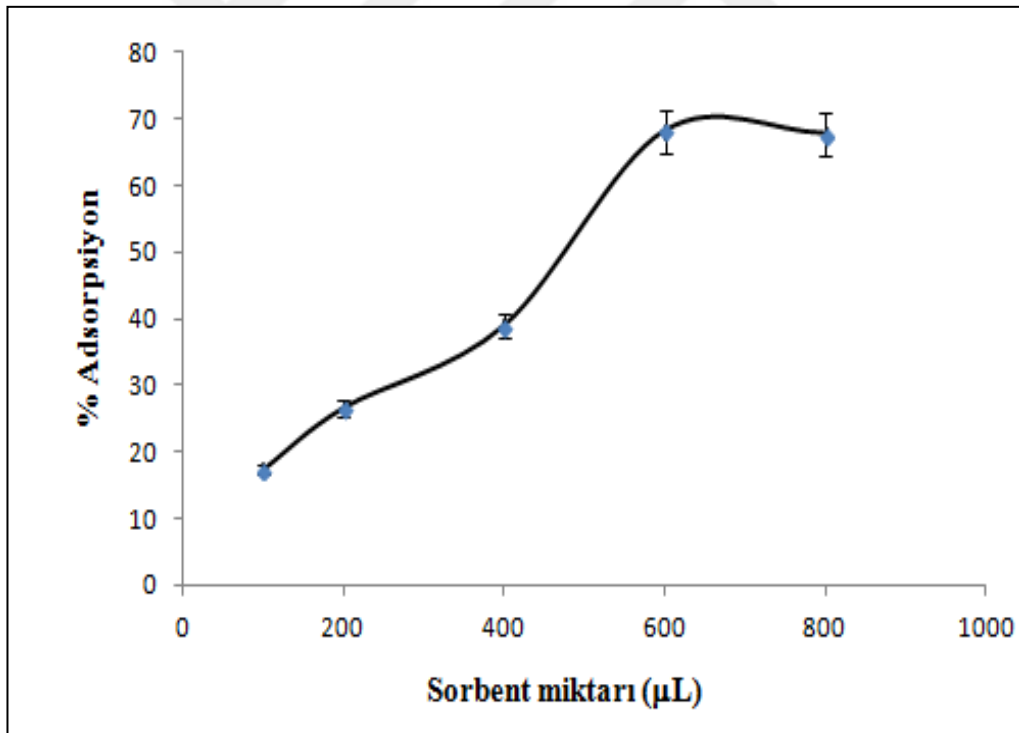


Şekil 3.5 Sürenin TSN adsorpsiyonuna etkisi (DeneySEL koşullar: 600 µL sorbent; 25°C; 50 ppm TSN)

3.2.1.2 Sorbent Miktarının TSN Adsorpsiyonuna Etkisi

Adsorpsiyona sorbent miktarının etkisini değerlendirmek üzere 5 mL 50 ppm TSN çözeltisine sentezlenen p(HEMA-MAAL) nanopartiküllerden 100-800 μL aralığında eklenerek 4 saat süre ile 25°C sıcaklıkta 150 rpm hızla çalkalayıcıda çalkalanmış ve sonrasında 20 dk 10000 rpm hızla santrifüjlenerek TSN miktarları belirlenmiştir.

Şekil 3.6'e bakıldığında, sorbent miktarı 100 μL 'den 600 μL 'ye artırıldığında adsorpsiyon kapasitesinde % 74,62 oranında artış gözlenmiştir. 600 μL 'nin üzerindeki sorbent miktarlarında adsorpsiyon kapasitesi doygunluk platosuna yaklaşmıştır. Bu nedenle, diğer tüm adsorpsiyon deneyleri 600 μL polimer hacmi ile gerçekleştirilmiştir.

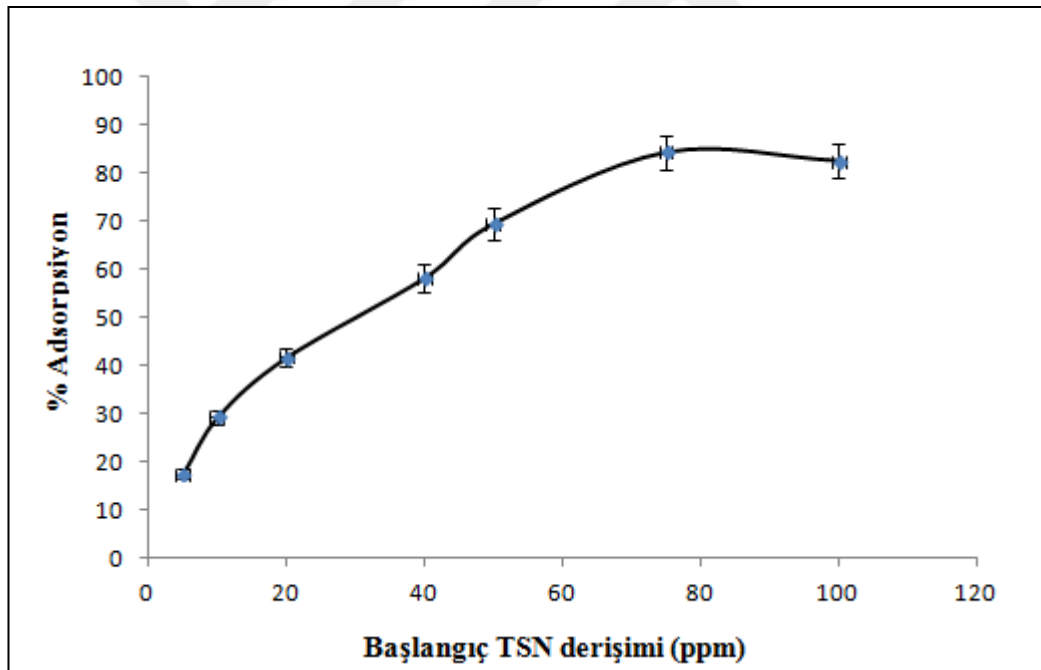


Şekil 3.6 Sorbent miktarının TSN adsorpsiyonuna etkisi (Deneysel koşullar: 25°C; 50 ppm TSN; 4 saat çalkalama)

3.2.1.3 Başlangıç Derişiminin TSN Adsorpsiyonuna Etkisi

Adsorpsiyon üzerine TSN başlangıç derişiminin etkisini değerlendirmek üzere 5-100 ppm derişim aralığındaki TSN çözeltileri hazırlanmış ve her birine 600 µL p(HEMA-MAAL) nanopartikülleri eklenmiştir. Her bir tüp 4 saat süre ile 25°C sıcaklıkta 150 rpm hızla çalkalayıcıda çalkalanmış ve sonrasında 20 dk 10000 rpm hızla santrifüjlenerek TSN miktarları belirlenmiştir.

Şekil 3.7’den görüleceği gibi, çözeltideki başlangıç TSN derişiminin artmasıyla, sorbent tarafından birim kütle başına adsorplanan TSN miktarı artmıştır, 75 ppm TSN konsantrasyonunda dengeye ulaşmıştır. TSN baskılanmış p(HEMA-MAAL) nanopartiküllerin maksimum adsorplama yüzdesi % 84,31, nanopartiküllerin maksimum adsorpsiyon kapasitesi (Qmax) 31,54 mg/g olarak belirlenmiştir.

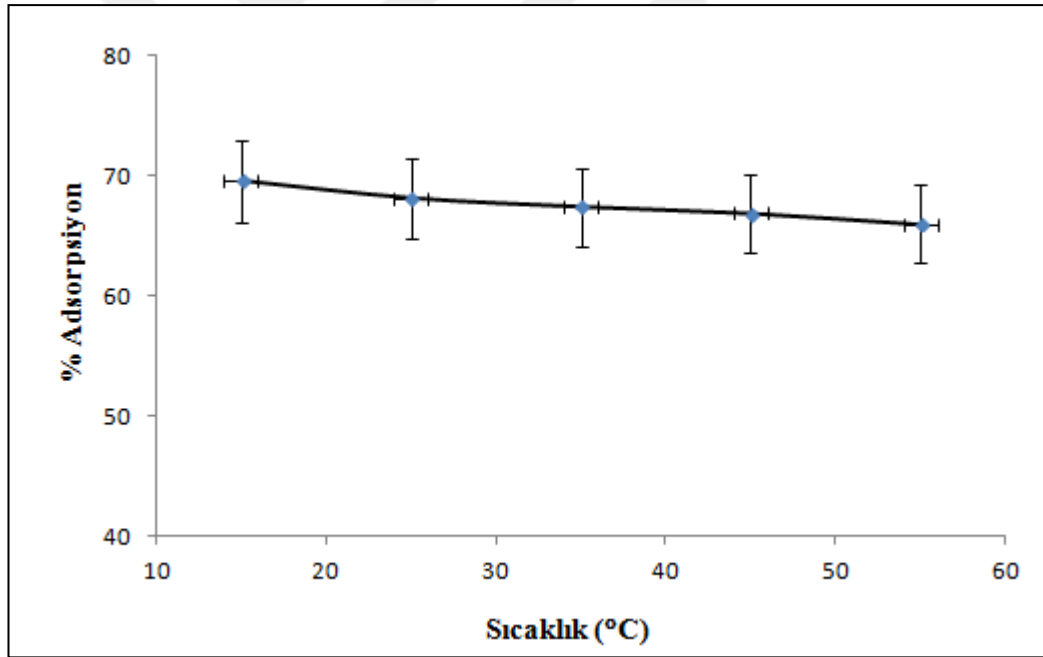


Şekil 3.7 Derişimin TSN adsorpsiyonuna etkisi (Deneysel koşullar: 600 µL sorbent; 25°C; 4 saat çalkalama)

3.2.1.4 Sıcaklığın TSN Adsorpsiyonuna Etkisi

Sıcaklığın TSN adsorpsiyonu üzerindeki etkisini incelemek için 5 mL 50 ppm TSN çözeltisi ve 600 µL p(HEMA-MAAL) nanopartikül içeren 5 deney tüpü ayrı ayrı sırasıyla 15-55°C sıcaklık aralığında 4 saat 150 rpm hızla çalkalayıcıda çalkalanmış ve sonrasında 20 dk 10000 rpm hızla santrifüjlenerek TSN miktarları belirlenmiştir.

Şekil 3.8'den görüleceği üzere, sıcaklığın 15°C'den 55°C'ye çıkarılmasıyla p(HEMA-MAAL) nanopartiküllere TSN adsorpsiyonu sadece % 5,14 oranında azalmıştır. Dolayısıyla TSN baskılanmış p(HEMA-MAAL) nanopartiküllere TSN adsorpsiyonunun sıcaklıktan bağımsız ilerlediği belirlenmiştir.

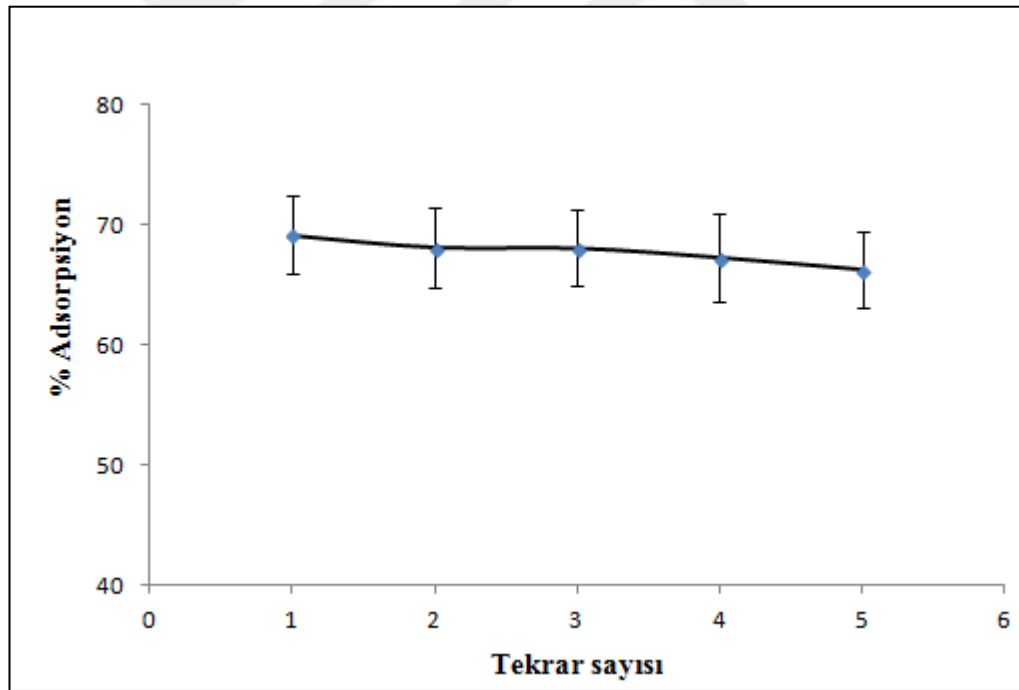


Şekil 3.8 Sıcaklığın TSN adsorpsiyonuna etkisi (DeneySEL koşullar: 600 µL sorbent; 50 ppm TSN; 4 saat çalkalama)

3.2.2 Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

p(HEMA-MAAL) afinite sorbenti üzerinde adsorplanmış olarak bulunan TSN'nin etkin desorpsiyonunu sağlamak amacıyla, metanol:asetik asit (% 1'lik) (49:1) karışımı ile çalışılmış ve adsorplanan TSN'un % 97,12 oranında desorplandığı belirlenmiştir.

Adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü 5 kez çalışılarak sorbentin tekrar kullanılabilirliği çalışılmıştır. Şekil 3.9'da görüldüğü üzere 5 döngü sonunda TSN baskılanmış p(HEMA-MAAL) nanopartiküllerin adsorpsiyon kapasitesinde anlamlı bir değişim olmamıştır. Bu sonuç, baskılanmış p(HEMA-MAAL) nanopartiküllerin TSN adsorpsiyonunda tekrar tekrar kullanılabilir düşük maliyetli bir sorbent olabileceğini göstermektedir.



Şekil 3.9 TSN baskılanmış p(HEMA-MAAL) nanopartiküllerin adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü

BÖLÜM DÖRT

SONUÇLAR

Karbohidrat, lipid ve protein metabolizmasındaki etkileri ve fazlalığı ya da eksikliğinin diyabet, obezite, osteoproz, kalp yetmezliği ve hatta kardiyal ani ölüm gibi hayati sonuçlar doğurması nedeniyle testosteronun doğru ve güvenilir tayini büyük önem taşımaktadır. Testosteron tayini amacıyla kullanılan immünojik testler ile elektrokimyasal ve kromatografik yöntemler gibi mevcut metodlar ise genelde bir ekstraksiyon adımı (çoğunlukla SPE) gereksinim duymaktadır. Bu aşamalarda SPE amaçlı kullanılan ve seçicilikleri oldukça düşük olan sorbentler ticari olarak temin edilmekte, dolayısıyla işlem maliyeti artmaktadır. Son yıllarda moleküler baskılanmış polimerler, bu dezavantajların üstesinden gelebilmek için alternatif sorbentler olarak geliştirilmektedir. Bu nedenle sözkonusu çalışmada, testosteronun belirlenme ve kantitatif tayinine olanak sağlayacak p(HEMA-MAAL) nanopartiküllerin MAAL (fonksiyonel monomer), HEMA (monomer) ve TSN (kalıp molekül) varlığında sürfaktansız emülsiyon polimerizasyonu ile sentezi; kalıbın uzaklaştırılmasından sonra FTIR, SEM ve TG-DTA analizleri ile karakterizasyonu ve TSN adsorpsiyon koşullarının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Hazırlanan TSN baskılanmış p(HEMA-MAAL) nanopartiküller kullanılarak 2,5 mg gibi çok az miktarda sorbent ile 4 saat gibi bir sürede testosteron adsorpsiyonunun tamamlanabileceği belirlenmiştir. TSN baskılanmış p(HEMA-MAAL) nanopartiküllere adsorplanan TSN, MeOH:Asetik asit (% 1'lik) (49:1) karışımı ile % 97,12 oranında desorbe edilmiş ve 5 döngü sonunda adsorpsiyon kapasitesinde anlamlı bir değişim olmaksızın TSN baskılanmış p(HEMA-MAAL) nanopartiküllerin etkin şekilde tekrar kullanılabilirliği belirlenmiştir.

Literatürde testosteron adsorpsiyonu veya katı faz ekstraksiyonu amacıyla farklı sorbentlerin kullanıldığı çeşitli çalışmalar mevcuttur. Örneğin, testosteronun kum ve kil gibi doğal sorbentler üzerine adsorplandığı Qi ve grubuna ait çalışmada, 0,2 g kil örneği için adsorpsiyon ve desorpsiyon sürelerinin sırasıyla 30 dk ve 20 saat, kum için 2,5 saat ve 6 saat olduğu; 24 ppm testosteron derişiminde maksimum

adsorpsiyonun kil için 35 µg/g olarak belirlendiği ifade edilmiştir (Qi ve diğer., 2014). Kum ve kil gibi doğal adsorbanların kullanıldığı bir başka çalışmada, 0,2 g adsorban ile 24 saat süreyle testosteron adsorpsiyonu çalışılmış ve 23C'de maksimum adsorpsiyonun kum için 27,78 ng/g ve kil için 99,35 ng/g olduğu belirlenmiştir (Qi ve diğer., 2015). Gadzala-Kopciucha ve ark., iki farklı fonksiyonel monomer (metakrilik asit, MAA ve 4-vinilpiridin, 4-VP) kullanarak baskılanmış polimerler hazırlamış ve steroidlerin izolasyonunda kullanımlarını denemiştir. Bu amaçla, 20 mg baskılanmış polimer ile 6 saat süreyle adsorpsiyon gerçekleştirilmiş ve polimerlerin adsorpsiyon yüzdeleri sırasıyla % 41 ve % 34 olarak belirlenmiştir. Sentezlenen MIPLer ile testosteronun HPLC ile analizi öncesi katı faz ekstraksiyonu gerçekleştirildiğinde ise 150 mg sorbent ile % 84 oranında geri kazanım elde edildiği belirtilmiştir (Gadzala-Kopciucha ve diğer., 2009). Testosteronun önderiştirilmesi ve izolasyonu amacıyla moleküler baskılanmış adsorbanların kullanıldığı bir başka çalışmada, yığın polimerizasyonu ile metakrilik asit tabanlı testosteron baskılanmış polimerin hazırlandığı, 150 mg polimer kullanılarak katı faz ekstraksiyonunun gerçekleştirildiği ve % 84 geri kazanım elde edildiği ifade edilmiştir (Ricanyova ve diğer., 2010). Literatürde testosteronun katı faz ekstraksiyonu amacıyla ticari SPE kartuşlarının kullanıldığı çeşitli çalışmalar da mevcuttur (Gonzalo-Lumbreras ve diğer., 2001; Savolainen ve diğer., 2011; Vulliet ve diğer., 2013).

Sonuç olarak, bu çalışma ile daha az destek materyali kullanılarak, kısa sürede ve az maliyetle etkin bir şekilde testosteron adsorpsiyonu ve ekstraksiyonuna olanak sağlayan bir yeni nesil afinite sistemi geliştirilmiştir. Geliştirilen TSN baskılanmış p(HEMA-MAAL) nanopartiküllerin serum, idrar gibi biyolojik örnekler ve su gibi çevresel örneklerdeki TSN tayini ve izolasyonuna yönelik çalışmalarda uygulama bulabileceği ve polimerin tekrar kullanılabilirliğinin olmasının bu tür uygulamalarda ekonomik avantaj sağlayabileceği söylenebilir.

KAYNAKLAR

- Ahlgrim, C., ve Guglin, M. (2009). Anabolics and cardiomyopathy in a bodybuilder: case report and literature review. *Journal of cardiac failure*, 15(6), 496-500.
- Alvarez-Lorenzo, C., ve Concheiro, A. (2008). Intelligent drug delivery systems: polymeric micelles and hydrogels. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 8(11), 1065-1074.
- Arthur C.- Hall ve John E. (2001). *Textbook of Medical Physiology*, (9th ed), Philadelphia:W.B. Saunders Company.
- Baysal B. (1994), *Polimer Kimyası*. Ankara: ODTÜ Basım İşliğı.
- Brüggemann, O., Visnjeviski, A., Burch, R., ve Patel, P. (2004). Selective extraction of antioxidants with molecularly imprinted polymers. *Analytica Chimica Acta*, 504(1), 81-88.
- Bui, H. N., Struys, E. A., Martens, F., de Ronde, W., Thienpont, L. M., Kenemans, P., ve Blankenstein, M. A. (2010). Serum testosterone levels measured by isotope dilution-liquid chromatography–tandem mass spectrometry in postmenopausal women versus those in women who underwent bilateral oophorectomy. *Annals of clinical biochemistry*, 47(3), 248-252.
- Cacho, C., Turiel, E., Martin-Esteban, A., Pérez-Conde, C., ve Cámara, C. (2004). Characterisation and quality assessment of binding sites on a propazine-imprinted polymer prepared by precipitation polymerisation. *Journal of Chromatography B*, 802(2), 347-353.
- Chapuis, F., Pichon, V., ve Hennion, M. C. (2004). Molecularly Imprinted Polymers: Developments and applications of new selective solid-phase extraction materials. *LC GC Europe*, 17(7), 408-417.

Cormack, P. A., ve Elorza, A. Z. (2004). Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation. *Journal of chromatography B*, 804(1), 173-182.

Çeviker T. (2017). *Akut koroner sendromlu hastalarda serbest testosteron ve dehidroepianrostenodion sülfat düzeyinin ölçülmesi*. Dahiliye Uzmanlık Tezi, T.C. S.B.İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastahanesi 6.Dahiliye Kliniği Şef. Dr. Burhan BEDİR, İstanbul.

De Piccoli, B., Giada, F., Benettin, A., Sartori, F., ve Piccolo, E. (1991). Anabolic steroid use in body builders: an echocardiographic study of left ventricle morphology and function. *International journal of sports medicine*, 12(04), 408-412.

de Souza, G. L., ve Hallak, J. (2011). Anabolic steroids and male infertility: a comprehensive review. *BJU international*, 108(11), 1860-1865.

Figueredo, V. M. (2011). Chemical cardiomyopathies: the negative effects of medications and nonprescribed drugs on the heart. *The American journal of medicine*, 124(6), 480-488.

Gadzała-Kopciuch, R., Ričanyová, J., ve Buszewski, B. (2009). Isolation and detection of steroids from human urine by molecularly imprinted solid-phase extraction and liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 877(11-12), 1177-1184.

Ganong, W. F., (1995) *Ganong Tıbbi Fizyoloji*, (Onaltıncı Baskı)(A.Doğan Çev.). İstanbul:Bariş Kitapevi/Appleton and Lange (Orijinal çalışma basım tarihi 1993)

- Gonzalo-Lumbreras, R., Pimentel-Trapero, D., ve Izquierdo-Hornillos, R. (2001). Solvent and solid-phase extraction of natural and synthetic anabolic steroids in human urine. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 754(2), 419-425.
- Hansen, D. E. (2007). Recent developments in the molecular imprinting of proteins. *Biomaterials*, 28(29), 4178-4191.
- Haupt, K., ve Mosbach, K. (2000). Molecularly imprinted polymers and their use in biomimetic sensors. *Chemical reviews*, 100(7), 2495-2504.
- Haupt, K. (2003). Imprinted polymers—tailor-made mimics of antibodies and receptors. *Chemical Communications*, (2), 171-178.
- He, C., Long, Y., Pan, J., Li, K., ve Liu, F. (2007). Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of analytes from real samples. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 70(2), 133-150.
- Herold, D. A. (2003). Immunoassays for Testosterone in Women: Better than a Guess? *Clinical Chemistry*, 49(8), 1250–1251.
- Hosoya, K., Yoshizako, K., Tanaka, N., Kimata, K., Araki, T., ve Haginaka, J. (1994). Uniform-size macroporous polymer-based stationary phase for HPLC prepared through molecular imprinting technique. *Chemistry letters*, 23(8), 1437-1438.
- Huang, X., ve Brittain, W. J. (2001). Synthesis and characterization of PMMA nanocomposites by suspension and emulsion polymerization. *Macromolecules*, 34(10), 3255-3260.
- Kayaalp, S. O. (2000). *Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji*.(1.baskı) ANKARA:Hacettepe-Taş Kitapçılık Limited Şti..

- Kicman, A. T. (2008). Pharmacology of anabolic steroids. *British journal of pharmacology*, 154(3), 502-521.
- Lee, L. S., Strock, T. J., Sarmah, A. K., ve Rao, P. S. C. (2003). Sorption and dissipation of testosterone, estrogens, and their primary transformation products in soils and sediment. *Environmental science & technology*, 37(18), 4098-4105.
- Lin, J., Zhang, C., Gao, Y., Zhao, X., ve Li, X. (2012). A validated HPLC method for determining melatonin in capsule dosage form. *Spatula DD*, 2(3), 147-151.
- Liu, F., Liu, X., Ng, S. C., ve Chan, H. S. O. (2006). Enantioselective molecular imprinting polymer coated QCM for the recognition of l-tryptophan. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 113(1), 234-240.
- Loi, V., Vertzoni, M., Vryonidou, A., ve Phenekos, C. (2006). Development and validation of a simple reversed-phase high-performance liquid chromatography method for the determination of testosterone in serum of males. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 41(2), 527-532.
- Mosbach, K., ve Ramström, O. (1996). The emerging technique of molecular imprinting and its future impact on biotechnology. *Bio/technology*, 14(2), 163.
- Mosbach, K. (2001). Towards the Development of Artificial Recognition Elements in Sensor Technology with Emphasis on Molecular Imprinting. *Electrochemical and industrial physics chemistry: denki kagaku*, 69(12), 919.
- Molinelli, A. L. (2004). *Molecularly imprinted polymers: Towards a rational understanding of biomimetic materials*. Doctoral dissertation, Georgia Institute of Technology, Atlanta.
- Moss, J. L., Crosnoe, L. E., ve Kim, E. D. (2013). Effect of rejuvenation hormones on spermatogenesis. *Fertility and sterility*, 99(7), 1814-1820.

- Öncel, Ş., Uzun, L., Garipcan, B., ve Denizli, A. (2005). Synthesis of phenylalanine-containing hydrophobic beads for lysozyme adsorption. *Industrial & engineering chemistry research*, 44(18), 7049-7056.
- Qi, Y., Zhang, T. C., ve Ren, Y. (2014). Testosterone sorption and desorption: Effects of soil particle size. *Journal of hazardous materials*, 279, 493-501.
- Qi, Y., ve Zhang, T. C. (2015). Sorption and desorption of testosterone at environmentally relevant levels: effects of aquatic conditions and soil particle size fractions. *Journal of Environmental Engineering*, 142(1), 04015045.
- Pascucci, V. L., Yeager, R. L., Sherins, R. J., Clark, R. V., Gallelli, J. F., ve Chatterji, D. (1983). Quantitation of testolactone and 4, 5-dihydrotestolactone in plasma and urine using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 277, 79-85.
- Pearson, A. C., Schiff, M., Mrosek, D., Labovitz, A. J., ve Williams, G. A. (1986). Left ventricular diastolic function in weight lifters. *American Journal of Cardiology*, 58(13), 1254-1259.
- Ramstroem, O., Andersson, L. I., ve Mosbach, K. (1993). Recognition sites incorporating both pyridinyl and carboxy functionalities prepared by molecular imprinting. *The Journal of Organic Chemistry*, 58(26), 7562-7564.
- Ricanyová, J., Gadzała-Kopciuch, R., Reiffova, K., Bazel, Y., ve Buszewski, B. (2010). Molecularly imprinted adsorbents for preconcentration and isolation of progesterone and testosterone by solid phase extraction combined with HPLC. *Adsorption*, 16(4-5), 473-483.
- Rosner, W ve Vesper, H., Endocrine Society the endorsing organizations. (2010). Toward excellence in testosterone testing: a consensus statement. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 95(10), 4542-4548.

- Savolainen, K., Kiimamaa, R., ve Halonen, T. (2011). High-throughput analysis of testosterone in serum samples by on-line solid phase extraction liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 49(11), 1845-1848.
- Shea, K. J., ve Dougherty, T. K. (1986). Molecular recognition on synthetic amorphous surfaces. The influence of functional group positioning on the effectiveness of molecular recognition. *Journal of the American Chemical Society*, 108(5), 1091-1093.
- Shiraishi, S., Lee, P. W., Leung, A., Goh, V. H., Swerdloff, R. S., ve Wang, C. (2008). Simultaneous measurement of serum testosterone and dihydrotestosterone by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Clinical chemistry*, 54(11), 1855-1863.
- Sjöqvist, F., Garle, M., ve Rane, A. (2008). Use of doping agents, particularly anabolic steroids, in sports and society. *The Lancet*, 371(9627), 1872-1882.
- Suzuki, Y., Hayashi, N., ve Sekiba, K. (1988). Automated direct assay system for the measurement of sex steroid hormones in serum using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 426, 33-40.
- Thienpont, L. M., Van, B. N., Stöckl, D., Reinauer, H., ve De, A. L. (1996, October). Determination of reference method values by isotope dilution-gas chromatography/mass spectrometry: a five years' experience of two European Reference Laboratories. *In European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry: Journal of the Forum of European Clinical Chemistry Societies*, 34(10), 853-860.

- Turiel, E., ve Martin-Esteban, A. (2004). Molecularly imprinted polymers: towards highly selective stationary phases in liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 378(8), 1876-1886.
- Van Home, K. C. (1985). *Sorbent extraction technology*, (2nd ed). Harbor City, CA: Analytichem International. Inc.,
- Vulliet, E., Giroud, B., ve Marote, P. (2013). Determination of testosterone and its photodegradation products in surface waters using solid-phase extraction followed by LC-MS/MS analysis. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(2), 1021-1030.
- Wackerlig, J., ve Lieberzeit, P. A. (2000). Polymers, Molecularly Imprinted. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, (7th ed) (1-20). Weinheim: Wiley-VCH.
- Whitcombe, M. J., Rodriguez, M. E., Villar, P., ve Vulfson, E. N. (1995). A new method for the introduction of recognition site functionality into polymers prepared by molecular imprinting: synthesis and characterization of polymeric receptors for cholesterol. *Journal of the American Chemical Society*, 117(27), 7105-7111.
- Wintersteiger, R., ve Sepulveda, M. J. (1993). Electrochemical detection of anabolics in human plasma and urine. *Analytica chimica acta*, 273(1-2), 383-390.
- Wulff, G., Grobe- Einsler, R., Vesper, W., ve Sarhan, A. (1977). Enzyme- analogue built polymers, 5. On the specificity distribution of chiral cavities prepared in synthetic polymers. *Die Makromolekulare Chemie: Macromolecular Chemistry and Physics*, 178(10), 2817-2825.

Ye, L., ve Mosbach, K. (2001). The technique of molecular imprinting—principle, state of the art, and future aspects. *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry*, 41(1-4), 107-113.

Ye, L., ve Mosbach, K. (2008). Molecular imprinting: synthetic materials as substitutes for biological antibodies and receptors. *Chemistry of Materials*, 20(3), 859-868.

Yu, Y., Ye, L., Haupt, K., ve Mosbach, K. (2002). Formation of a class of enzyme inhibitors (drugs), including a chiral compound, by using imprinted polymers or biomolecules as molecular- scale reaction vessels. *Angewandte Chemie International Edition*, 41(23), 4459-4463.

EKLER

EK 1 : Kısaltmalar

AAS Anabolik Androjenik Steroidler

AIBN Azobisisobütironitril

AUA Amerikan üroloji birliği

DHT Dehidrotestosteron

DHEA Dehydroepiandrosterone

DTA Diferansiyel termal analiz

EGDMA Etilen glikol dimetakrilat

FTIR Fourier dönüşümlü infrared spektrofotometresi

GC Gaz kromatografi

HEMA Hidroksietil metakrilat

HPLC Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

IA İmmünolojik test

ID izotop seyreltmeli spektrometri

KPS Potasyum persülfat

LH Luteinizan hormon

LC Sıvı kromatografisi

MAAL N-Metakriloilamidoalanin

MS Kütle spektrometresi

MIT Moleküler baskılama teknolojisi

PVA Polivinil alkol

QCM Kuvarz kristal mikroterazi

RIA Radyoaktif immünolojik test

SPE Katı faz ekstraksiyonu

SEM Taramalı elektron mikroskobu

TG Termogravimetrik analiz

TSN Testosteron

UV Ultraviyole