



**ÜRİK ASİT TAYİNİNE YÖNELİK MOLEKÜLER  
BASKILANMIŞ YÜZEY PLAZMON REZONANS  
SENSÖR HAZIRLANMASI**

**Aslı GÖÇENOĞLU SARIKAYA**



**T.C**  
**ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÜRİK ASİT TAYİNİNE YÖNELİK MOLEKÜLER**  
**BASKILANMIŞ YÜZEY PLAZMON REZONANS**  
**SENSÖR HAZIRLANMASI**

**Aslı GÖÇENOĞLU SARIKAYA**

**Doç. Dr. Bilgen OSMAN**  
**(Danışman)**

**DOKTORA TEZİ**  
**KİMYA ANABİLİM DALI**

**BURSA-2016**

### TEZ ONAYI

Aslı GÖÇENOĞLU SARIKAYA tarafından hazırlanan "ÜRİK ASİT TAYİNİNE YÖNELİK MOLEKÜLER BASKILANMIŞ YÜZEY PLAZMON REZONANS SENSÖR HAZIRLANMASI" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman : Doç. Dr. Bilgen Osman**

**Başkan :** Doç. Dr. Bilgen Osman  
U.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi,  
Kimya Anabilim Dalı

İmza 

**Üye :** Prof. Dr. Cevdet Demir  
U.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi,  
Kimya Anabilim Dalı

İmza 

**Üye :** Prof. Dr. Adil Denizli  
H.Ü. Fen Fakültesi,  
Kimya Anabilim Dalı

İmza 


**Üye :** Prof. Dr. Sinan Akgöl  
E.Ü. Fen Fakültesi,  
Biyokimya Anabilim Dalı

İmza 

**Üye :** Doç. Dr. Ali Kara  
U.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi,  
Kimya Anabilim Dalı

İmza 

Yukarıdaki sonucu onaylarım

  
**Prof. Dr. Ali Osman DEMİR**  
Enstitü Müdürü

.../.../... (Tarih)  
11/03/2016

**U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;**

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

**beyan ederim.**

**15/02/2016**

**İmza**

**Araş. Gör. Aslı GÖÇENOĞLU SARIKAYA**

## ÖZET

Doktora tezi

### ÜRİK ASİT TAYİNİNE YÖNELİK MOLEKÜLER BASKILANMIŞ YÜZEY PLAZMON REZONANS BİYOSENSÖR HAZIRLANMASI

**Ash GÖÇENOĞLU SARIKAYA**

Uludağ Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı

**Danışman:** Doç. Dr. Bilgen OSMAN

Bu çalışmada, ürik asit (UA) tayini için tanıma aracı olarak moleküler baskılanmış nanopartiküllerin kullanıldığı yüzey plazmon rezonans (SPR) sensör hazırlanmıştır. Sensör, SPR sensörün altın yüzeyinin UA baskılanmış poli(hidroksietil metakrilat-metakriloil-amido-sistein metil ester)-Fe<sup>3+</sup> [poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup>] nanopartiküller ile modifiye edilmesi ile hazırlandı. Fonksiyonel monomer (MAC) ve kalıp molekül (UA) arasındaki ön-organizasyon metal-şelat etkileşimi ile gerçekleştirildi. Metal iyonu olarak Fe<sup>3+</sup> iyonu kullanıldı. Hazırlanan MAC-Fe<sup>3+</sup>-UA kompleksi FTIR tekniği kullanılarak karakterize edildi. Poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartiküller FTIR, elementel analiz, FE-SEM, CTEM, EDS, zeta boyut dağılımı analizleri ile karakterize edildi. UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensör nanopartikül çözeltisinin altın yüzeye damlatılması ve ardından kurutulması ile hazırlandı. Hazırlanan SPR sensör AFM, temas açısı ve optik profilometre analizleri ile karakterize edildi. SPR sensörün ürik asit tayin kapasitesi farklı derişimlerdeki ürik asit çözeltilerinin (0,5-40 mg/L) SPR sensör ile etkileştirilmesi ile belirlendi. Elde edilen sensör cevapları ile bağlanma, kinetik ve izoterm analizleri yapıldı. Ayrıca hazırlanan sensörün LOD (tespit limiti) 0,247 mg/L ve LOQ (tayin limiti) 0,825 mg/L olarak hesaplandı. SPR sensörün seçiciliği askorbik asit, teofilin ve üre kullanılarak araştırıldı. Aynı zamanda ikili, üçlü ve dörtlü karışımlar hazırlanarak yarışmalı kinetik analizler yapıldı. UA baskılanmış SPR sensör idrarda UA tayini için kullanıldı ve LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,498 mg/L ve 1,66 mg/L olarak belirlendi. Analiz sonuçları standart UA tayin yöntemiyle karşılaştırıldı. Hazırlanan sensörün idrardaki UA derişimini % 97,73 doğrulukta tayin edebildiği belirlendi. Poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensörün ürik asit tayininde tekrar kullanılabilirliği araştırıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Moleküler baskılama, yüzey plazmon rezonans, ürik asit, biyosensör

**2016, xii + 195 sayfa**

## ABSTRACT

PhD Thesis

### DEVELOPMENT OF MOLECULAR IMPRINTED SURFACE PLASMON RESONANCE BIOSENSOR FOR URIC ACID DETERMINATION

**Ash GÖÇENOĞLU SARIKAYA**

Uludağ University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Chemistry

**Supervisor:** Ass. Prof. Dr. Bilgen OSMAN

In this study, SPR sensor was prepared that use molecular imprinted nanoparticles as molecular recognition element for uric acid dedection. SPR sensor was prepared by modification of the gold surface of SPR sensor with UA imprinted poly(hydroxyethyl methacrylate-methacryloyl-amido-cysteine methyl ester)-Fe<sup>3+</sup> [poly(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup>] nanoparticles. Preorganization of functional monomer (MAC) and template (UA) was provided by using metal-chelate interaction. Fe<sup>3+</sup> was the metal ion. MAC-Fe<sup>3+</sup>-UA complex was characterized with FTIR analysis. The characterization of poly(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanoparticles were done by FTIR, elemental analysis, SEM, TEM, EDS, zeta size analysis. The UA imprinted SPR sensor was obtained by dropping and drying a small amount of nanoparticle solution to gold surface. Prepared SPR sensor was characterized with AFM, contact angle and optic profilometer measurements. UA sensing ability of imprinted SPR sensor was investigated by interacting UA solutions in different concentrations (0.5-40 mg/L) with SPR sensor. The limit of detection (LOD) and limit of quantation (LOQ) were calculated for prepared SPR sensor as 0.247 mg/L and 0.825 mg/L, respectively. In order to show the selectivity of the UA imprinted poly(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensor, ascorbic acid, theophylline and urea were used. In addition, binary, triple and quartet mixtures of the molecules were prepared for competitive kinetic analysis. UA-imprinted SPR sensor was used for UA determination in urine. LOD and LOQ values were calculated as 0.498 mg/L and 1.66 mg/L, respectively. The results were compared with standart method. The prepared sensor measured the UA concentration 97.73 % accuracy. The reusability of the poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensor was also investigated.

**Key words:** Molecular imprinting, surface plasmon resonance, uric acid, biosensor

**2016, xii + 195 pages**

## ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca bana her türlü maddi ve manevi imkan sağlayan, danışman hocam Sayın Prof. Dr. Necati Beşirli'ye ve Doç. Dr. Bilgen Osman'a teşekkür ederim. Doktora çalışmalarımda hayata farklı bir perspektiften bakmamı sağlayan ve beni yüreklendiren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Adil Denizli'ye en içten teşekkürlerimi sunarım. Doç. Dr. Elif Tümay Özer, Doç. Dr. Ayhan Yıldırım, Dr. Tülay Çam, Araş. Gör. Dr. Yeliz Ulaş, Araş. Gör. Dr. Serkan Öztürk, Araş. Gör. Ümran Seven Erdemir ve Araş. Gör. Sevgi Sözügeçer başta olmak üzere tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma bana verdikleri bilimsel destek ve güzel dostlukları için teşekkürü bir borç bilirim. Tüm hayatım boyunca bana her zaman maddi ve manevi destek sağlayan, beni her zaman kıymetli olduğuma inandıran, beni sonsuz ve koşulsuz seven sevgili annem Perihan, babam Ahmet, kardeşim Alican GÖÇENOĞLU'na ve canım eşim Samet SARIKAYA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Son olarak bu zorlu süreçte her türlü sevincimi ve üzüntümü benimle birlikte minicik yüreğinde hissetmek zorunda kalan canımın parçası biricik oğlum Kerem Giray SARIKAYA'ya sonsuz minnetlerimi sunuyorum.

Bu çalışma Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı OUAP(F)-2016 14 no'lu projesi ile desteklenmiştir.

**Aslı GÖÇENOĞLU SARIKAYA**

**15.02.2016**

## İÇİNDEKİLER

Sayfa	
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR	iii
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1.GİRİŞ	1
2.KAYNAK ÖZETLERİ	10
2.1. Ürik asit (UA)	10
2.2. Nükleik asit metabolizması ve ürik asit	13
2.3. Ürik asit tayin yöntemleri	19
2.4. Sensörler	26
2.4.1. Biyosensörler	30
2.4.2. UA için hazırlanan sensörler	32
2.5. Yüzey plazmon rezonans (SPR)	39
2.5.1. Teori	39
2.5.2. Yüzey plazmon rezonans sensör için genelleştirilmiş formüller	39
2.5.3. Optik yüzey plazmon rezonans sensörü	40
2.5.4. Yüzey plazmon rezonans sensör	42
2.6. Moleküler baskılama tekniği	51
2.6.1. MIP sentezinin optimizasyonu	57
2.6.2. MIPIlerin fiziksel formu ve hazırlanma metodları	61
2.6.3. MIPIlerin uygulama alanları	63
2.6.3.1. UA baskılanmış polimerler	66
2.7. Nanoteknoloji	67
2.7.1. Nanomalzemeler	70
2.7.2. Nanomalzemelerin üretim yöntemleri	70
2.7.3. Nanobiyoteknoloji	71
2.8. Nanopartiküller	72
2.8.1. Nanopartikül sentez yöntemleri	74
2.9. Biyosensör uygulamaları için moleküler baskılanmış polimerler	75
2.9.1. MIP temelli UA sensörler	80
3. MATERYAL ve YÖNTEM	82
3.1. Materyal	82
3.2. Yöntem	83
3.2.1. N-Metakriloil-amidosistein metil ester (MAC) monomerinin sentezi	83
3.2.2. N-Metakriloil-amidosistein metil ester (MAC) monomerinin karakterizasyonu	83
3.2.2.1. Fourier transform infrared spektrofotometre (FTIR) analizi	83
3.2.2.2. Nükleer manyetik rezonans (NMR) analizi	83
3.2.3. MAC-Fe <sup>3+</sup> -UA ön-kompleksinin hazırlanması	83
3.2.4. UA baskılanmış nanopartiküllerin sentezi ve karakterizasyonu	84
3.2.4.1. Elementel analiz	84
3.2.4.2. Enerji dağılımlı x-ışınları analizi (EDS)	85
3.2.4.3. Yüksek çözünürlüklü taramalı elektron mikroskobu (FE-SEM) analizi	85
3.2.4.4. Geçirimli elektron mikroskobu (CTEM) analizi	85



3.2.5. UA baskılanmış SPR sensörün hazırlanması ve karakterizasyonu	86
3.2.5.1. SPR altın çip yüzeyinin modifikasyonu	86
3.2.5.2. SPR altın çip yüzeyine poli(HEMA-MAC)-Fe <sup>3+</sup> nanopartiküllerin kaplanması	86
3.2.5.3. Temas açısı analizi	87
3.2.5.4. Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) analizi	88
3.2.5.5. Zeta boyut dağılımı analizi	89
3.2.5.6. Optik profilometre ile poli(HEMA-MAC)-Fe <sup>3+</sup> nanopartikül kaplama kalınlığının ölçümü	89
3.2.6. Yüzey plazmon rezonans sistemi ile kinetik analizler	89
3.2.6.1. SPR sisteminin analiz için hazırlanması	89
3.2.6.2. Yüzey plazmon rezonans sistemi ile sensorgram alınması	91
3.2.7. UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe <sup>3+</sup> SPR sensör ile kinetik analizler	93
3.2.8. Yarışmalı kinetik analizler	94
3.2.9. SPR sensörün baskılama seçiciliğinin belirlenmesi	94
3.2.10. İdrar örneği ile analizler	94
3.2.11. Tekrar kullanım	95
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA	96
4.1. N-Metakriloil-amidosistein metil ester (MAC) monomerinin sentezi ve karakterizasyonu	96
4.2. MAC-Fe <sup>3+</sup> kompleksinin ve MAC-Fe <sup>3+</sup> -UA ön-kompleksinin karakterizasyonu	99
4.3. UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe <sup>3+</sup> nanopartiküllerin karakterizasyonu	102
4.3.1. FTIR analizi	102
4.3.2. Elementel analiz	105
4.3.3. Enerji dağılımlı x-ışınları analizi (EDS)	105
4.3.4. Yüksek çözünürlüklü taramalı elektron mikroskobu (FE-SEM) analizi	107
4.3.5. Geçirimli elektron mikroskobu (CTEM) analizi	108
4.3.6. Zeta boyut dağılımı analizi	109
4.4. UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe <sup>3+</sup> SPR sensörün karakterizasyonu	110
4.4.1. Temas açısı ölçümleri	110
4.4.2. Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) analizi	116
4.4.3. Optik profilometre ile poli(HEMA-MAC)-Fe <sup>3+</sup> nanopartikül kaplama kalınlığının ölçümü	117
4.5. UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe <sup>3+</sup> SPR sensör ile kinetik analizler	123
4.6. Denge ve bağlanma kinetik analizleri	126
4.7. Denge izoterm modelleri	130
4.8. Yarışmalı kinetik analizler	134
4.9. SPR sensörün baskılama seçiciliğinin belirlenmesi	143
4.10. İdrar örneği ile kinetik analizler	157
4.11. Tekrar kullanım	161
5. SONUÇ	163
KAYNAKLAR	167
ÖZGEÇMİŞ	193

## SİMGELER ve KISALTMALAR

### Kısaltmalar

UA	Ürik asit
UV	Ultra viyole
AA	Askorbik asit
UO <sub>x</sub>	Ürikaz
MIP	Moleküler baskılanmış polimer
NIP	Moleküler baskılanmamış polimer
SPR	Yüzey plazmon rezonans
BPA	Bisfenol A
HEMA	Hidroksietil metakrilat
IMEO	3-(2-imidazolin-1-il)propil(trietoksisilan)
IgG	İmmünoglobülin G
MAC	Metakriloil amidosistein
DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
ATP	Adenozin trifosfat
GTP	Guanozin trifosfat
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotid
PRPP	5-fosforibozil-1-pirofosfat
A	Adenin
G	Guanin
U	Urasil
T	Timin
C	Sitozin
IMP	İmidin monofosfat
AMP	Adenin monofosfat
GMP	Guanozin monofosfat
APRT	Adenin fosforibozil transferaz
HGPRT	Hipoksantn-guanin fosforibozil transferaz
ADA	Adenozin deaminaz
PNP	Pürin nükleozid fosforilaz
LOD	Tayin limiti
LOQ	Tayin sınırı
HPLC-UV	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi-ultraviyole
GC-MS	Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi
LC-MS	Sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi
HPLC-MS	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi
RP-HPLC	Ters faz-yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IC	İyon kromatografisi
HILIC	Hidrofilik etkileşim kromatografisi
UHPLC	Ultra-yüksek performanslı sıvı kromatografisi
CE	Kapiler elektroforez
CE-ED	Kapiler elektroforez-elektrokimyasal dedeksiyon
CL	Kemilüminesans
PAH	<i>p</i> -aminohippurik asit

ELISA	Enzim bağı immunosorbent assay
HRP	Karaturp peroksidazı
ECL	Elektrokemiluminesans
BAHHFP	2,2-bis(3-amino-4-hidroksifenil) hekzafloropropan
DA	Dopamin
XA	Ksantin
PMPy	Poli(N-metilpirol)
GCE	Camsı karbon elektrot
MWCNT	Çok-duvarlı karbon nanotüp
CV	Siklik voltametri
DPV	Diferansiyel puls voltametri
LSV	Doğrusal süpürme voltametri
SWV	Kare dalga voltametri
SAM	Kendiliğinden oluşan tek tabaka
TM	Transvers manyetik
SPP	Yüzey plazmon polariton
EM	Elektromanyetik
TE	Enine elektrik
ATR	Azalmış total yansıma
TIR	Total iç yansıma
LSPR	Lokalize yüzey plazmon rezonans
NMR	Nükleer manyetik rezonans
FTIR	Fourier transform infrared spektroskopisi
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
BET	Brunauer, Emmett ve Teller
LF	Langmuir-Freundlich
AIBN	N,N'-azobisisobütironitril
MAA	Metakrilik asit
TFMAA	triflorometil akrilik asit
4-VPY	4-vinilpiridin
2-VPY	2-vinilpiridin
EGDMA	Etilen glikol dimetakrilat
TRIM	Trimetilopropan trimetakrilat
DVB	Divinilbenzen
PETRA	Pentaeritriol triasetat
SPE	Katı faz ekstraksiyon
PECL	Polikaprolakton
PLA	Polilaktik asit
PLGA	Polilaktik-ko-glikolik asit
PACA	Polisiyano-akrilat
PBCA	Polibütil-siyano-akrilat
PVA	Polivinil alkol
SDS	Sodyum dodesil sülfat
APS	Amonyum persülfat
EDS	Enerji dağılımlı X-ışını spektrometre
FE-SEM	Yüksek çözünürlüklü taramalı elektron mikroskobu
CTEM	Geçirimli elektrom mikroskobu
SFE	Yüzey serbest enerjisi

AFM	Atomik kuvvet mikroskobu
U	Üre
Teo	Teofilin
PDI	Polidispersite indeksi
EG	Etilen glikol
DIM	Diiyodometan
RU	Rezonans birimi



## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1.1. UA'in (a) laktim ve (b) laktam formu	10
Şekil 2.1.2. Ürik asidinin enol formundan ürat formuna dönüşmesi	11
Şekil 2.1.3. ürik asidinin düşük, nötral ve yüksek pH ortamındaki kimyasal formu	11
Şekil 2.2.1. Pürin ve pirimidin bazları	14
Şekil 2.2.2. Pürin katabolizması	14
Şekil 2.3.1. Ürik asitten ürikaz enzimi katalizörlüğünde allantoin ve hidrojen peroksit sentezi	20
Şekil 2.4.1. Kimyasal sensörün şematik gösterimi	27
Şekil 2.4.2. Biyosensör bileşenlerinin şematik gösterimi	29
Şekil 2.4.1.1. Biyosensörün şematik gösterimi	31
Şekil 2.5.2.1. Düzlemsel dalga oluşumu	39
Şekil 2.5.3.1. Yüzey plazmon geometrisi ve geleneksel optik yüzey plazmon sensörünün yansıma sabiti $\epsilon_1 = 2.25$ , $\epsilon_2 = -10 - j0.1$ , $\epsilon_3 = 1.75$ , $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = 1$ , $d = 0.05 \mu\text{m}$ , $\lambda = 0.6 \mu\text{m}$	41
Şekil 2.5.4.1. Yüzey plazmon rezonans sensörün şematik gösterimi (Kretchmann konfigürasyonu)	44
Şekil 2.5.4.2. SPR'de bağlanma olaylarının belirlenmesi	45
Şekil 2.5.4.3. (a) Absorplamanın olmadığı ortamdaki TIR açısı ve (b) absorplamanın olduğu ortamda oluşan kritik açı	46
Şekil 2.5.4.4. (a) Prizma iç yüzeyindeki total iç yansıma (TIR) ve (b) prizma eşleme konfigürasyonu kullanılan SPR	46
Şekil 2.5.4.5. (a) SPR biyo-ölçüm için cihazın temel bileşenleri ve (b) tipik bir SPR biyo-ölçüm deneyi	47
Şekil 2.5.4.6. Bir SPR sensorgramın oluşması (a) SPR açısındaki kayma, (b) sensorgram	48
Şekil 2.6.1. Baskılama mekanizması (a) kalıp molekülün varlığında sırasıyla iki olay meydana gelir. Ön-polimerizasyonda fonksiyonel gruplar kalıp molekülün fonksiyonel gruplarına doğru yönelirler ve etkileşime girerler (kırmızı yuvarlaklar). Daha sonra, polimer zincirleri (gri çizgiler) oluşur ve çapraz bağlanır (b) kalıp molekül uzaklaştırıldığında bağlanma bölgeleri oluşur	53
Şekil 2.6.1.1. Moleküler baskılamada yaygın olarak kullanılan monomerlerin kimyasal yapıları	58
Şekil 2.6.1.2. Moleküler baskılamada kullanılan en yaygın çapraz bağlayıcıların kimyasal yapıları	60
Şekil 2.6.3.1. Moleküler baskılanmış polimerlerin uygulamaları (a) örnek hazırlama, (b) analitik ayırma ve (c) tanımlama. A: (1) örneğin verilmesi, (2) analitin ayrılması, (3) yıkama, (4) analitin elüsyonu	65
Şekil 3.2.5.1.1. GWC SPRimager II sisteminde kullanılan SPRchip™ altın çip	86
Şekil 3.2.5.2.1. Poli(HEMA-MAC)-Fe <sup>3+</sup> nanopartiküllerin SPR sensör yüzeyine kaplanması	87
Şekil 3.2.5.3.1. (a) Temas açısı ölçüm prensibi ve (b) damlaların hidrofilik ya da hidrofobik olmasına bağlı olarak ölçülen temas açıları	88

<b>Şekil 3.2.6.1.1.</b> SPRimager II (GWC Technologies, Madison, ABD) yüzey plazmon rezonans sistemi	90
<b>Şekil 3.2.6.1.2.</b> SPRimager II sisteminin (a) çalışma ve (b) sensorgram oluşturma prensibi	91
<b>Şekil 3.2.6.1.3.</b> GWC SPRimager II cihazının temel ekipmanları	92
<b>Şekil 3.2.6.1.4.</b> Örnek hücrenin hazırlanması (a) yüzey plazmon rezonans çipin örnek tutucuya yerleştirilmesi (b) akış hücresinin takılması (c) giriş ve çıkış uçlarının yerleştirilmesi (d) prizma ve akış hücresinin bir araya getirilmesiyle örnek hücrenin hazırlanması	93
<b>Şekil 4.1.1.</b> N-metakriloil-amidosistein metil ester (MAC) monomerinin sentez reaksiyonu	96
<b>Şekil 4.1.2.</b> N-metakriloil-amidosistein metil ester (MAC) monomerine ait NMR spektrumu	97
<b>Şekil 4.1.3.</b> N-metakriloil-amidosistein metil ester (MAC) monomerine (siyah) ve L-sistein metil estere (mavi) ait FTIR spektrumları	98
<b>Şekil 4.2.1.</b> MAC monomeri (mavi) ve MAC-Fe <sup>3+</sup> kompleksinin (siyah) FTIR spektrumları	100
<b>Şekil 4.2.2.</b> MAC-Fe <sup>3+</sup> -UA ön-kompleksinin (siyah), kalıp molekülün (UA) (mavi) ve MAC monomerin (kırmızı) FTIR spektrumları	102
<b>Şekil 4.3.1.1.</b> Poli(HEMA-MAC) nanopartiküllerin kimyasal yapısı	103
<b>Şekil 4.3.1.2.</b> UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe <sup>3+</sup> nanopartiküllerin (siyah) ve poli(HEMA) nanopartiküllerin (mavi) FTIR spektrumları	104
<b>Şekil 4.3.3.1.</b> (a) UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe <sup>3+</sup> nanopartiküller ile hazırlanan yüzey ve (b) UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe <sup>3+</sup> nanopartiküllerin EDS spektrumu	106
<b>Şekil 4.3.4.1.</b> UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe <sup>3+</sup> nanopartiküllere ait SEM görüntüleri (a) 300 000 X ve (b) 600 000 X	107
<b>Şekil 4.3.5.1.</b> UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe <sup>3+</sup> nanopartiküllerin CTEM görüntüleri	108
<b>Şekil 4.3.6.1.</b> UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe <sup>3+</sup> nanopartiküllerinin zeta boyut dağılımı analizi	109
<b>Şekil 4.4.1.1.</b> Damla oluşumda etkin olan adhezyon ve kohezyon kuvvetleri	110
<b>Şekil 4.4.1.2.</b> Damlanın temas açısının şematik gösterimi	111
<b>Şekil 4.4.1.3.</b> Hidrofobik ve hidrofilik yüzeylerin karşılaştırılması	111
<b>Şekil 4.4.1.4.</b> (a) Saf su, (b) etilen glikol, (c) diiyodometan, (d) formamid damlatılmış altın çip, allil merkaptan ile modifiye edilmiş altın çip ve UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe <sup>3+</sup> nanopartikül kaplı altın çip yüzeylerinin temas açısı görüntüleri	115
<b>Şekil 4.4.2.1.</b> (a) Allil merkaptan ile modifiye edilmiş altın çip yüzeyinin ve (b) UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe <sup>3+</sup> nanopartikül kaplı altın çip yüzeyinin AFM görüntüleri	117
<b>Şekil 4.4.4.1.</b> (a-d) UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe <sup>3+</sup> SPR altın çipin 4 farklı bölgesinde kaplama kalınlığı ölçümü ve (e) UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe <sup>3+</sup> SPR altın çipin yüzey görüntüsü	122
<b>Şekil 4.5.1.</b> UA çözeltileri ile UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe <sup>3+</sup>	

SPR sensörün etkileşimine ait sensorgramlar	123
<b>Şekil 4.5.2.</b> 0,5-40 mg/L aralığında UA derişimi ile % $\Delta R$ arasındaki ilişki	124
<b>Şekil 4.6.1.</b> Kinetik hız sabitlerinin belirlenmesi. (a) Denge analiz yaklaşımı ve (b) bağlanma kinetik yaklaşımı	129
<b>Şekil 4.7.1.</b> (a) Langmuir; (b) Freundlich; (c) Langmuir-Freundlich adsorpsiyon modelleri	132
<b>Şekil 4.8.1</b> Ürik asit, askorbik asit, teofilin ve üre kullanılmasıyla oluşturulan çözeltiler ile UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe <sup>3+</sup> SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar: (a) Ürik asit (10 mg/L), (b) Askorbik asit (10 mg/L), (c) Teofilin (10 mg/L), (d) Üre (100 mg/L), (e) Ürik asit-Askorbik asit, (f) Ürik asit-Teofilin, (g) Ürik asit-Üre, (h) Ürik asit-Askorbik asit-Teofilin, (ı) Ürik asit-Askorbik asit-Üre, (i) Ürik asit-Teofilin-Üre, (j) Ürik asit-Askorbik asit-Teofilin-Üre	141
<b>Şekil 4.8.2</b> Ürik asit, askorbik asit, teofilin ve üre kullanılmasıyla oluşturulan çözeltiler ile UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe <sup>3+</sup> SPR sensör arasındaki etkileşimler ile elde edilen sensör cevabı (a) tekli, (b) ikili, (c) üçlü ve (d) dördü karışımlar	143
<b>Şekil 4.9.1</b> Ürik asit, askorbik asit, teofilin ve üre kullanılmasıyla oluşturulan çözeltiler ile baskılanmamış poli(HEMA-MAC)-Fe <sup>3+</sup> nanopartikül kaplı SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar: (a) Ürik asit (10 mg/L), (b) Askorbik asit (10 mg/L), (c) Teofilin (10 mg/L), (d) Üre (10 mg/L), (e) Ürik asit-Askorbik asit, (f) Ürik asit-Teofilin, (g) Ürik asit-Üre, (h) Ürik asit-Askorbik asit-Teofilin, (ı) Ürik asit-Askorbik asit-Üre, (i) Ürik asit-Teofilin-Üre, (j) Ürik asit-Askorbik asit-Teofilin-Üre	149
<b>Şekil 4.9.2</b> Ürik asit, askorbik asit, teofilin ve üre kullanılmasıyla oluşturulan çözeltiler ile UA baskılanmamış poli(HEMA-MAC)-Fe <sup>3+</sup> SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait (a) tekli, (b) ikili, (c) üçlü ve (d) dördü grafikler	151
<b>Şekil 4.9.3.</b> Ürik asidin iyonlaşma reaksiyonu	152
<b>Şekil 4.9.4.</b> Sentezlenen komplekslerin yapıları	154
<b>Şekil 4.9.5.</b> MAC, Fe <sup>3+</sup> ve UA arasındaki etkileşim	155
<b>Şekil 4.9.6.</b> Teofilinin metal ile olası etkileşimi	156
<b>Şekil 4.10.1.</b> (a) Kör örnek ve 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 mg/L derişiminde UA spike edilmiş ve 1/20 oranında seyreltilmiş idrar örneklerinin poli(HEMA-MAC)-Fe <sup>3+</sup> SPR sensör ile etkileştirilmesi ile elde edilen sensorgram, (b) Farklı derişimlerde UA spike edilen idrar örneği için elde edilen UA derişimi-sinyal grafiği, (c) Farklı derişimlerde UA spike edilen idrar örneği için elde edilen kalibrasyon grafiği	159
<b>Şekil 4.11.1.</b> 35 mg/L UA spike edilen idrar örneği ile UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe <sup>3+</sup> SPR sensörün tekrar kullanımına ait sensorgram	162

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>	
Çizelge 2.3.1.	UA tayininde kullanılan bazı yöntem ve tayin limitleri	24
Çizelge 2.4.1.	Sensörlerin kullanım alanları	28
Çizelge 2.4.2.	Sensörlerde kullanılan algılama araçları	29
Çizelge 2.4.3.	Biyosensör bileşenlerinin içeriği	30
Çizelge 2.4.2.1.	UA tayini için kullanılan bazı sensör sistemleri ve tayin limitleri	38
Çizelge 2.6.1.	Bazı polimerler ve uygulama alanları	54
Çizelge 2.6.1.1.	Baskılanmış polimerlerin polimerizasyon değişkenleri	61
Çizelge 2.6.2.1.	MIPIlerin fiziksel formları	63
Çizelge 2.6.3.1.	MIPIlerin uygulama alanları	65
Çizelge 2.6.3.2.	MIPIlerin kullanıldığı bazı yöntemler	66
Çizelge 2.9.1.	MIPIlerin sensör teknolojisindeki kullanımları	79
Çizelge 4.3.3.1.	UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe <sup>3+</sup> nanokürelere ait EDS sonuçları	106
Çizelge 4.4.1.1.	SPR altın çip, allil merkaptan ile modifiye edilmiş altın çip ve UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe <sup>3+</sup> nanopartikül kaplı SPR altın çip altın çip yüzeyine sırasıyla su, etilen glikol (EG), diiyodometan (DIM) ve formamid damlatılmasıyla elde edilen temas açıları ve serbest yüzey enerjileri (SFE)	114
Çizelge 4.5.1.	UA baskılanmış polimerlerin kullanıldığı analitik sistemlerde tayin limitleri	126
Çizelge 4.6.1.	Kinetik hız sabitleri	130
Çizelge 4.7.1.	Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich parametreleri	133
Çizelge 4.8.1.	Kalıp ve yarışmacı biyomoleküllerin molekül formülleri ve asitlik sabitleri	135
Çizelge 4.9.1.	Yarışmacı biyomoleküller için seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları	156
Çizelge 4.10.1.	İdrarda UA tayini için kullanılan bazı yöntemler ve tayin sınırları	161



## 1. GİRİŞ

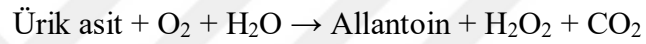
Ürik asit (2,6,8-trihidroksipürin, UA) pürin metabolizmasının son ürünüdür. İnsan vücudunda ürik asit derişiminin yüksek olması gut hastalığı, hiperürisemi, Lesch-Nyan hastalığı, obezite, diyabet, yüksek kolesterol, yüksek kan basıncı, böbrek hastalığı ve kalp hastalıkları ile yakından ilişkilidir (Alderman ve Aiyer, 2004, Liberopoulos ve ark. 2002, Raj ve Ohsaka 2003, Wootton ve Freeman 1982, Huang ve ark. 2004, Eswara Dutt ve Mottola 1974, Johnson ve ark. 2003). Bu nedenle biyolojik sınırlarda bulunan UA derişiminin izlenmesi sözü edilen hastalıkların erken dönemde teşhisi için önemlidir. Pürin metabolizmasının değişmesine ve UA derişiminin normal fizyolojik sınırları (idrarda  $2.10^{-3}$  mol/L ve kanda  $1,2-4,5.10^{-4}$  mol/L) aşmasına neden olan farklı sebepler söz konusudur. Bu sebeplerin çoğu beslenme ve yaşam şeklinden kaynaklanır. Hiperürisemi hastalarından genellikle yaşam şekillerini değiştirmeleri istenir. Bu durumda hiperürisemi hastalarının düşük maliyetli tayin metodları ile sürekli izlenmesi ve tedavi reğetelerinin düzenlenmesi gerekir.

UA pürin metabolik yolunda ksantin oksidaz enzimi ile pürinlerden üretilir. Günlük 350 mg civarında UA endojen sentez ile, yaklaşık 300 mg UA ise yiyeceklerden alınır. Memelilerin çoğunda UA daha sonrasında urat oksidaz (ürrikaz) enzimi ile allantoin dönüştürülür. Allantoin serbest halde idrar ile vücuttan atılır. Günlük atımı yaklaşık 4,76 mmol (800 mg) kadardır (Waring ve ark. 2000). UA varlığı bir risk faktörü olup normal düzeyinin altında ya da üstünde bulunması durumunda birçok hastalığın belirtecidir. Anormal derecede yüksek UA derişimi gut hastalığı, hipertansiyon, kardiyovasküler hastalıklar ve böbrek hastalıkları ile ilişkilendirilirken, düşük UA derişimi ise multiple skleroz, Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı ve sinir itihabı ile bağlantılıdır.

Tarihsel olarak, ürik asit sözü edilen hastalıkların aşamalarının belirlenmesini sağlayan biyolojik bir belirteç olarak bilinmektedir. Fakat son dönemde yapılan çalışmalar ürik asidin bu hastalıkların gelişmesinde ve ilerlemesinde de rol alıyor olabileceğini göstermektedir. Sonuç olarak, ürik asit derişiminin biyolojik sınırlardaki takibi hem önemli olduğu bilinen hem de önemli olabileceği düşünölen ve araştırılan birçok hastalık açısından büyük önem taşımaktadır. Hem hiperürisemi hem de hipoürisemi için serum

UA derişimleri belirlenmiştir. Hiperürisemi hastası erkeklerde UA derişiminin bir çalışmada 386 mM'dan (Klemp ve ark. 1997), diğer bir çalışmada ise 420 mM'dan (Johnson ve ark. 2003) yüksek olduğu bildirilmiştir. Kadınlarda ise bu değer 360 mM dan yüksektir (Klemp ve ark. 1997, Johnson ve ark. 2003). Hipoürisemi ise genellikle UA derişiminin 120 mM'dan düşük olduğu durumlar için tanımlanmaktadır (Hisatome ve ark. 1996). Bu durumda, UA derişimi için normal aralık cinsiyete göre az da olsa değişmekle birlikte 120-380 mM arasındadır.

Klinik laboratuarlarda, UA tayini için kullanılan metod ürikaz enziminin oksijen varlığında ürik asidi hidrojen peroksit, allantoin ve karbon dioksit oksitlediği enzim metodudur (Sanders ve ark. 1980).



Alternatif bir metod, fosfotungstik asidin tungsten mavisini oluşturacak şekilde ürik asit ile indirgenmesine dayanır (Wootton ve Freeman 1982). Diğer metodlar, UV absorbans ya da kütle spektrometresi dedeksiyon metodlarının kullanıldığı ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisidir (Lim ve ark. 1978). Sözü edilen metodların tümü çoklu reaksiyon aşamalarına ihtiyaç duymaktadır. Serum hazırlama, çeşitli örnek hazırlama aşamaları ve nihayetinde ya ürünü tanımlamak için spektroskopik metodlar kullanmak (Galban ve ark. 2001, Geisinger ve ark. 1979) ya da oluşan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarını belirlemek için enzimatik reaksiyonlar kullanmak örnek olarak verilebilir (Gilmartin ve Hart 1994). Bu metodlarda ayrıca pıhtılaşmış kan parçacıkları beklenmedik sinyallere neden olabileceğinden kan örneğinin denature seruma dönüştürülmesi gerekmektedir. Kan denaturasyon aşaması zaman gerektirir ve hızlı analiz yapılmasını engeller. Ayrıca sözü edilen tayin metodları karmaşık operasyon prosesleri, pahalı cihazlar ve sınırlı uygulama koşulları gerektirir. Bu nedenle, rutin UA tayininde kullanılabilecek hızlı, basit ve ucuz tekniklerin geliştirilmesi büyük bir ilgi uyandırmaktadır.

Elektrokimyasal sensörler kısa analiz süreleri, farklı fizyolojik örneklere uygulanabilir basit deneysel prosedürler ve yüksek seçiciliğe ve hassasiyete sahip ucuz cihazlar ile uygulanabilmesinden dolayı büyük ilgi gören bir araştırma alanıdır (Wring ve Hart 1992).

Ürik asit sulu çözeltide sıklıkla kullanılan elektrodlar üzerinde allantoin oluşturmak üzere kolayca okside olduğundan elektrokimyasal enzimatik olmayan tayin yaklaşımı geliştirilen bir çok metodun temelini oluşturmaktadır (Gilmartin ve ark. 1992, Khoo ve Chen 2002). Ürik asit ve askorbik asit (AA) kan ve idrar gibi biyolojik sıvılarda bulunmaktadır. Ürik asidin inert metal elektrodlardaki elektroksidasyonu yüksek potansiyeller uygulanmasını gerektirmektedir. Aynı zamanda, ürik asit ve askorbik asidin sıklıkla kullanılan inert metal elektrodlar üzerindeki oksidasyon potansiyelleri birbirine çok yakındır. Bu durum bu metodların seçiciliğini düşürmektedir (Adams 1976, Stamford ve Justice Jr. 1996). Askorbik asit varlığında ürik asidi tayin etmek için seçiciliği yüksek yeni metodların geliştirilmesi gerekmektedir.

Ürikaz (UOx) ürik asidi allantoin oksitleyen enzimdir. UOx, ürik aside olan seçiciliği nedeniyle ürik asit biyosensörlerinin hazırlanmasında kullanılmaktadır. UOx enzimi farklı yöntemler ile modifiye edilmiş elektrod yüzeylerine immobilize edilerek ürik asit tayini için biyosensörler hazırlanmıştır. Polianilin (Arora ve ark. 2007, Kan ve ark. 2004), polipirol nanoelektrotlar (Yang ve ark. 2009), ZnO nanoteller (Zhang ve ark. 2004), ZnO nano-pullar (Usman ve ark. 2012), CuO ince-film (Jindal ve ark. 2012) elektrod yüzeyleri UOx immobilizasyonu için kullanılmıştır. Bazı araştırmacılar, grafen/poli(akridin kırmızısı) modifiye elektrodlar (Li ve ark. 2012), nanokristalin grafit benzeri pirolitik karbon filmler (Hadi ve Rouhollahi 2012) ve UOx-horseradish peroksidaz, luminal gibi kemiluminesans özellikli bileşikler (Lv ve ark. 2002) gibi pahalı ve kompleks modifikasyonlar kullanarak biyosensörler hazırlamışlardır. Fakat bugüne kadar literatürde rapor edilen UOx temelli biyosensörler hassasiyet, kararlılık, doğrusal aralık, tekrarlanabilirlik ve tekrar kullanılabilirlik gibi birçok yönden yetersiz kalmıştır. Bu sınırlanmaların temel nedeni enzimin bozulması, zayıf sinyal iletimi, düşük substrat afinitesi ve elektrod yüzeyinin modifikasyonundan sonra enzim aktivitesinin düşmesidir.

Medikal tanı, çevresel analizler, halk sağlığı ve gıda güvenliği ile ilgili kimyasal/biyolojik analizlerde kullanılan laboratuvar tekniklerinin pahalı olması ve zaman alıcı cihazlar gerektirmesinden dolayı dünya çapında her yıl bu analizler için milyonlarca dolar harcanmaktadır. Bu nedenle sözü edilen analizlerin daha ucuz ve kolayca kullanılabilen cihazlar ile hızlı bir şekilde analiz edilebilmesi için yeni kemo/biyosensörlerin

geliştirilmesi toplumsal bir gereksinim haline gelmiştir. Son yıllarda kayda değer bir ilerleme sağlansa da kemo/biyosensör alanı istenilen düzeyde gelişmemiş ve alternatif stratejilerin ve multidisipliner yaklaşımların olmaması nedeniyle ticari anlamda istenilen başarı sağlanamamıştır. Bazı basit analitler için hazırlanan birkaç kemo/biyosensör ticari anlamda yeterli hassasiyet, seçicilik, kesinlik ve güvenilirlik koşullarını sağlayacak ölçüde başarılı olmuştur (Dorman ve ark. 2009, Xu ve ark. 2008). Fakat bununla birlikte son zamanlarda geliştirilen yeni sensör materyalleri ve fabrikasyon metodları yeni jenerasyon sensörlerin geliştirilmesi için büyük bir potansiyel oluşturmaktadır (Orellana ve Moreno-Bondi 2005, Updike ve Hicks 1967). Bu nedenle yeni sensörlerin keşfi son yıllarda en çok ilgi çeken çalışma alanlarından biridir.

Bir sensör iki temel bölümden oluşmaktadır. Hedef analiti seçici olarak bağlayan algılama materyali (reseptör) ve bağlanma olayını örnek derişimine bağlı olarak okunabilen sinyallere dönüştüren etkili bir transdüser (dönüştürücü). Sensörün etkinliğini belirleyen en önemli etken kullanılan sensör materyalinin (reseptör) seçiliği ve spesifitesidir. Sensör hazırlamada geleneksel yaklaşım biyolojik reseptörlerin (enzimler, antibadiler, DNA, proteinler vb.) transdüser yüzeyine immobilize edilmesi ve analitlerin seçici bağlanmasının sağlanmasıdır. Ancak bu moleküller yüksek maliyetli karmaşık protokoller ile üretilmekte düşük kararlılıkları nedeniyle uygun koşullar gerektirmekte ve birçok analit için doğal reseptör bulunmamaktadır. Aynı zamanda küçük yüzey alanı ve transdüser yüzeylerinin kontrol edilmesindeki zorluklar sensörlerin etkinliğini azaltarak özellikle eser miktarda bulunan maddelerin analizini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle yapay tanıma elementlerinin sentezlenmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Moleküler baskılama yapay tanıma elementlerinin hazırlanmasında kullanılabilecek en etkili metodlardan biridir. Moleküler baskılama teknolojisinde spesifik tanıma bölgeleri kalıp molekülün kovalent ya da non-kovalent etkileşimler ile oluşturulan kalıp-monomer kompleksi ile polimerik organik ya da inorganik matriksin içerisine baskılanmasıyla hazırlanır. Polimerizasyonun gerçekleştirilmesinden sonra kalıp molekülün çapraz bağlı polimer yapısından uzaklaştırılması ile kalıp molekülü şekil, boyut ve fonksiyonel grup olarak tamamlayan tanıma bölgeleri oluşur.

Moleküler baskılama teknolojisi, polimer temelli sentetik reseptörlerin hazırlanması için oldukça basit bir yöntemdir (Mosbach 1994, Wulff 1995). Kalıp molekül etrafında polimerleşebilen monomerler ön-organizasyon ile hidrojen bağı, hidrofobik etkileşim, yük transferi ya da diğer zayıf, kovalent olmayan etkileşimlerde, tersinir kovalent bağlar veya koordinasyon bağları oluşturacak etkileşimlerde bulunur (Qu ve ark. 2010). Kalıp molekül aracılı kimyasal sentez ve moleküler kendiliğinden oluşan işlemler (molecular self-assemble processes) gibi birçok farklı sentez yöntemi vardır (Philip ve Stoddart 1996). Prensipinde, her bileşik için MIPlar sentezlenebilir. Fakat yalnızca belirli bileşikler baskılama etkisi gösterir. Örneğin, çok basit ve küçük moleküller çoklu fonksiyonel gruplarının olmamasından dolayı genellikle herhangi bir baskılama etkisi göstermez (Daniel ve ark. 2003, Biju ve ark. 2003). Diğer bir problem de bazı bileşikler yalnızca kuvvetli polar çözücülerde çözünür, hidrojen bağlarını zayıflatır, böylece baskılama etkisini zayıflatır ya da ortadan kaldırır.

Metal iyon etkileşimlerinin doğada yapısal ve katalitik rolleri vardır (Tullius 1989). Öte yandan, metal iyonları hayati önem taşıyan biyolojik olaylarda oldukça önemli rol oynar (Siegel 1976). Metal iyonları ve biyolojik ligantlar arasında yüksek özgüllük vardır. Bu etkileşimlerin oluşması ve yıkımı sulu ortamda gerçekleşir (Sundberg ve Martin 1989). Metal-koordinasyon etkileşimlerinin birçok avantajı vardır. Bu avantajlarından dolayı MIPlerin hazırlanmasında bu tür etkileşimler kullanılmaktadır. Metal iyonları birçok biyolojik molekülün farklı fonksiyonel gruplarının işaretlenmesinde kullanılabilir. Metal-koordinasyon etkileşimlerinde kalıp molekülün uzaklaştırılmasından sonra, geri bağlanma aynı koordinasyon bağımlı oluşturacak şekilde gerçekleşir (Papaioannou ve ark. 2008). Geçiş metalleri yüklü ve nötral analitlerin herbirine, analitin hetero-atomları ve metalin dış yörüngesinde çiftleşmemiş orbitalleri arasında koordinasyon oluşturması ilkesine göre bağlanmaktadır. Metal iyon baskılama üç ana gruba ayrılır: metal iyon-kalıp molekül baskılama (Nishide ve Tsuchida 1976, Yu ve Tsukagoshi 1992, Rosatzin ve ark. 1991, Kubo ve ark. 2004), metal iyon-aracılı baskılama (Fujii ve ark. 1985, Subat ve ark. 2004, Hart ve Shea 2002, Striegler 2003, Wulff ve ark. 1997) ve metal iyonik kristal baskılama (D'Souza ve ark. 1999, Egan ve ark. 2004). Bu üç grup içinde, metal iyon-aracılı moleküler baskılama en yaygın kullanılan yöntemdir. Bu teknik normalde fonksiyonel monomer, metal iyonları ve hedef molekül arasında kompleks oluşumuna

olanak sağlar. Fonksiyonel monomerler polimerleşebilen kompleks oluşumu için metal iyonunu bağlar. Böylece hedef molekül metal iyonuna bağlanır (Qu ve ark. 2010, Song 2013).

Metal iyon aracılı tanıma sistemlerinin kullanım alanlarından en önemlisi MIP sistemlerin hazırlanmasıdır (Matsui ve ark. 1996). Metal iyon-aracılı MIPIler yüksek seçicilik gösterir. Bu yöntem seçici tanıma sistemleri (Dhal ve Arnold 1992, Vidyasankar ve ark. 1997) ve kataliz sistemlerinin hazırlanmasında (Severin 2000, Yamazaki ve ark. 2001) birçok kullanım alanı bulmaktadır. Bunun yanı sıra katalitik antibadiler (Wade ve ark. 1993, Iverson ve Lemer 1989), iyon-seçici kromatografi (Gokel ve Trafton 1990, Irie ve Watanabe 1980) ve protein saflaştırma metodları (Arnold ve Haymore 1991) gibi birçok farklı seçici tanıma sistemlerinde de kullanılmaktadır.

Ürik asit tayini için bugüne kadar en fazla araştırmanın yapıldığı sensör tipi elektrokimyasal sensörlerdir. Daha önce elektrokimyasal sensörler ile ilgili sözü edilen dezavantajları ortadan kaldırmak ve daha seçici elektrodlar hazırlamak için elektrod yüzeyleri polimerik filmler (redoks polimerleri, iletken polimerler), nanopartikül/iletken nanopartikül, poli(vinil alkol) temelli polimerler ve kompozitler ile kaplanmıştır. Ancak, UA molekülü moleküler baskılama prosedürü için uygun bir kalıp molekül olmasına karşın UA baskılanmış polimerler ile modifiye edilmiş elektrod yüzeylerini kullanan çalışma sayısı çok azdır. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada kanın filtrasyonu için akrilonitril ve akrilik asit monomerleri kullanılarak UA için spesifik bağlanma bölgeleri içeren polimerik membranlar hazırlanmıştır (Cristallini ve ark. 2004). Hazırlanan membranlar düşük geçirgenliğe sahip olmasına ve kanda bol miktarda bulunan albuminin kandan UA uzaklaştırılmasını zorlaştırmasına rağmen belirli bir ürik asit düzeyi için klinikte kullanıma uygun olduğu kanıtlanmıştır. Bir başka çalışmada da melamin ve kloranil kullanılarak UA baskılanmış polimerik yapı hazırlanmış ve civa damla elektrod yüzeyine kaplanmıştır (Lakshmi ve ark. 2006, Prasad ve ark. 2007). Hazırlanan sensör ile oldukça düşük tayin limitlerine ulaşılmış ve UA kan örneklerinde seçici ve hassas bir şekilde tayin edilmiştir. Fakat bununla birlikte civa damla elektrod çevresel risklerden dolayı kullanılıp atılabilir bir sensör platformu değildir. Bu nedenle dayanıklılığı yüksek, ucuz ve tekrar kullanılabilir sensör platformlarının geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Sensör yüzeylerinde kullanılan biyolojik moleküllerin kararsızlığı ve dayanıksızlığı nedeniyle belirtilen özellikleri taşıyan bir sensör hazırlamak için spesifik bağlanma bölgeleri içeren polimerlerin kullanılması iyi bir alternatif olarak karşımıza çıkmaktadır.

Yüzey plazmon rezonans (SPR) dielektrik sabitleri zıt işaretli olan (örneğin bir metal Ag, Au) iki ortam arasında meydana gelen yük-dalga titreşimidir. Yük yoğunluk dalgasına yüzey plazmon dalgası olarak bilinen, arayüzeyde maksimuma ulaşan, her iki ortamda da eksponansiyel olarak azalan ve alan vektörü ile karakterize edilen bir elektromanyetik dalga eşlik eder. Yüzey plazmonlarının optik olarak uyarılması *p*-polarize ışık demetinin ince film tabakası ve dielektrik ortam arasındaki arayüzey ile rezonans açısı olarak adlandırılan sabit bir açıda etkileşmesi ile gerçekleşir. Rezonans olayı gerçekleştiğinde, yansıyan ışığın şiddetinde bir minimuma ulaşılır. Rezonans açısı metal yüzeyine komşu yüzeydeki refraktif indeks değişimlerine hassastır. Refraktif indeks değişimiyle rezonans açısında gözlenen kayma yüzey plazmon rezonans sistemindeki algılamının temelini oluşturmaktadır.

SPR sistemi klasik analiz metodlarına göre birçok üstünlüğe sahiptir.

-Radyoaktif ya da floresans işaretlemeye gereksinim duyulmaz. Bu hem zamandan tasarruf edilmesini sağlar hem de kullanılacak olan floresans veya radyoaktif etiketin, analizlenecek moleküllerin aktivitesini ve yapısını bozma ihtimalini ortadan kaldırır.

-Ölçümler ışığın absorpsiyonu temeline dayanmadığı için ışığın girişim etkisi de söz konusu değildir. Dolayısıyla spektrofotometrik ve florimetrik tekniklerde problem yaratan ışık absorpsiyonu ve sönümlenmesi gibi olaylara SPR de rastlanmaz. Bu nedenle bu yöntem renkli veya ışık geçirmeyen akışkan örnekler için de çok uygundur.

-SPR sensörlerde yanıt süresi kısadır ve SPR transdüserler “lab-on-a-chip” olarak adlandırılan ve örnek hazırlama, kimyasal analiz ve veri değerlendirme özelliklerini aynı anda taşıyan total bir analiz sistemi geliştirmek için mikro akışkanlar ile kolayca entegre edilebilir.

-SPR sensörlerde bağlanma ve ayrılma olaylarının eş zamanlı olarak analiz edilmesi mümkündür.

Moleküler baskılanmış polimerler SPR sensörlerin hazırlanmasında seçici tanıma elementleri olarak kullanılabilirler. Bu amaçla polimerik malzeme metal filmin üzerine

kaplanır ve SPR analit varlığında polimer yüzeyinde meydana gelen kırılma indisi değişimlerini belirlemede kullanılır. Bu materyallerin SPR sistemlerinde tanıma elementi olarak kullanım potansiyelini gösteren çok sayıda çalışma yapılmıştır (Lai ve ark. 1998, Lavine ve ark. 2007, Kugimiya ve Takeuchi 2001, Lotierzo ve ark. 2004, Banerji ve ark. 2006, Devanathan ve ark. 2005).

Nanopartiküller 10–1000 nm aralığındaki boyutlara sahip katı partiküller ya da tanecikli çözelti olarak tanımlanmaktadır. Hazırlanma yöntemlerine göre, nanopartiküller, nanoküreler ya da nanokapsüller olarak adlandırılırlar. Nanopartiküller yüksek yüzey alanları nedeniyle birçok kullanım alanında büyük avantaj sağlarlar. Nanoparçacıkların boyutları azaldıkça, yüzeylerinin hacimlerine olan oranı da artar. Özellikle adsorpsiyon gibi yüzeyle ilgili fiziksel olaylarda yüksek yüzey alanı/kütle oranı sayesinde hem kapasitenin artmasına ve hem de işlem sürecinin kısalmasına olanak sağlamaktadırlar. Nanopartiküllerin özelliklerinden dolayı bu maddeler, yüksek aktiviteli katalizörler, optik uygulamalar için özel teknolojik malzemeler, süper iletkenler, aşınmaya karşı katkı maddeleri, yüzey aktif maddeler, ilaç taşıyıcılar ve özel teşhis aletleri gibi birçok teknolojik ve farmakolojik ürünlerin hazırlanmasında kullanım alanı bulduğu gibi öte yandan, malzemelerin nanoboyut seviyesinde kontrolü nanotaşıyıcılar, sensörler, nanomakinalar ve yüksek yoğunluklu veri depolama hücreleri gibi kendine özgü işlevselliğe sahip minyatürleştirilmiş aygıtların gerçekleştirilmesine de izin vermektedir.

Moleküler baskılanmış nanopartiküller daha verimli bağlanma kapasitesi ve kinetiği, bunun yanında üniform küresel geometrileri, kararlılıkları ve kolay dispersiyonları nedeniyle farklı sensörlerin hazırlanmasına olanak sağlayacak şekilde transdüserlerde tanıma elementi olarak kullanılmaktadır (Moczko ve ark. 2013, Basozabal ve ark. 2014, Chang ve ark. 2013, Fang ve ark. 2014, Gurtova ve ark. 2013, Ivanova-Mitseva ve ark. 2012, Kara ve ark. 2013, Soysal ve ark. 2013). SPR sistemlerinde moleküler baskılanmış nanopartiküller ince filmlere göre daha avantajlıdır. Çünkü yüksek afiniteli bağlanma bölgelerinin sayısı fazladır ve hızlı bağlanmaya olanak verecek şekilde yüzeye yakın bölgededir. Fakat MIP nanopartiküllerin SPR sistemine uygulanması halen alışılmadık dışında bir yaklaşımdır ve geliştirilmesi için çok sayıda araştırmaya ihtiyaç vardır.



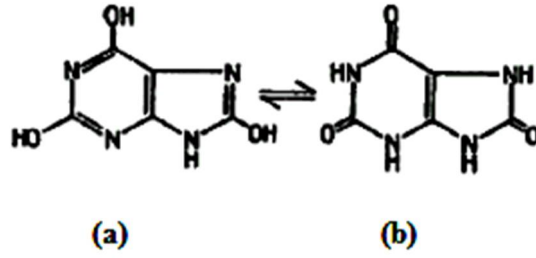
MIP nanopartiküllerin SPR yüzeyinde tanıma elementi olarak kullanıldığı az sayıda çalışma vardır. Büyük bir analit olan lizozim için moleküler baskılanmış nanopartiküller (50 nm çapında) hazırlanmış ve SPR yüzeyine entegre edilmiştir. Hazırlanan SPR sensör ile kompleks örneklerde nM düzeyinde tayin limitlerine ulaşılmıştır (Sener ve ark. 2011). Moleküler baskılanmış nanopartiküllerin SPR sensörde kullanıldığı bir başka çalışmada bal örneklerinde kloramfenikol tayini yapılmıştır (Kara ve ark. 2013). Taguchi ve arkadaşları bisfenol A (BPA) baskılanmış nanopartikülleri SPR çip üzerine entegre etmiştir (Taguchi ve ark. 2012). Bir başka çalışmada ise PHEMA/IMEO nanopartiküller SPR yüzeyine entegre edilek kanda IgG tayini için kullanılmıştır (Turkoglu ve ark. 2013). Bu güne kadar, ürik asit tayini için moleküler baskılanmış nanopartiküllerin kullanıldığı SPR sensör rapor edilmemiştir. Hatta ürik asit tayini için poli(2-aminobenzilamin)/tek duvar karbon nanotüp ince tüplerin (Chuekachang ve ark. 2013) ve gümüş@grafen oksit (Ag@GO) nanokompozitlerin (Kamali ve ark. 2015) tanıma elementi olarak kullanıldığı sadece iki adet SPR sensör rapor edilmiştir.

Bu çalışma kapsamında moleküler baskılama tekniği kullanılarak ürik asit baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartiküller sentezlendi ve SPR sensör yüzeyinde yapay tanıma bölgeleri oluşturuldu. Hazırlanan nanopartiküller ve sensör yüzeyi karakterize edilerek SPR sensörün ürik asit tayinindeki etkinliği, izoterm ve kinetik analizler, seçicilik çalışmaları ve tekrar kullanılabilirlik özellikleri incelendi. Literatürde ürik asit için çok sayıda elektrokimyasal sensör hazırlanmış ve bu alanda çok sayıda çalışma yapılmıştır. Elektrokimyasal sensörlerin en büyük dezavantajı biyolojik örneklerde ürik asidin askorbik asit gibi diğer analitler ile beraber bulunması nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Sözü edilen bileşiklerin birbirlerine yakın oksidasyon potansiyelleri nedeniyle ürik asidin elektrokimyasal sensörler ile seçici bir şekilde tayini yapılamamaktadır. Enzim temelli elektrokimyasal sensörlerde dayanıklılığı düşük biyolojik moleküllerin tanıma elementi olarak kullanılması da bir diğer dezavantajdır. Nanopartikül yüzeyinde oluşturulan seçici bağlanma bölgeleri ürik asidin molekül yapısına özgü olduğu için ve SPR sensörde tanıma elementi olarak termal/kimyasal dayanıklılığı yüksek sentetik polimerik nanopartiküller kullanıldığı için elektrokimyasal sensörlerde karşılaşılan seçicilik ve dayanıklılık problemleri de ortadan kaldırılmıştır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. Ürik Asit (UA)

Ürik asit (UA; 7,9-dihidro-1H-pürin-2,6,8(3H)-trion, MA:168 g/mol), insanda pürin metabolizmasının son ürünüdür. Beyaz renkli, kokusuz, tatsız bir kristaldir. İki tane tautomerik formu vardır (Şekil 2.1.1).



Şekil 2.1.1. UA'in (a) laktim ve (b) laktam formu

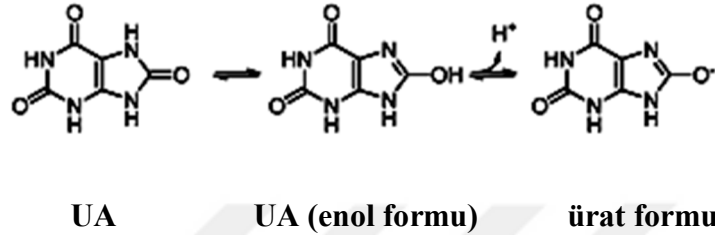
Redoks potansiyeli pH:7,0'de 0,59 V'tur. Kandaki pKa değeri 5,75, idrardaki pKa değeri ise 5,35'tir. Normalde atardamarda, pH 7,40'te aşağıdaki reaksiyona göre UA'in büyük bir kısmı ürat anyonu şeklinde bulunur (Eşitlik 2.1.1).



Çoğu memelide düşük serum ürat derişiminin sebebi (1 mg/mL; 60 µmol/L) UA'in çözünürlüğü oldukça yüksek boşaltım ürünü olan allantoinine dönüşmesidir. Sağlıklı bir insanda serum ürat derişimi teorik olarak serumdaki ürat çözünürlüğüne bağlıdır (6,8 mg/dL). Ürat anyonu da UA'e göre daha çözünür bir formdadır.

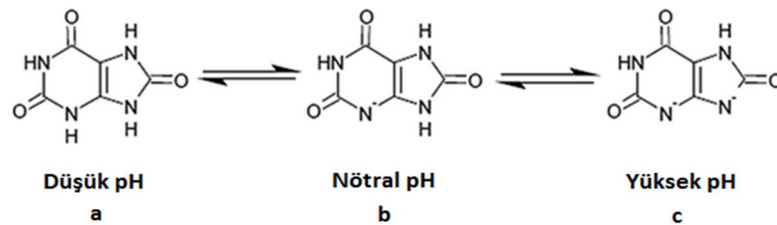
UA'in büyük bir kısmı diyet ile alınan besinlerin ve endojen pürin bileşiklerinin karaciğerde parçalanması ile oluşur. Diyet ile alınan UA, ürat öncüsünün en önemli kaynağıdır.

Fizyolojik pH’da ürik asidin keto ve enol formu denge halindedir. Enol formu fizyolojik pH’da proton kaybederek ürat formuna dönüşür (Şekil 2.1.2). Bazı durumlarda, örneğin pH: 7,40, 37 °C’de serumda yaklaşık % 98 oranında UA monosodyum ürat tuzuna iyonize olur. Bazı durumlarda, ürat kuvvetli indirgen ve potansiyel antioksidandır. İnsanlarda, plazmadaki antioksidan kapasitesinin yarısını UA oluşturmaktadır.



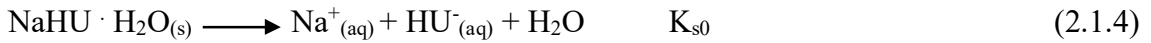
**Şekil 2.1.2.** Ürik asidin enol formundan ürat formuna dönüşmesi

Zayıf asit olan ürik asidin pKa değerleri sırasıyla 5,4 ve 10,3’tür (Potts, 2004). İnsan plazmasında (pH 7,4) çoğu (% 98) UA monovalent sodyum tuzu formunda (ürat) bulunur (Oliveira ve Burini, 2012). pH azaldıkça ortamda ürik asidin protonlanmış formu artar. Ürik asidin çözünürlüğü ürata göre daha azdır. Bu durumda pH’deki azalmaya bağlı olarak doku ve böbrek tübüllerinde UA kristalleri şeklinde birikerek gut hastalığına neden olur (Offermanns ve ark. 2008). İnsan idrarında, pKa değeri yaklaşık 5,35’tir. Bu da idrarın azami ölçüde asidik olduğunu (pH yaklaşık 5,0) gösterir ve ürik asidin büyük bir kısmı çözünmeyen formda bulunur (Potts, 2004). Şekil 2.1.3’te ürik asidin düşük, nötral ve yüksek pH ortamındaki kimyasal formları gösterilmiştir.



**Şekil 2.1.3.** Ürik asidin (a) düşük, (b) nötral ve (c) yüksek pH ortamındaki kimyasal formu

UA ve monosodyum üratın fizyolojik NaCl çözeltisindeki çözünürlüklerinin araştırılması için UA-sodyum ürat-su sisteminde çözünürlükleri incelenmiştir. Bu heterojen sistem için en az üç eşitliğin olması gerekir (Eşitlik 2.1.2-2.1.4):



*Susuz UA:*  $p[\text{H}] \leq 3$  olduğunda, ürik asidin çözünürlüğü düşüktür ve  $p[\text{H}]$ 'tan bağımsızdır. Hidrojen iyonu derişiminin yüksek olduğu durumda,  $\text{H}_2\text{U}_{(aq)}$  fazla olan türdür ve bu durumda ürik asidin iyonlaşması göz ardı edilebilir.  $3 < p[\text{H}] < 5$  olduğu durumda ürik asidin çözünürlüğü  $p[\text{H}]$  ile artar. Başlangıç çözeltisindeki hidrojen iyonu derişiminin azalması,  $\text{H}_2\text{U}_{(aq)}$  iyonlaşmasını artırır. Böylece  $\text{HU}^-$  toplam UA derişimine önemli ölçüde katkıda bulunur.  $5 < p[\text{H}] < 7$  olduğu zaman, ürik asidin çözünürlüğü hala  $p[\text{H}]$ 'a bağlı olarak artmaktadır.

*Monosodyum ürat monohidrat:* başlangıç çözeltisinin  $p[\text{H}]$  değeri 1,6'dan 3'e değışse bile monosodyum üratın çözünürlüğü hemen hemen sabit kalır.  $7 < p[\text{H}] < 8$  aralığında, UA ve ürat iyonlarının derişimi göz ardı edilebilir ( $[\text{U}]_{\text{toplam}} \approx [\text{HU}^-]$ ). Monosodyum üratın çözünürlüğü sodyum iyonlarının başlangıçtaki derişimine bağlıdır. Başlangıçtaki  $\text{Na}^+$  derişimi sabit kaldığı sürece,  $\text{HU}^-$  iyonlarının derişimi de bu  $p[\text{H}]$  aralığında sabittir. Böylece, monosodyum ürat monohidrat derişimi hesaplanabilir.

Monosodyum ürat çözünürlüğü, sodyum iyonlarının derişiminin azalması ve başlangıçtaki çözeltide bulunan hidrojen iyonlarının derişiminin artması ile artar. Toplam ürat derişimi Eşitlik 2.1.5 yardımı ile hesaplanabilir.

$$\begin{aligned} [\text{U}]_{\text{toplam}} &\equiv [\text{H}_2\text{U}] + [\text{HU}^-] = [\text{HU}^-] [\text{H}^+] / K_1 + [\text{HU}^-] = [\text{HU}^-] ([\text{H}^+] / K_1 + 1) \\ &= K_{s0} ([\text{H}^+] / K_1 + 1) / [\text{Na}^+] \end{aligned} \quad (2.1.5)$$

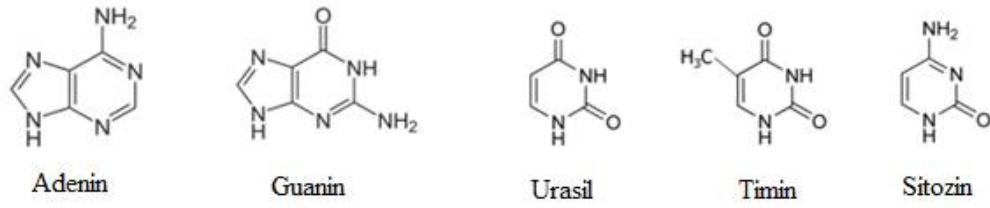
Düşük p[H] (< 5) durumunda UA derişimi ürik asidin çözünürlüğü ile sınırlıdır. Yüksek p[H]'da (> 6) monosodyum üratın düşük çözünürlüğü çözeltilerdeki ürat derişimini sınırlar. Bununla birlikte, yarı-kararlı UA çözeltileri p[H]  $\approx$  6'nın üzerinde bulunur. Bunlar monosodyum ürata kıyasla aşırı doymuş çözeltilerdir (Wang ve Königsberger 1998).

## 2.2. Nükleik asit metabolizması ve ürik asit

Heterosiklik, aromatik organik bileşikler olan pürinler imidazol ve pirimidin halkalarından oluşan azotlu bazlardır. Pürinler DNA ve RNA'ların yapılarında bulunmalarının yanı sıra adenozin trifosfat (ATP), guanozin trifosfat (GTP), nikotinamid adenin dinükleotit (NADH), koenzim gibi önemli biyokimyasal molekülleri de oluşturmaktadırlar (Nelson ve Cox, 2005). Pürin halkasındaki atomlar CO<sub>2</sub> ve tetrahidrofolat türevi (N10-formil-tetrahidrofolat) ve aspartik asit, glisin ve glutamin amino asitlerinden sağlanmaktadır.

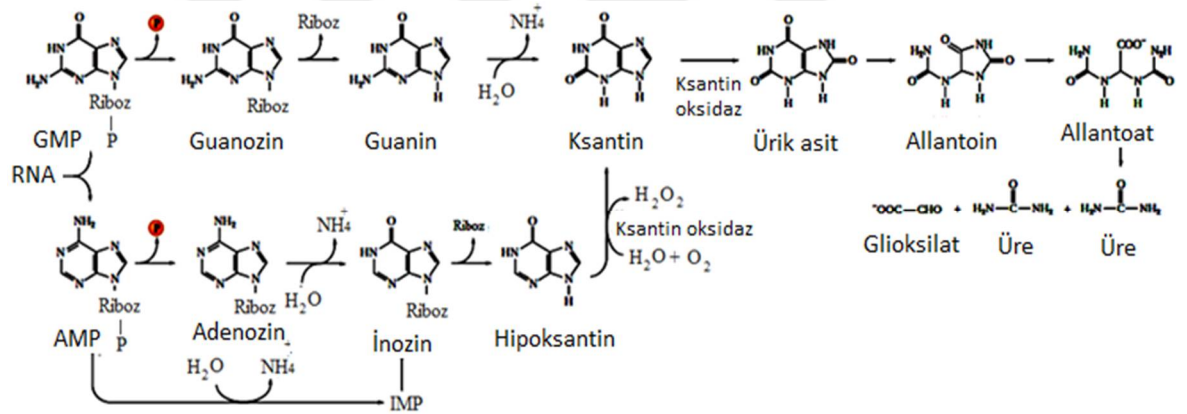
Heterosiklik aromatik organik bileşikler olan pirimidinler, azotlu zayıf bazik bileşiklerdir. DNA, RNA, bazı koenzim ve vitaminlerde bulunan pirimidinlerin sentezinde ilk önce pirimidin halkası sentezlenir. Daha sonra riboz fosfat birimi bağlanır. 5-fosforibozil-1-pirofosfat (PRPP) riboz fosfat vericisi olarak görev yapar. Pirimidin halkasının ön maddeleri karbamoil fosfat ve aspartattır. Pirimidin halkasının atomları aspartat, CO<sub>2</sub> ve glutaminden sentezlenir. Pürinlerle hidrojen bağı oluşturmalarından dolayı nükleik asitlerin üç-boyutlu yapılarını ve biyolojik işlevlerini sağlar (Keha ve Küfrevioğlu 2000).

Adenin (A), ve guanin (G) pürin bazlarını oluştururken, urasil (U), timin (T) ve sitozin (C) pirimidin bazlarını oluşturur (Şekil 2.2.1). Pürin bazlarının her ikisi de DNA ve RNA'nın yapısında bulunur. Pirimidin bazlarından urasil yalnızca RNA'nın yapısında bulunurken timin ise yalnızca DNA'nın yapısına katılır. Sitozin ise hem DNA'da hem de RNA'da bulunur.



**Şekil 2.2.1.** Pürin ve pirimidin bazları

Pürin nükleotidlerinin yıkımı, 5'-nükleotidaz enzimi etkisiyle fosfat grubunun ayrılmasıyla başlar. Adenilat adenzini oluşturur, inozin ise hipoksantin ve D-riboza hidrolizlenir. Hipoksantin aşamalı olarak ksantine dönüşür. Ksantin de ksantin oksidaz enzimi katalizörlüğünde ürik aside oksitlenir. Pürin katabolizmasının son ürünü olan ürik asit (UA) primatlarda, kuşlarda ve diğer bazı hayvanlarda boşaltım ürünü olarak atılırken, diğer birçok omurgalıda ise urat oksidaz enzimi katalizörlüğünde allantoinine yıkılır (Şekil 2.2.2).



**Şekil 2.2.2.** Pürin katabolizması (Campbell ve Farrell 2009)

Ksantin oksidaz enzimi, prostetik grubunda bir molibden atomu ve dört demir-kükürt (Fe-S) merkezi içeren bir flavoproteindir. Moleküler oksijen, ksantin ürik aside yıkımında elektron alıcı olarak rol oynar. Ksantin oksidaz aynı zamanda süperoksit radikali ( $O_2^-$ ) oluşturur. Süperoksit radikali süperoksit dismutaz enzimi katalizörlüğünde hidrojen peroksit'e dönüşür. Süperoksit radikali ve hidrojen peroksit, hidroperoksi radikali ( $HO_2$ ), hidroksil radikali ( $OH$ ), hipoklorit ( $OCl$ ) gibi reaktif ürünler oluştururlar (Nelson ve Cox 2005).

*5-fosforibozil-1-pirofosfat (PRPP) sentezi:* PRPP, riboz fosfat pirofosfokiaz (PRPP sentetaz) katalizörlüğünde adenozin trifosfat (ATP) ve riboz-5-fosfattan sentezlenir. Nükleotid sentezi sırasında önce ribonükleotidler oluşur, daha sonra indirgenerek deoksiribonükleotide dönüştürülür. PRPP, pirimidin sentezi, pürin ve pirimidin kurtarma reaksiyonlarında ve nükleotid koenzim sentezinde kullanılır.

*5'-fosforibozilamin sentezi:* 5'-fosforibozilamin glutamin:fosforibozil pirofosfat amidotransferaz katalizörlüğünde PRPP ve glutaminden sentezlenir. Glutaminin amid grubu, PRPP'nin birinci karbonuna bağlı pirofosfatın yerine geçer.

*İmidin monofosfat (IMP) sentezi:* IMP, diğer pürin nükleotidlerin öncüsüdür. Arka arkaya gerçekleşen dokuz reaksiyonla sentezlenir.

*IMP'nin adenozin monofosfat (AMP) ve guanozin monofosfata (GMP) dönüşmesi:* AMP sentezinde enerji kaynağı guanozin trifosfat (GTP), GMP sentezinde ise ATP'dir. Her iki yolda da ilk reaksiyon son ürün tarafından inhibe edilir. Bu sayede, IMP, daha az miktarlarda bulunan pürinlerin sentezine yöneltilir. AMP ve GMP yeterli miktardaysa, de novo pürin sentezi, amidotransferaz basamağında inhibe edilir.

*Pürinler için Kurtarma Yolu (Salvage pathway):* Normal hücresel nükleik asit döngüsünden veya diyetten doğrudan gelen pürinler, tekrar nükleozid trifosfatlara çevrilerek vücutta kullanılır. Buna pürinlerin kurtarma yolu denir. Yüksek enerjili fosfat harcandığı için *de novo* sentez oldukça masraflıdır. Ayrıca eritrositlerde amidotransferaz olmadığı için, *de novo* sentez gerçekleşmez. Bu yolda adenin fosforibozil transferaz (APRT) ve hipoksantin-guanin fosforibozil transferaz (HGPRT) olarak adlandırılan iki enzim görev alır. Her iki enzim de PRPP'yi riboz-5-fosfat kaynağı olarak kullanır.

HGPRT hasarı Lesch-Nyhan sendromuna yol açar. Bu hastalıkta hipoksantin veya guaninin kurtarılması ve yeniden kullanılması mümkün değildir. Bunun sonucunda aşırı ürik asit (UA) üretimi (hiperürisemi) olur, hipoksantin atılımı artar ve monosodyum urat kristalleri oluşur. Tipik nörolojik belirtileri, kendi kendine zarar verme, istemsiz hareketler, koreatetoz, spastisite ve zeka geriliği şeklindedir. Enzim hasarı sonucunda

PRPP düzeyleri yükselir, IMP ve GMP azalır ve *de novo* pürin sentezi hızlanır. Allopürinol tedavisi yapılarak ürik asit oluşumu önlenir fakat pürin üretimi azaltılamaz.

*Pürin Nükleotidlerinin Yıkımı:* İnsanda pürin katabolizmasının son ürünü ürik asittir. Primatlar dışındaki memeliler ürik asiti allantoin'e yükseltir. Bu da bazı hayvanlarda üre ve hatta amonyağa kadar yıkılabilir. Ekzo ve endonükleazlar nükleik asitleri nükleotidlere parçalar.

*Diyetle Alınan Nükleik Asitlerin İnce Barsakta Yıkılması:* Pankreatik sıvıda bulunan ribonükleazlar ve deoksiribonükleazlar, RNA ve DNA moleküllerini oligonükleotidlere parçalar. Sonra, pankreatik fosfodiesterazlar, oligonükleotidleri mononükleotidlere hidroliz eder. Bir nükleotidaz ailesi mononükleotidlerden fosfatları ayırarak nükleozidleri açığa çıkarır. Nükleozidler barsak hücrelerince emilir veya emilmeden önce nükleozidazlar ile şeker grubu ayrılabilir. Böylece serbest bazlar açığa çıkar. Diyetle gelen bazlar, doku nükleik asitlerinin sentezinde çok fazla kullanılmazlar. Pürinler genellikle ürik aside çevrilerek (barsakta) idrarla atılır. Geri kalanı da barsak florası ile metabolize edilir.

Pürin nükleotid yıkımı ile ilgili genetik hasarlar primer hiperürisemi, sekonder hiperürisemi ve hipourisemi olmak üzere üç ana başlık altında toplanır.

1) Primer hiperürisemi : (Esansiyel hiperürisemi) Genetik bir hastalık olan primer hiperürisemi, sıklıkla 30 yaş üzeri erkeklerde görülür. *de novo* nükleotidlerin aşırı üretimi sonucunda aşırı ürik asit oluşumuna bağlıdır. Serum ürik asit derişimi 6,8 mg/dL'yi aşar ve eklemlerde sodyum urat kristalleri halinde birikir. Böbrekte de birikerek renal fonksiyon bozukluğuna yol açar.

a) PRPP sentetazın hiperaktivitesi: Enzimin aktivitesi artmıştır, pürin nükleozid difosfatlarla negatif geri beslemeye (feed back) duyarsızdır.



b) Glikojen depo hastalığı Tip I (Von Gierke) : Glukoz 6-fosfatazın genetik hasarındır. Glukoz 6-fosfat düzeyi artar ve hücre içi riboz fosfat düzeyleri artar. Bunun sonucunda hücre içi PRPP düzeyi artar ve pürin sentezi hızlanır.

c) Glutatyon redüktazın aşırı aktivitesi: Hücrel NADP'yi arttırır, riboz-fosfatlar PRPP sentezine gider.

2) Sekonder hiperürisemi: Myeloproliferatif sendrom, lösemi ve lenfomada kemoterapi sırasında, kronik böbrek yetmezliği, alkol, kurşun zehirlenmesi, psöriazis, sitostatik ilaçlar, diüretikler, salisilatlar, etambutol, pirazinamid kullanımı (renal tutulumu yol açarlar) ve Lesch-Nyhan sendromu gibi farklı hastalıklara bağlı olarak ortaya çıkar.

3) Hipoürisemiler:

Adenozin deaminaz (ADA) eksikliği: Şiddetli kombine immün yetmezlik ile birlikte görülür. T ve B hücre işlev bozukluğu olur. Çocuklar 2 yaşından önce sekonder enfeksiyondan ölür.

Pürin nükleozid fosforilaz (PNP) eksikliği: Ürik asit üretimi azalır, biriken pürin nükleozid ve nükleotidler ribonükleotid redüktazı inhibe eder.

Ksantin oksidaz hasarı: Ksantinüri olur.

UA genellikle idrar yoluyla atılır (Rocha ve Rocha 2010). Vücutta UA birikmesi diyetle alınan serbest pürin nükleotidlerinin yıkılması ve endojen sentezi ile olur. UA üretimi enzimatik proses sonucu ksantin ve hipoksantin gibi pürin bazlarının oluşumuyla gerçekleşir (Burgos ve Capone 1996). Gut, Lesch-Nyhan sendromu ve idrar taşı oluşumu gibi hastalıklar ile bağlantılı olduğu için ürik asidin klinik açıdan tayini önemlidir. Ayrıca, idrarda UA tahlili kemoterapötik ilaçların etkisinin görüntülenmesinde de önemlidir (Rocha ve Rocha 2010). Kardiyovasküler hastalıklar, serumda ürik asit miktarının artmasıyla ilişkilidir ve bileşenlerin sayısındaki artışın metabolik sendromda payı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca serumda yüksek UA miktarı (hiperürisemi), hipertansiyon veya kan yağ oranının değişmesi (dislipidemia) gibi risk faktörleri ile ilişkilidir ve kardiyovasküler

riski arttırır. Bu risk faktörleri hipertrigliseridemi, hipertansiyon, obezite ve hiperglisemi gibi metabolik sendromlardır (Lin ve ark. 2006, Yamada ve ark. 2011). Lin ve arkadaşlarının 2006'da yaptığı bir çalışmada, serum UA düzeyi ve metabolik sendrom ürünleri arasındaki ilişki gösterilmiştir (Lin ve ark. 2006). Hiperürisemi ayrıca insülin direnci ile de ilişkili olduğu için, kardiyovasküler rahatsızlığın önceden belirlenmesinde etkilidir. Yapılan çalışmalarda UA artışının, alkole bağımlı olmayan karaciğer yağlanması için risk faktörü oluşturduğu gözlenmiştir (Yamada ve ark. 2011). Serumdaki UA miktarının yüksek olması gut hastalığına neden olur. Bu hastalık eklemlerde ve diğer bağ dokularında monosodyumürat monohidrat kristallerinin çökmesi şeklinde olur. Normal UA miktarı kadınlarda 5 mg/dL, erkeklerde 6 mg/dL düzeyindedir. Menopoz sonrası kadınlarda UA derişimi erkeklerdeki düzeye ulaşmaktadır. UA'in çözünürlüğü sıcaklık ve pH'ya bağlıdır. Ürik asidin çözünürlük sınırı normal vücut sıcaklığı olan 37 °C ve pH 7,4'te 7,0 mg/dL'dir. Hemen hemen tüm gut hastalarında UA seviyesi 7,0 mg/dL civarındadır (Burgos ve Capone 1996). Plazmada UA miktarının artması, kronik kalp yetmezliğinde belirgin bir şekilde görülmektedir. Bu durumun böbreklerde fonksiyon bozukluğu şeklinde görülen ve patofizyolojik bir durum olan kardiyorenal sendromla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Kardiyorenal sendromda ürik asidin böbrekten atılımı azaldığı için hiperüriseminin kalp yetmezliği ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Li ve ark. 2012). Hiperürisemi preeklampitik hamilelikte (gebelik zehirlenmesi) sıklıkla görülen bir durumdur. Preeklampitik kadınlarda UA yükselmesi ile hipertansiyon ve proteinüri daha sık görülür. Preeklampsisi durumunda UA miktarı için, abnormal böbrek fonksiyonları, doku yıkımının artması, asidoz ve ksantin oksidaz/dehidrogenaz enzimlerinin aktivitesinin artması gibi birçok farklı potansiyel kaynağı vardır. Hamilelik dışında hiperürisemi; hipertansiyon, kardiyovasküler ve böbrek rahatsızlıkları için risk faktörü oluşturur. Bu bulgu preeklampitik kadınlarda yüksek UA derişiminin patofizyolojik olarak rol oynadığını düşündürür (Bainbridge ve Roberts 2008).

### 2.3. Ürik Asit Tayin Yöntemleri

Pürin nükleotid metabolizmasının son ürünü olan ürik asit (UA) ksantin oksidaz enziminin kataliziyle ksantin ve hipoksantinden oluşmaktadır (Fahlen ve Agraharkar 2004). UA sadece kristal formda bulunmasından dolayı değil, hipertansiyon, insülin direnci, metabolik sendrom durumunda plazmada bulunmasından dolayı da oldukça önemlidir (Yoo ve ark. 2005, Nakagawa ve ark. 2006). Yapılan bazı çalışmalarda antioksidan özelliğinden dolayı, suda çözünen UA'in spesifik taşıyıcılarla hücre içine girdiği ve proinflamator ve prooksidatif etkilerinin olabileceği rapor edilmiştir. Bu nedenle, intraselüler UA derişimi, bu molekülün hücrenel etkilerinin anlaşılmasında oldukça önemli bir rol oynamaktadır (Kanellis ve ark. 2003, Kang ve ark. 2005, Khosla ve ark. 2005, Corry ve ark. 2008).

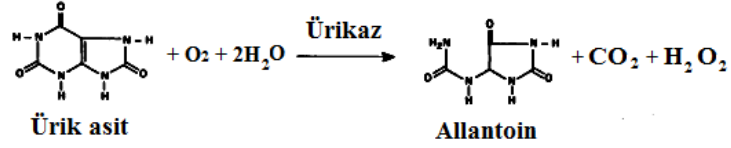
UA tayinine yönelik ilk analitik metot 1894 yılında Offer tarafından kullanılmıştır. Offer (1984), UA'in antioksidan özelliklerini kullanarak fosfotungstat kompleksinin indirgenmesi sonucu ortamdaki renk değişiminden yararlanarak UA derişimini kolorimetrik olarak belirlemiştir (Offer 1894). 1895 yılında aynı prensibe dayalı diğer metotlar da uygulanmış fakat hepsinde çok fazla örnek hazırlama işlemi yapılmıştır.

İlk enzimatik metot 1941 yılında, UA'in ürikaz enzimi tarafından katalizlenen reaksiyon sonucu oluştuğu anlaşıldıktan sonra uygulanmış ve 293 nm dalga boyunda absorban ölçümü alınarak bir metot geliştirilmiştir (Bulger ve Johns 1941). Aynı reaksiyonun kullanılmasıyla peroksidaz enzimi varlığında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluşmakta, ortamdaki kromojenik boya oksitlenmekte ve açığa çıkan kırmızı renk 520 nm dalga boyundaki ışığı absorplamaktadır. Renk oluşumuyla ortamdaki UA miktarı kolayca hesaplanabilmektedir. Bu yöntem klinik laboratuvarlarda UA belirlenmesinde rutin olarak kullanılan bir analiz yöntemidir (Perello ve ark. 2005).

Klinik laboratuvarlarda UA'in ölçüm metotlarında genellikle fosfotungstatın indirgenme özelliğinden yararlanılmaktadır. Bu tür metotlar, normal metabolitlerin, ilaçların ya da bunların yıkım ürünlerinin girişim yapmasından dolayı normal UA derişim değerini arttırmaktadırlar. Oksidatif enzim olan ürikaz özgülüğü arttırmak için UA derişiminin

belirlenmesinde kullanılmaktadır. Ürikaz enziminin kullanıldığı otomatikleşmiş ölçüm teknikleri iki ana gruba ayrılmaktadır: (1) ürikaz inkübasyonundan önce ve sonra 292 nm’de UV absorpsiyonunun belirlenmesi, (2) ürikaz inkübasyonundan önce ve sonra indirgen maddelerin kolorimetrik olarak belirlenmesi (Gochman ve Schmitz, 1971).

Ürik asidin ürikaz enzimiyle allantoina çevrilmesinden (Şekil 2.3.1) önce ve sonra 292 nm’de alınan absorbans değerleri enzimatik metodun temelini oluşturmaktadır (Feichtmeir ve Wrenn 1955, Remp 1970, Duncan ve ark. 1982). Fakat endojen bileşiklerin sebep olduğu büyük ve kararsız absorbans değişimleri nedeniyle, araştırmacılar spesifik ürikaz reaksiyonunu tamamlayıcı indikatör sistemleriyle birleştirerek daha duyarlı metotlar geliştirmişlerdir.



**Şekil 2.3.1.** Ürik asitten ürikaz enzimi katalizörlüğünde allantoin ve hidrojen peroksit sentezi

Gochman ve Schmitz, UA için kolorimetre esaslı otomatik bir ölçüm yöntemi tasarlamışlardır. Bu yöntemde ürikaz enzimi katalizörlüğünde UA’ten allantoin, CO<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> meydana gelmektedir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>’in ortamdaki derişiminin azalması peroksidaz enzimi katalizörlüğünde gerçekleşmektedir. Tasarlanan bu sensörde çift enzim sistemi kullanılmıştır. Bu sistemde 3-metil-2-benzotiazolinon hidrazon ve N,N-dimetilanilini birleştirmişlerdir. Reaksiyonun hassas ve girişim yapan maddelere karşı dirençli olduğu ve reaksiyon esnasında oluşan mavi indamin boyasının kararlı olduğu rapor edilmiştir. (Gochman ve Schmitz 1971).

Yapılan bir başka çalışmada, ürikaz katalizörlüğünde gerçekleşen reaksiyon sonucu açığa çıkan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peroksidaz enzimi varlığında 2,4,6-tribromofenol ve 4-aminoantipirin çifti ile yer değiştirmektedir. Reaksiyon sonucu oluşan renk sabit kalmakta ve 492 nm’de absorbans vermektedir (Kabasakalian ve ark. 1973).

Trivedi ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada, ürikaz katalizörlüğünde UA'ten meydana gelen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in peroksidaz enzimi varlığında *p*-hidroksibenzoat ve 4-aminoantipirin ile birleşerek renkli bir kompleks oluşturduğu, bu renkli kompleksin de 500 nm'de absorbanans verdiği gözlenmiştir (Trivedi ve ark. 1978).

Fakat bununla birlikte tamamlayıcı indikatör sistemleriyle gerçekleştirilen ölçümlerde kinetik davranışın kompleksliğinin artması nedeniyle UA için güvenilir kinetik metotların geliştirilmesinde zorluklar yaşanmıştır. Bu tür çalışmalarda hastalardan gelen örneklerde girişime neden olan maddeler, katalaz/aldehit dehidrogenaz ya da peroksidaz gibi enzimlerle reaksiyon esnasında birleşmekte ya da ortamda bulunan bilirubin girişim yapmaktadır (Dilena ve ark. 1986). Ayrıca enzim çiftlerinin kullanıldığı ya da renkli kompleks oluşumunun gerçekleştiği metotlarda uzun reaksiyon süreleri, bu tür ölçümlerin rutin klinik analizlerinde kullanımlarını kısıtlamaktadır (Trivedi ve ark. 1978, Dilena ve ark. 1986).

Kimyasal yöntemler, fosfotungstatı indirgedikleri için endojen ve ekzojen bileşiklerin varlığına göre yüksek değerler vermektedir. Enzimatik yöntemler, çok yüksek seçicilikte olmalarına rağmen, metaller gibi farklı bileşiklerin girişim yapmasından dolayı hatalı sonuç verebilmektedir. Tüm bunlara alternatif olarak UA tayini için iyon-değişim, iyon-çifti, ters faz ve boyut-dışlama kromatografisi gibi kromatografik yöntemler geliştirilmiştir. Tüm bu yöntemlerin en büyük ortak sorunu, serum örneğinin analizden önce deprotonlanmaya ihtiyaç duymasıdır. Bu problem Haden (Haden 1923) ya da Somogyi'nin (Somogyi 1945) önerdiği prosedürler ile giderilebilmektedir. Ayrıca trikloroasetik asit, perklorat ya da asetonitril ilavesiyle de gerçekleştirilebilmektedir. Fakat tüm bu yöntemlerde örnekler santrifüjlenmeli ve fosfat tamponuyla hazırlanmalıdır (Perello ve ark. 2005).

Biyolojik örneklerde UA derişiminin tayini doğrudan metotlarla yapılmaktadır. Serum UA derişimi çözücülerdeki yüksek indirgen aktivitesine dayalı metotlarla ölçülmekte fakat örnekteki UA derişimi oldukça düşüktür (Kubo ve Toriba 1997). UA'in biyolojik örneklerden ayrılması ve tayininde genel olarak kan ve idrar örnekleri kullanılmaktadır. Gut hastalarının kanındaki UA derişimi ile tükürüğündeki UA derişiminin benzer

olmasından dolayı (Owen-Smith ve ark. 1998) son zamanlarda tükürük örneği de gut, hiperürisemi ve Lesch-Nyhan sendromu gibi hastalıkların teşhis ve tedavisinde de kullanılmaya başlanmıştır. Buna rağmen, az miktardaki insan tükürüğünde UA derişiminin belirlenmesi için yüksek duyarlılıkta metotlar mevcut değildir.

Inoue ve arkadaşları (2003) tarafından yapılan bir çalışmada, tükürükte UA derişiminin belirlenmesi için basit, hızlı, duyarlı, seçici ve hassas bir yöntem geliştirmiş ve bunun için ultraviyole (UV) ve elektrokimyasal dedektörlerin (amperometrik ve koulometrik) kıyaslamasını yapmıştır. Elde edilen sonuçlara göre UV dedektörünün kullanıldığı metodta doğrusal aralık 0,6-60 µM, tayin limiti (LOD) 180 nM, tayin sınırı (LOQ) ise 600 nM olarak belirlenirken, amperometrik ve koulometrik dedektörlerin kullanıldığı metodta bu değerler sırasıyla 0,06-6 µM ve 0,06-6 µM (doğrusal aralık), 3 nM ve 6 nM (LOD), 10 nM ve 20 nM (LOQ) olarak rapor edilmiştir (Inoue ve ark. 2003).

UA derişiminin ölçümünde alternatif bir yaklaşım da yüksek performanslı sıvı kromatografisi-ultraviyole (HPLC-UV) (Sakuma ve ark. 1987, Czauderna ve Kowalczyk 1997, Cooper ve ark. 2006) ya da gaz kromatografisi-kütle spektrometresinin (GC-MS) kullanıldığı (Ellerbe ve ark. 1990, Thienpont ve ark. 1996, Chen ve ark. 1998) kromatografik metotlardır. Bununla birlikte, idrar, plazma, serum ve doku gibi biyolojik örneklerde birçok girişimci molekül bulunmakta, bu da biyolojik analizler için yüksek duyarlılık ve seçicilik gerektirmektedir. Buna rağmen, HPLC-UV dedeksiyonu düşük duyarlılık ve seçiciliktir. Bu nedenle analizler için örnek hazırlama aşamasına ihtiyaç duyulmaktadır (Sakuma ve ark. 1987, Czauderna ve Kowalczyk 1997, Cooper ve ark. 2006). Tekrarlanabilirliğin, seçiciliğin ve duyarlılığın geliştirilmesi için, biyolojik örneklerde sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (LC-MS) ve LC-MS/MS analitik teknikleri kullanılmaktadır. LC-MS analiz süresinin azaltılmasında ve herhangi bir türevlendirme yapılmadan uçucu olmayan örneklerin ve termal olarak kararsız olan bileşiklerin ölçümünde avantaj sağlamaktadır (Ohki ve ark. 1992, Wood ve ark. 2006, Pendela ve ark. 2008, Tolonen ve ark. 2009).

Kim ve arkadaşları tarafından 2009 yılında yapılan bir çalışmada, hücre içerisinde, plazma ve idrarda UA derişiminin ölçümünde LC-MS/MS metodu geliştirilmiştir. Bu

amaçla, iç standart olarak izotopla işaretlenmiş UA (1,3-<sup>15</sup>N<sub>2</sub>-UA) kullanılmış ve hem hücre içi (hücre lizatı) hem de hücre dışı (idrara ve plazma) örneklerde UA derişimini hassas ve seçici bir şekilde, yüksek verimlilikle ve kısa sürede ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre, hücre lizatında doğrusal yanıt aralığı 8,40 µg/dL – 4,00 mg/dL ve tayin limiti (LOD) 0,84 µg/dL, tayin sınırı ise (LOQ) 8,40 µg/dL olarak hesaplanmıştır. İdrardaki UA derişimi 5,20 - 40,63 mg/dL ve plazmadaki UA derişimi ise 4,29 - 9,09 mg/dL olarak ölçülmüştür (Kim ve ark. 2009).

İnsan fizyolojik sıvılarında UA tayini doğrudan yapılmaktadır. UA'ın ayrılması ve tayini genellikle HPLC ve HPLC-MS kullanılarak yapılmaktadır. Bu metotlar rutin klinik analizler için tasarlanmamış olup, HPLC'nin yüksek tayin limitine karşın HPLC-MS metodunun oldukça düşük tayin limiti vardır ve bu cihazların pahalı olmasından dolayı her klinik tarafından tedarik edilememektedir. Hem HPLC hem de HPLC-MS metotları örnekler için karmaşık hazırlık aşamaları gerektirmektedir. Her iki metotta da mobil faz olarak metanol, asetonitril gibi insan sağlığına ve çevreye zararlı organik çözücüler kullanılmaktadır.

Çevre dostu analiz yöntemlerinin seçilmesi ve kullanılmaya başlanmasıyla birlikte HPLC ve HPLC-MS gibi yöntemlere alternatif olarak organik çözücülerin kullanılmadığı ters faz-yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) kolonları geliştirilmeye başlanmıştır. Jen ve arkadaşları (2002) tarafından idrarda UA tayini için C18 kolon kullanılmış ve UA pH 7,4 amonyum fosfat tamponu ile ayrılmıştır (Jen ve ark. 2002). Tayin limiti çok düşük olmamasına rağmen bu yöntem iyon kromatografisi (IC) yöntemiyle kıyaslandığında karmaşık örnek hazırlama aşaması nedeniyle oldukça zaman alıcıdır. UA için tayin limiti kıyaslandığında, rutin analizlerde IC yöntemi hız, basitlik ve kalite bakımından HPLC ve HPLC-MS metotlarına göre daha üstündür.

Asidik koşullarda UA molekülündeki amino grubu, hidrojen iyonlarıyla birleşerek UA katyonlarını oluşturur ve UA katyonu, katyon değiştirici kolonlarında alıkonulur. İdrardaki diğer organik bileşikler katyon oluşturabilmek için hidrojen iyonlarıyla birleşemedikleri için katyon değiştirici kolonlarda alıkonmazlar. İdrardaki sodyum ve potasyum gibi anorganik katyonlar da katyon değişim kolonlarında alıkonulabilirler.

İdrardaki sodyum miktarı fazla olmasına rağmen UA belirlenmesinde iletkenlik dedektörünün kullanılmasıyla herhangi bir girişim yapmazlar. Ayrıca idrar örneğinin 1000 kat seyreltilmesiyle de potasyum derişimi tayin limitinin altında kalır. 0,10 - 20 mg/L derişim aralığında ölçüm alınan bir çalışmada tayin limiti 0,5 µg/L olarak hesaplanmıştır. Gerçek örnek çalışmasında ise 3 farklı hastadan alınan idrar örneklerinde UA derişimi 0,99 - 4,50 mg/L aralığında ölçülmüştür. Yöntem HPLC metoduyla kıyaslandığında benzer aralıkta sonuç vermiştir (Zhao ve ark. 2011).

**Çizelge 2.3.1.** UA tayininde kullanılan bazı yöntem ve tayin limitleri

Yöntem	Tayin limiti (LOD)	Referans
Hidrofilik etkileşim kromatografisi (HILIC)	0,06 µg/mL	Zuo ve ark. 2011
RP-HPLC	0,11 µg/mL	George ve ark. 2006
RP-HPLC	0,0034 mg/dL	Li ve Franke 2009
Ultra-yüksek performanslı sıvı kromatografisi (UHPLC)	0,0051 mg/dL	
RP-HPLC (Ultraviyole ve elektrokimyasal dedektör çifti)	15 ng/mL	Louisi ve Pascalidou 1998
HPLC	0,21 nmol	Czauderna ve Kowalczyk 2000
HPLC-UV	1,42 nmol/mL	Ferin ve ark. 2013
LC-MS/MS	0,07 mg/dL	Kwon ve ark. 2012
LC	0,2 µmol/L	Seki ve ark. 1997

Çizelge 2.3.1’de UA tayininde kullanılan bazı yöntem ve tayin limitleri özetlenmiştir. Görüldüğü gibi, UA için tayin limitleri oldukça düşüktür. Ancak bu metodlarda allantoin, ksantin, hipoksantin, askorbik asit gibi diğer moleküller de ölçülmektedir. Ayrıca



kromatografik yöntemlerde kullanılan cihazların rutin klinik laboratuvarları için pahalı cihazlar olması ve kullanılan kimyasalların çevreye ve insan sağlığı üzerine olumsuz etkileri nedeniyle alternatif teknikler geliştirilmektedir.

Biyolojik örneklerde UA'in kantitatif analizinde yaygın olarak kullanılan teknikler, kolorimetrik ve ürikaz enziminin kullanıldığı enzimatik metotlardır. Enzimatik metotlar oldukça seçimli olmasına rağmen, sıcaklıktan etkilenmesi, pahalı kimyasalların kullanımı ve kullanılan örnek hacminin fazla olması gibi dezavantajlara sahiptir. Bu yöntemlere alternatif olarak elektrokimyasal tayin yöntemleri geliştirilmiştir. Fakat bu yöntemler, biyolojik örneklerdeki UA derişiminin tayininde yeterince seçici ve hassas değildir (Zinellu ve ark. 2004).

İnsan idrarı ya da serumundan UA tayini için geliştirilen kolorimetrik ve kromatografik yöntemlerde analiz süresi uzun, ayırma kapasitesi düşük ve kolon ömrü kısadır. Bu nedenle UA tayininde kapiler elektroforez (CE) yöntemi de son zamanlarda kullanım alanı bulmaktadır. Bu yöntemin hızlı, hassas, çok küçük örnek hacmi ve tekrarlanabilir olması gibi pek çok avantajı bulunmaktadır. Yöntem elektrokimyasal dedeksiyon ile birleştirildiğinde (CE-ED), yüksek hassaslık ve iyi seçimlilik göstermektedir. Bunun yanı sıra seyreltilmiş örnek çözeltileri herhangi bir ön işlem olmadan direkt olarak enjekte edilebilmektedir (Guan ve ark. 2005).

Kapiler elektroforez (CE), biyolojik örneklerin belirlenmesinde basit, ucuz, yüksek verim, kütleyle duyarlı ve örnek ve çözücü ihtiyacının çok az olması gibi nedenlerle klinik analizlerde kullanım alanı bulmaktadır. UA tayinine yönelik UV ve elektrokimyasal dedeksiyonlu CE teknikleri geliştirilmiştir. UV dedeksiyonlu CE metodu düşük hassasiyetlidir. Bu durum biyolojik örneklerde UA derişiminin tayinini sınırlamaktadır. UV dedeksiyonuna alternatif olarak önerilen kemilüminesans (CL) dedeksiyonu yüksek hassasiyet, düşük maliyet ve yüksek uyum özellikleri göstermektedir. Zinellu ve arkadaşları (2004) tarafından yapılan bir çalışmada, serbest bölge CE yöntemi kullanılarak biyolojik örneklerden UA ve askorbik asit (AA) tayini yapılmıştır. Her iki analit için tayin limiti 0,5 mg/L olarak bulunmuştur. UV dedektörü kullanılan bu yöntemde analitlerin göç ortamı borat tamponu olarak belirlenmiş ve göçün gerçekleştiği

sıcaklık, tampon derişimi, voltaj miktarı, absorblamanın olduğu dalga boyu gibi birçok parametrenin optimizasyonu yapılmıştır (Zinellu ve ark. 2004).

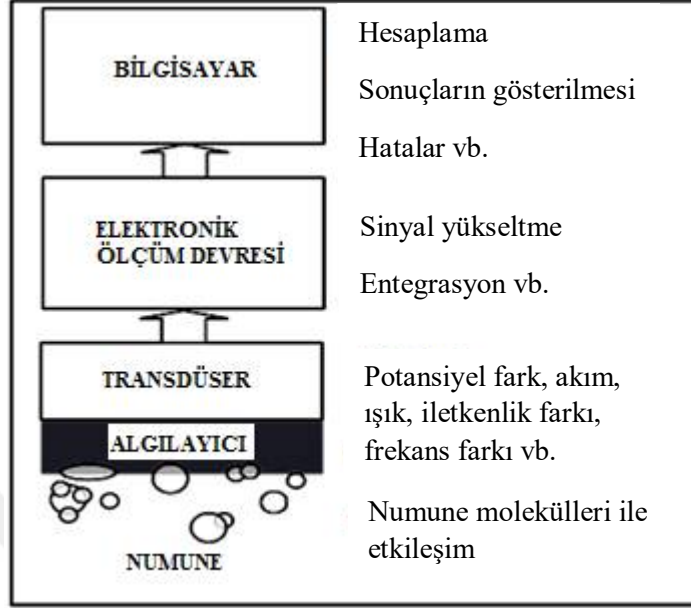
Guan ve arkadaşları (2005) tarafından yapılan bir başka çalışmada, tükürük ve idrarda UA, *p*-aminohippurik asit (PAH) ve bunların potansiyel girişimcilerinin (ksantin, hipoksantin, askorbik asit) duyarlı ve güvenilir tayini için elektrokimyasal dedeksiyonlu kapiler elektroforez (ED-CD) tekniği geliştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre UA için tayin limiti 0,66 µmol/L bulunmuştur (Guan ve ark. 2005).

Zhao ve arkadaşları (2008) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, kemilüminesans reaksiyonu UA varlığında luminol ve potasyum ferrisiyanid ( $K_3[Fe(CN)_6]$ ) arasında gerçekleşmektedir. Elde edilen sonuçlara göre tayin limiti 0,35 µM bulunmuştur. Luminolün  $K_3[Fe(CN)_6]$  ile alkali koşullarda reaksiyona girmesi nedeniyle reaksiyon ortamı NaOH özeltisi olarak seçilmiştir. CE-CL dedeksiyon sisteminde UA'in ayırma ortamındaki göçü son derece önemlidir. Göç ortamı için borat tamponu kullanıldığı için ortamın borat derişimi CL şiddetini etkilemektedir. Ayrıca uygulanan voltaj miktarı da hem UA ve luminolün göç hızını hem de CL şiddetini doğrudan etkilemektedir (Zhao ve ark. 2008). Tüm bu etkiler de göz önüne alındığında ucuz ve hassas olan CE sisteminin rutin klinik analizlerde kullanılabilmesi için optimum koşulların sağlanması gerekmektedir.

#### 2.4. Sensörler

IUPAC tanımına göre maddelerin kimyasal ve fiziksel özelliklerinden yararlanılarak numunedeki bileşenlerin derişimini kimyasal veriye dönüştürebilen ve tekrar tekrar kullanılabilen cihazlara sensör denilmektedir (Kenan 2014). Sensörler analiz edilen madde ile seçimli bir şekilde etkileşime giren aktif bir bileşenin, bu etkileşim sonucunda ortaya çıkan sinyali ileten bir iletici sistemle birleştirilmesi ve bunların bir ölçüm sistemiyle kombinasyonuyla oluşturulur (Özgür 2011) (şekil 2.4.1). Sensörler birçok alanda kullanım olanağı bulmaktadır. Sensörlerin kullanıldığı alanlar izelge 2.4.1.'de özetlenmiştir (Vetelino ve Reghu 2010). Sensörlerin performansını yüksek duyarlılık, tekrarlanabilirlik, tayin sınırı, seçici ve doğru yanıt vermesi, stabilite, ölçüm aralığının

geniş olması, cevap süresinin hızlı olması, yöntemin ucuz olması gibi parametreler etkilemektedir.



**Şekil 2.4.1.** Kimyasal sensörün şematik gösterimi (Kenan 2014)

Analiz edilecek bir örnek içerisinde bulunan diğer kimyasal maddelerden etkilenmeden yalnızca istenilen analite duyarlı olma durumu sensörün seçiciliğini göstermektedir. Yapılan analizlerin gerçek değere olan yakınlığı sensörün doğruluğunu verir. Sensörün duyarlılığı ise kullanılan cihazın analitteki değişime bire bir cevap vermesidir. Benzer koşullar altında arka arkaya alınan ölçümlerin hemen hemen aynı değerde olması ise kullanılan sensörün tekrarlanabilirlik parametresini göstermektedir. Sensörün kararlılığı pH, sıcaklık, nem gibi ortam koşullarına ve kullanılan materyalin fiziksel dayanıklılığına bağlıdır (Kenan 2014).

**Çizelge 2.4.1. Sensörlerin kullanım alanları**

Ziraat	İmalat
Otomotiv	Denizcilik
İnşaat	Medikal
Tüketim malları	Ordu
Enerji	Okyanus bilimi
Çevre	Güvenlik sistemleri
Balıkçılık	Uzay
Gıda teknolojisi	Taşımacılık
Ormancılık	Atık yönetimi
Sağlık	Diğerleri

Klinik kimya laboratuvarlarındaki klinik analizler pahalı ve zaman alıcı işlemler olmasından dolayı, analitler hastane, hastane dışındaki hasta bakıcılar ve hastaların evlerinde kendi kendilerine aldıkları ölçümlerden dolayı farklı ortamlarda fazla sayıda ölçüm gerçekleştirilmektedir. Günümüzde bu metotların gelişmesindeki en büyük etken hızlı ‘*in situ*’ (yerinde) analizlerin gelişmesidir. Bu metotlar duyarlı ve kesin olmalıdır. Aynı zamanda gerçek örneklerde farklı özelliklerdeki birçok maddenin belirlenmesine olanak sağlamalıdır. Klinik kimyada ilgilenilen analitlerin ölçülmesinde elektrokimyasal sensörler yüksek duyarlık ve seçicilik özelliği göstermesi, portatif boyutta olması, hızlı yanıt süresi ve düşük maliyetinden dolayı bu yeni uygulamalar için uygundur (Wang ve ark. 2008).

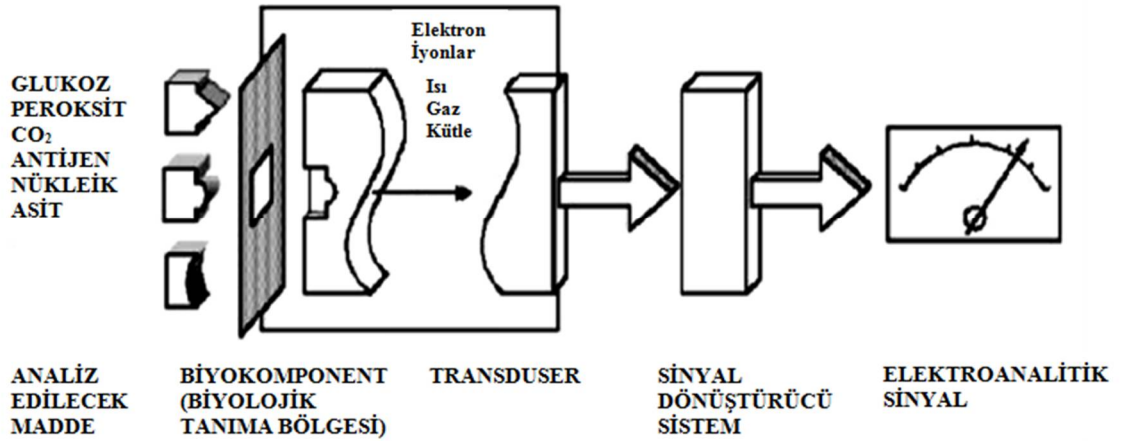
Klinik kimyada kullanılan ilk elektrokimyasal sensör 1962 yılında Clark ve Lyons tarafından geliştirilen ve ‘enzim elektrodu’ olarak bilinen elektrokimyasal biyosensördür. Bu sensörde oksijenin ölçülmesi için amperometrik elektrot olarak glukoz oksidaz (GOx) enzimi kullanılmıştır (Clark ve Lyons 1962).

Kimyasal sensörler, fizikokimyasal algılayıcı (transdüser) ile yakın etkileşim içinde olan moleküler tanıma sistemlerinden oluşmaktadır. Analit derişimiyle orantılı olarak üretilen

sinyal, algılayıcı olarak adlandırılan sistem tarafından ölçülür. Çizelge 2.4.2’de sensörlerde kullanılan algılama araçları sıralanmıştır. Eğer sensör sisteminde enzim gibi biyolojik tanıma elementi varsa bu sistem biyosensör olarak adlandırılmaktadır (Turner ve ark. 1987). Algılayıcı elektrokimyasal, optik, mekanik ya da termometrik olabilir (Alcock ve Turner 1994). Şekil 2.4.2’de bir biyosensörün bileşenleri şematik olarak gösterilmiştir. Kimyasal sensörü biyosensörden ayıran en temel özellik biyosensörde analiz edilecek maddeyi tanıyacak biyolojik bir tanıma bölgesinin bulunmasıdır. Çizelge 2.4.3’te biyosensör bileşenlerinin içeriği verilmiştir.

**Çizelge 2.4.2.** Sensörlerde kullanılan algılama araçları (Vetelino ve Reghu 2010)

Biyolojik
Kimyasal
Elektrik, manyetik ya da elektromanyetik dalga
Isı, sıcaklık
Mekanik yer değiştirme ya da mekanik dalga
Radyoaktivite, radyasyon
Diğerleri (özelleşmiş)



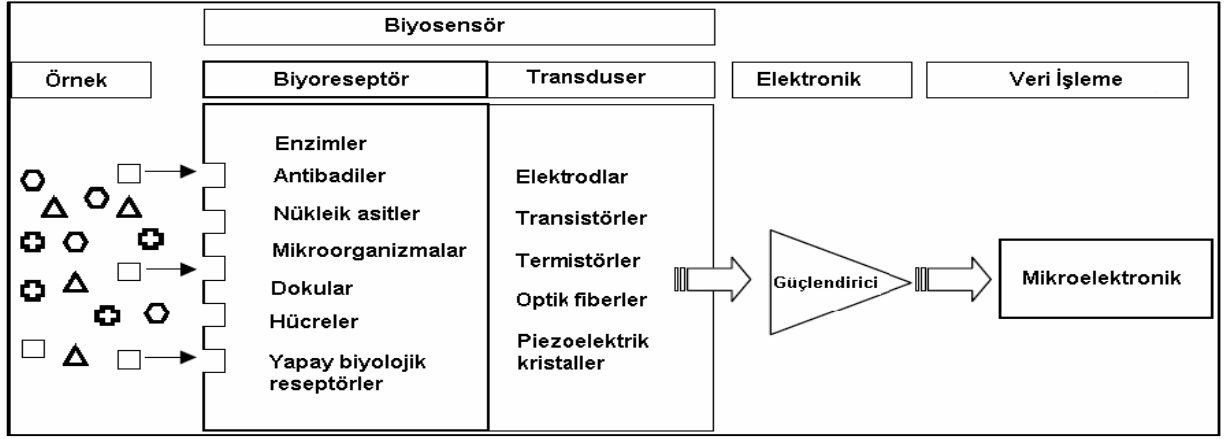
**Şekil 2.4.2.** Biyosensör bileşenlerinin şematik gösterimi ( Newman ve ark. 2001)

**Çizelge 2.4.3.** Biyosensör bileşenlerinin içeriği

<b>Analit</b>	<b>Biyokomponent</b>
Metaller	Enzimler
Hormonlar	Antikorlar
Enzim-Koenzimler	Hücre (Doku kesitleri, Mikroorganizmalar)
Substrat	Nükleik asitler
Aktivatör-İnhibitör	Lipidler
Antikor-Antijen	Hücre organelleri
Nükleik asit	Reseptörler
Mikroorganizmalar	
Virüsler	

#### **2.4.1. Biyosensörler**

IUPAC'ın 1999 yılında yaptığı öneriye göre biyosensörler, biyolojik tanıma elemanlarının kullanılmasıyla seçici kantitatif ya da yarı-kantitatif analitik bilgilerin sağlanabildiği cihazlar olarak tanımlanmıştır (Thevenot ve ark. 1999). Biyosensörler biyolojik ya da biyolojik materyallerden türetilmiş tanıma elemanları ve dönüştürücüleri sayesinde spesifik biyo-analitleri biyolojik sinyalden elektriksel sinyale dönüştürürler (Lowe 2007). Bir biyosensörde biyoreseptör, dönüştürücü ve sinyal kaydedici sistem olmak üzere üç ana parça vardır. Biyolojik tanıma elemanı ya da biyoreseptör genellikle spesifik hedef analiti ölçebilen bir biyolojik bileşenin immobilizasyonu ile oluşturulur (Kahn ve Plaxco 2010). Analit ve biyoreseptör arasındaki reaksiyon genellikle yeni bir ürün oluşumu, sıcaklık değişimi, elektron akışı, pH ya da kütle değişimi şeklinde olur. Oluşan biyolojik sinyal dönüştürücü sayesinde elektriksel sinyale dönüştürülür ve mikroelektronik kısma yollanarak veriler elde edilir. Şekil 2.4.1.1'de bir biyosensörün şematik gösterimi verilmiştir.



**Şekil 2.4.1.1.** Biyosensörün şematik gösterimi

Biyosensörler biyolojik sinyal mekanizmalarına (biyolojik tanıma elemanı/biyoresepör) göre ya da sinyal dönüştürücülerine (transdüser) göre iki ana gruba ayrılır. Biyolojik tanıma katmanlarına göre biyosensörler kendi aralarında beş ana gruba ayrılır. Bunlar, enzim temelli sensörler, immünosensörler, DNA/nükleik asit sensörleri, hücre temelli sensörler ve biyomimetik (aptamerlerin kullanıldığı aptasensörler) sensörleridir. Dönüştürücülerine göre; elektrokimyasal biyosensörler (amperometrik, potansiyometrik, kondüktometrik, elektriksel impedans spektroskopisi), optik temelli biyosensörler (yüzey plazmon rezonans, kemilüminesans, floresans, optik fiber), piezoelektrik temelli biyosensörler (yığın dalga ve yüzey akustik dalga), kalorimetrik temelli biyosensörler şeklinde dört gruba ayrılır (Perumal ve Hashim 2014).

Mikrofabrikasyon teknolojisinin avantajlarından biri biyosensörleri minyatürize edebilmeleridir. Nano-boyuttaki elektronik parçaların gelecekte ticari biyosensörlerin gelişmesinde önemli bir rol oynayacağı düşünülmektedir. Biyosensörler hassas, duyarlı ve kararlı olmalarından dolayı, medikal uygulamalardaki kullanımları önümüzdeki yıllarda yaygınlaşacaktır (Sadana ve Sadana 2011).

Biyosensörler, farmakoloji ve moleküler biyoloji alanında da kullanılmaktadır. Hastalıkların teşhisinde rol oynayan biyolojik moleküllerin tayini için işaretlemeye gerek olmayan biyosensörler geliştirilmektedir. Ayrıca ilaç geliştirme programlarında da biyosensörler kullanılmaktadır (Morrow 2008).

Biyosensörlerin bir diğer avantajı da eş zamanlı görüntülemeye olanak vermeleridir. Örneğin; hasta takibinde, özellikle savaş durumunda kimyasal ve biyolojik silahlara maruz kalan kişilerin takibinde, endüstriyel üretimlerin takibinde biyosensörler kullanılmaktadır.

Biyosensörler duyarlılık, seçicilik, cevap süresi, kullanım kolaylığı, tekrarlanabilirliği, dayanıklılığı, tayin süresi ve tayin sınırı gibi özelliklerinden dolayı diğer analitik yöntemlere göre avantajlıdır (Sadana ve Sadana 2011).

Elektrokimyasal immünosensörler düşük maliyet, hızlı ölçüm yeteneği ve portatif olmalarından dolayı ELISA gibi yöntemlere alternatif olarak kullanılmaktadır (Heineman and Halsall 1985). Enzim bağlı amperometrik biyosensörler hızlı cevap ve yüksek duyarlılıklarından dolayı biyomoleküllerin tayininde iyi bir metottur (Darain ve ark. 2003).

#### **2.4.2. UA için hazırlanan sensörler**

UA derişiminin tayininde biyosensörlerin kullanıldığı yeni yöntemler geliştirilmiştir. Bu metotların temeli enzimatik reaksiyonlara ya da diğer analitik metotlarda kullanılan benzer reaksiyonlara dayanmaktadır. Bu yöntemde, membran yüzeyine enzim süspansiyonu immobilize edilmektedir (Perello ve ark. 2005).

Nanjo ve Guilbault (1974) tarafından yapılan bir çalışmada, immobilize ürikaz ile kaplanmış platin elektrot kullanılmış, UA'in enzimatik degradasyonu esnasında çözünmüş oksijen miktarındaki azalmanın doğrudan ölçülmesiyle ortamdaki UA derişimi tayin edilmiştir. Tayin limiti % 8 mg olarak bulunmuştur. Askorbik asit (AA), sistein, sistin, metiyonin, tirozin ve albuminin girişim etkisi incelendiğinde AA ve sisteinin UA tayinini etkilediği, UA'in ölçümünden önce oksitlendikleri, diğer moleküllerin ise çok belirgin bir girişim etkisinin olmadığı belirtilmiştir (Nanjo ve Guilbault 1974).

Miland ve arkadaşları (1996) tarafından geliştirilen biyosensör sisteminde, karbon pasta içine herhangi bir elektron transferi gerçekleştirecek mediyatör olmadan ürikaz ve



karaturp peroksidazı (HRP) immobilize edilmiştir. Elektrodun çalışma prensibi, UA varlığında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in indirgenmesi esasına dayanmaktadır. Çalışma elektrodunun modifiye yüzeyinde karbon pastaya ko-immobilize olmuş ürikaz ve HRP ve bu sisteme eklenmiş poli(*o*-aminofenol) bulunmaktadır. Polimer tabakanın yarı-seçici karakteristik özellikleri siklik voltametri ile karakterize edilmiş, tayin limiti 3 µM olarak bulunmuştur. AA ve bilirubinin girişim etkisi incelenmiş, sinyal şiddetinde AA için % 15 artma gözlenirken, bilirubin için % 35 azalma gözlenmiştir. Bu sorunun serum örneklerinin seyreltilmesiyle giderilebileceği umulmaktadır (Miland ve ark. 1996).

Biyolojik sıvılarda UA tayini için ürikaz-peroksidaz sisteminin ve amplex kırmızısının birlikte enkapsüle edildiği sol-jel matris sistemleri, floresans biyosensörler olarak kullanılmıştır. Bu yöntemde kimyasal kullanılmamaktadır. Tayin limitinin 20 nM olduğu sistemde AA girişimini idrar örneğinin 50 000, serum ve kan örneklerinin ise 10 000 kat seyreltilmesiyle ihmal edilebilir seviyelere geldiği rapor edilmiştir (Martinez-Perez ve ark. 2003).

Chen ve arkadaşları tarafından 2010 yılında yapılan bir başka çalışmada, endojen (hücre lizati) ve fizyolojik (serum) örneklerde UA tayinine yönelik elektrokimyasal yaklaşım geliştirilmiştir. Bu yaklaşım enzimatik reaksiyon sonucu oluşan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in elektrokatalitik indirgenmesi esasına dayanmaktadır. Tionin-tek duvarlı karbon nanotüp (Th-SWNTs) nanoyapıların mediyatör ve enzim immobilizasyon matrisi olarak kullanıldığı ürikaz-tionin-tek duvarlı karbon nanotüp/camsı karbon (UO<sub>x</sub>-Th-SWNTs/GC) biyosensörü dizayn edilmiştir. Tayin limitinin 0,5 µM olduğu biyosensör sisteminde AA, 3,4-dihidroksifenilasetik asit, 4-asetamidofenol ve glukozun girişim etkisi araştırılmış fakat bu moleküllerin herhangi bir girişim yapmadığı gözlenmiştir (Chen ve ark. 2010).

Çinko oksit nanotellere ürikaz immobilizasyonu ile üretilen potansiyometrik UA biyosensörü, UA'in potansiyometrik olarak belirlenmesinde kullanılmıştır. Tayin limitinin 1 µM olduğu sistemde girişimci olarak AA, üre ve glukoz kullanılmış, bu moleküllerin varlığında sensör sinyalinde az bir artışın olduğu gözlenmiştir (Ali ve ark. 2011).

Yapılan bir başka çalışmada, UA tayinine yönelik sandviç tipi amperometrik biyosensör geliştirilmiştir. Elektrokatalizör olarak kobalt fitalosiyenin (CoPC) kullanılan sistemde selüloz asetat ve polikarbonat membran arasına ürikaz enzimi yerleştirilmiştir. Tayin limiti 0,015 mM olarak bulunmuştur (Kanyong ve ark. 2012).

Elektrokemiluminesans (ECL) esasına dayalı biyosensörün tasarlandığı bir başka çalışmada, enzim immobilizasyonu için matriks olarak polipirol kullanılmış ve luminolün sinyalinde yararlanılmıştır. Ürikaz katalizörlüğünde gerçekleşen reaksiyonda UA'in oksidasyonu sonucu potasyum ferrisiyanid yükseltgenirken allontoin, CO<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluşmaktadır. Katalitik olarak verimli olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> luminolün elektrokemiluminesansını arttırmakta, böylece ortamdaki UA derişimi belirlenebilmektedir. Bu çalışmada tayin limiti 75 pM olarak belirlenmiştir (Chu ve ark. 2012).

Prussian mavisi ile modifiye edilmiş elektrot temeline dayanan ürikaz biyosensöründe, siklik voltametri ve kronoamperometri ölçümleri birlikte alınmıştır. Tayin limiti 0,01 mM olarak hesaplanmıştır (Piermarini ve ark. 2013).

İnsan vücut sıvılarında UA ölçümü için birçok metot çalışılmıştır. UA'in ölçümünde ürikaz (Steele 1969, Zhao ve ark. 2009) ve fosfotungstat (Henry ve Sobel 1957) metotlarının kullanıldığı enzimatik yaklaşımlar, plazma ve idrardaki UA derişimlerine odaklanmış fakat 0,1 mg/dL'den daha düşük seviyeleri ölçememiştir (Cook ve ark. 1970). Enzimatik metotların kullanıldığı UA teknikleri, metallerin varlığından etkilenmektedir. Enzimatik olmayan metotlar bulanıklık ya da aspirin, AA, glutatyon, parasetamol gibi birçok antibiyotiğin varlığından etkilenmektedir (Itiaba ve ark. 1975). UA derişiminin belirlenmesinde elektrokimyasal metotlar da kullanılmaktadır. Fakat biyolojik örneklerde AA ve dopamin varlığı da girişime yol açabilmektedir (Strochova ve ark. 1997, Kachoosangi ve ark. 2006, Popa ve ark. 2000). Bu durum, serum ve idrarda AA ve dopamin gibi bileşiklerin varlığında bile seçici UA tayini yapılabilmesi için, elektrokimyasal metotların gelişmesine sebep olmaktadır (Hason ve ark. 2009, Zheng ve ark. 2009, Kannan ve ark. 2009).

Biyouyumlu nanomateryaller, enzim ve elektrot arasında direkt elektron transferi esasına dayanan üçüncü-jenerasyon biyosensörlerin gelişiminde yeni bir yaklaşım olmuştur. UA tayini için farklı amperometrik biyosensörlerin hazırlanması için birçok çalışma mevcuttur. Bu sensörlerde ürikaz enzimi poli-anilin kaplı Pt elektrot, Ir-modifiye karbon elektrot, polipirol film kaplı Pt yüzey, ZnO nanoçubuk modifiye camsı karbon elektrot, polipirol ve polianilin ve polianilin/karboksillenmiş çok duvarlı karbon nanotüp (c-MWCNTs) kaplı indiyum kalay oksit (ITO)-kaplı cam plakalar gibi birçok farklı elektrot yüzeyine immobilize edilebilmektedir. Altın nanopartiküller (AuNPs) özellikle elektrokimyasal ölçüme dayalı biyosensörler için ideal malzemelerdir. Bunun sebebi Au yüzeyinin biyomoleküllerin bağlanması için uygun olması ve metalin direkt ve hızlı elektron transferini kolaylaştırmasıdır. Altın nanopartiküllere proteinlerin immobilizasyonu pratik uygulamalarda, özellikle de biyo-işaretleme ve biyo-ölçümlerde önemlidir (Chauhan ve Pundir 2011).

Elektro-polimerizasyon tekniğiyle camsı karbona modifiye edilmiş 2,2-bis(3-amino-4-hidroksifenil) heksafluoropropan (BAHHFP) elektrodu dopamin (DA) ve UA'in birlikte analizinde kullanılmıştır. Diferensiyel puls voltametri yöntemiyle alınan ölçümlerde, DA için tayin limiti 5 nM olarak bulunurken, UA için hassas ölçümün yalnızca asidik çözeltide (pH: 1,8) olabileceği ve tayin limitinin 0,1 µM olduğu rapor edilmiştir (Milczarek ve Ciszewski 2004).

Mezoporöz SiO<sub>2</sub> modifiye edilmiş karbon pasta elektrotun kullanıldığı elektrokimyasal sensör sisteminde AA, UA ve ksantin (XA) eş-zamanlı ölçümünde dedeksiyon limitleri sırasıyla  $3.0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>,  $1.0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> ve  $7.5 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur (Sun ve ark. 2009).

Biyoanalitik sensörlerin dizaynında iletken polimerlerin kullanımı oldukça yaygındır. 2010 yılında Atta ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada AA, DA ve UA'in birlikte ölçümünde paladyum (pD) nanosalkım (nanoclusters) (Pd<sub>nano</sub>) takılı poli(N-metilpirol) (PMPy) film kaplı platin (Pt) elektrot tasarlanmış ve diferensiyel puls voltametri ile alınan ölçümlerde AA, DA ve UA için tayin limiti sırasıyla 7 µM, 12 nM ve 27 nM olarak bulunmuştur (Atta ve ark. 2010).

2011 yılında yapılan bir başka çalışmada, UA tayini için ürikaz enzimi altın nanopartikül (AuNP)/çok-duvarlı karbon nanotüp (MWCNT) yüzeye immobilize edilerek amperometrik biyosensör geliştirilmiştir. Tayin limiti 0,01 mM olan biyosensör serum örneklerinde UA belirlenmesi için kullanılmış ve sisteme glukoz, kolesterol, üre, piruvat, bilirubin gibi moleküllerin (1 mM) herhangi bir girişime sebep olmadığı fakat AA'in fizyolojik derişimde (3,4 mM'da % 7 inhibisyon) girişimde bulunduğu ve bu girişimin de aktivitede % 56'lık bir düşüğe neden olduğu rapor edilmiştir (Chauhan ve Pundir 2011).

AA girişimini ortadan kaldırmak için Huang ve arkadaşları (2012) tarafından geliştirilen Cu(II)-polidopamin immobilize elektrotun elektrokimyasal ölçümleri siklik voltametri ile yapılmış ve 5 mM AA varlığında tayin limitini 24,6 µM olarak bulunmuştur (Huang ve ark. 2012).

Niu ve arkadaşları tarafından 2012 yılında yapılan bir başka çalışmada, DA, UA, guanin (G) ve adenin (A) biyomoleküllerinin birlikte belirlenmesi için üç-boyutlu dağılmış Au nanopartikül (GNP)-modifiye camsı karbon elektrotun (GCE) kullanıldığı diferensiyel puls voltametri tekniği kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre DA, UA, G ve A analitleri için dedeksiyon limitleri sırasıyla  $2.0 \times 10^{-10}$  M,  $8.0 \times 10^{-9}$  M,  $5.0 \times 10^{-10}$  M ve  $4.0 \times 10^{-9}$  M bulunmuştur (Niu ve ark. 2012).

2012 yılında Bi ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada, elektrokimyasal özelliklerinin iyi olması, elektriği iyi iletmeleri ve biyolojik moleküllere uyumlu olmaları nedeniyle elektrokimyasal sensörlerde kullanım alanı gün geçtikçe artan çok-duvarlı karbon nanotüplerin (MWCNT) yüzeyindeki fonksiyonel grupların etkisinin araştırılması için AA, DA ve UA'in birlikte analiz edildiği dört farklı MWCNT sentezlenmiştir. Pristin-MWCNT (MWCNT-P), asitlendirilmiş MWCNT (MWCNT-T), karboksil içeren MWCNT (MWCNT-COOH) ve hidroksil içeren MWCNT (MWCNT-OH) hazırlanmış ve karşılaştırılmıştır. Modifiye elektrotların elektrokimyasal özelliklerinin belirlenmesi için siklik voltametri (CV) ve diferansiyel puls voltametri (DPV) yöntemleri kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, dedeksiyon limitleri AA, DA ve UA için sırasıyla MWCNT-T için; 10 µM, 0,05 µM, 1 µM, MWCNT-COOH için 10 µM, 0,5 µM, 10 µM ve MWCNT-OH için 50 µM, 1 µM ve 50 µM olarak bulunmuştur. MWCNT-P

için elde edilen değerler diğer üç elektrotla kıyaslandığında oldukça düşük bulunmuştur. Karboksil grubu elektrokatalitik performansı arttırırken, hidroksil grubu AA, DA ve UA içeren elektrolitik çözeltilerde istenen bileşikleri seçici olarak belirleyememektedir (Bi ve ark. 2012).

UA derişiminin belirlenmesi için basit ve hızlı metodların geliştirilmesi uzun yıllardan beri ilgi çekici bir konudur (Roy ve ark. 2004, Ren ve ark. 2006). Araştırılan yöntemler arasında, UA derişiminin elektrokimyasal olarak belirlenmesi kolorimetrik ya da spektrofotometrik metodlara göre daha ucuz ve kısa süreli olsa da, idrarda UA'in doğrudan elektrokimyasal sensörler ile belirlenmesi düşük seçicilik nedeniyle hala problemdir (John 2005, Zare ve ark. 2005). İdrardaki diğer bileşiklerin UA'in redoks potansiyeline yakın olduğu bilinmektedir. Bu nedenle bu bileşikler girişim etkisi yapmaktadır. Örneğin, idrarda UA ve AA birlikte bulunur ve yükseltgenme potansiyelleri yakındır (Ernst ve Knoll 2001). Bu nedenle UA derişimi AA varlığında elektrokimyasal yöntemlerle seçici bir şekilde belirlenememektedir. Öte yandan, UA'in düşük derişim düzeylerinde belirlenebilmesi oldukça önemlidir. Elektrokimyasal UA sensörleri için uzun ömürlü ve kararlı elektrotların geliştirilmesinin yanı sıra basit, hassas ve etkili sensör sistemleri de geliştirmek gerekir (Wei ve ark. 2008).

Çizelge 2.4.2.1'de UA tayini için kullanılan bazı sensör sistemleri ve tayin limitleri verilmiştir.

**Çizelge 2.4.2.1.** UA tayini için kullanılan bazı sensör sistemleri ve tayin limitleri

<b>Dedeksiyon Sistemi</b>	<b>Elektrot</b>	<b>Tayin Limiti (LOD)</b>	<b>Referans</b>
CV	Poli(bromokresol moru) modifiye camsı karbon elektrot	0,2 µM/L	Wang ve Tong 2010
DPV	Altın nanopartikül/kolin (GNP/Ch) kaplı camsı karbon elektrot	0,6 µM	Wang ve ark. 2007
DPV	Poli(sulfanazo III) modifiye camsı karbon elektrot	0,11 µM	Ensafi ve ark. 2010
CV	Kil-modifiye elektrot	0,2 µM	Zen ve Chen 1997
CV	Çok-duvarlı karbon nanotüp-kitosan/poli(amidoamin)/DNA nanokompozit modifiye altın elektrot	0,03 µM	Liu ve ark. 2011
LSV	Nafion-kaplı camsı karbon elektrot	10 nM	Zen ve ark. 1998
DPV	Bakır kaplı camsı karbon elektrot	10 nM	Selvaraju ve Ramaraj 2007
DPV	Poli(vinil alkol) modifiye edilmiş camsı karbon elektrot	0,6 µM	Li ve Lin 2006
CV	Poli(N,N-dimetilanilin) film kaplı camsı karbon elektrot	1,25 µM	Roy ve ark. 2004
SWV	Kendiliğinden oluşan tek tabaka (SAM) merkaptobenzimidazol (MBI) modifiye altın elektrot	1 µM	Raj ve Ohsaka 2003

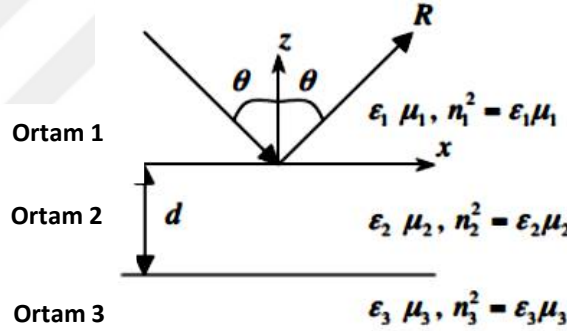
\* CV: siklik voltametre, DPV: diferansiyel puls voltametresi, LSV: doğrusal süpürme voltametresi, SWV: kare dalga voltametresi

## 2.5. YüzeY Plazmon Rezonans (SPR)

### 2.5.1. Teori

Uzun yıllardan beri bilinen yüzeY plazmon rezonans olgusu, kimyasal sensörlerde ve dolaylı ölçüm sistemlerinde kullanılmaktadır. *p*-Polarize (transvers manyetik, TM) yansıtılmış ışık, geliş açısında derin bir çukura sebep olur. Bunun sebebi metal ve yığın materyali arasındaki yüzeY plazmonunun yayılım sabitinin yüzeY boyunca görülen yayılım sabiti ile hemen hemen aynı olmasından kaynaklanmaktadır. Bu rezonans optik frekanslarda altın ya da gümüş gibi bir metalin negatif dielektrik sabiti yüzünden meydana gelmektedir.

### 2.5.2. YüzeY plazmon rezonans sensör için genelleştirilmiş formüller



Şekil 2.5.2.1. Düzlemsel dalga oluşumu

Düzlemsel dalga,  $\epsilon_1$  ve  $\mu_1$ 'in bulunduğu ortam 1'de gerçekleşmektedir,  $\epsilon_2$  ve  $\mu_2$  tabaka halinde bulunmaktadır ve  $\epsilon_3$  ve  $\mu_3$ 'ün bulunduğu ortam 3 nedeniyle sınırlandırılmıştır. Buradaki  $\epsilon$  ve  $\mu$  serbest boşluk  $\epsilon_0$  ve  $\mu_0$ 'ün normalize edilmiş göreceli dielektrik sabiti ve göreceli geçirgenlik değerleridir. Yansıma sabiti olarak bilinen R'nin formülü Eşitlik 2.5.2.1'deki gibidir.

$$R = \frac{A + B/Z_3 - Z_1(C + D/Z_3)}{A + B/Z_3 + Z_1(C + D/Z_3)} \quad (2.5.2.1)$$

Burada;

$$A = D = \cos k_{z2} d, \quad B = jZ_2 \sin k_z d, \quad C = \frac{j \sin k_{z2} d}{Z_2}$$

$$k_{zi} = \sqrt{k_i^2 - (k_i \sin \theta_1)^2}, \quad i = 1,2,3, \quad k_i = k_0 n_i$$

$$k_0 = \omega/c$$

$$Z_i = \begin{cases} \frac{k_{iz}}{\omega \epsilon_0 \epsilon_i} & p - \text{polarize ışık için } (E_x, E_z, H_y) \\ \frac{\omega \mu_0 \mu_i}{k_{zi}} & s - \text{polarize ışık için } (H_x, H_z, E_y) \end{cases}$$

Bu formülde,  $\epsilon_i$  ve  $\mu_i$  komplekstir. Buna rağmen, pasif ortam için  $\exp(j\omega t)$  kullanılır:

$$\text{Im}(\epsilon_i) < 0$$

$$\text{Im}(\mu_i) < 0$$

$$\text{Im}(n_i) < 0$$

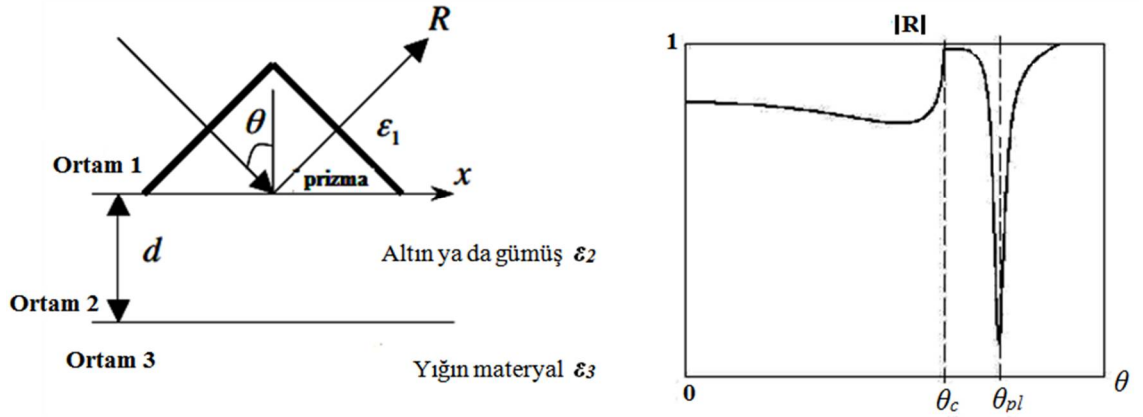
$$\text{Im}(k_{zi}) < 0$$

$$\text{Re} \sqrt{\mu_i/\epsilon_i} > 0 \quad (2.5.2.2)$$

### 2.5.3. Optik yüzey plazmon rezonans sensörü

$\epsilon_1$  ve  $\mu_1$ 'in bulunduğu prizma,  $\epsilon_2$  ve  $\mu_2$ 'nin bulunduğu ince metalik tabakaya sahiptir ve bu prizma bir ortama yerleştirilir.  $p$ -Polarize (TM) tabaka plazmadan geçirilir ve kırılan dalga açısı ve frekans fonksiyonlarına göre ölçülür. Geleneksel yüzey plazmon sensörü için,  $\mu_1=\mu_2=\mu_3=1$ 'dir.





**Şekil 2.5.3.1.** Yüzey plazmon geometrisi ve geleneksel optik yüzey plazmon sensörünün yansımaya sabiti  $\epsilon_1 = 2.25$ ,  $\epsilon_2 = -10 - j0.1$ ,  $\epsilon_3 = 1.75$ ,  $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = 1$ ,  $d = 0.05 \mu\text{m}$ ,  $\lambda = 0.6 \mu\text{m}$

Şekil 2.5.3.1’de yansımaya sabiti  $R$ ’nin durum açısının bir fonksiyonu olduğu gösterilmektedir. Genellikle altın ya da gümüş olan metal tabakanın, optik frekansta  $\epsilon_2$ ’nin negatif gerçekte bölümü,  $\theta_c$  ve  $\theta_{pl}$  olmak üzere iki açısı vardır. Bu açılar materyalin yapısına yakından bağlıdır.  $\theta_c$  açısı ortam 1 ve ortam 3 arasındaki toplam yansımaya açısına yakındır.

$$n_1 \sin \theta_c = n_3 \quad (2.5.3.1)$$

Ortam 2 ve ortam 3 arasındaki yayılma sabitiyle yüzey boyunca ilerleyen dalgaya ait yayılma sabitine yakın olduğu zaman  $\theta_{pl}$  açısı aşağıdaki gibidir.

$$k_o n_1 \sin \theta_{pl} = k_{sp} = k_o S \quad (2.5.3.2)$$

Yüzey dalgasının yayılma sabiti;

$$S^2 = \frac{\epsilon_2 \epsilon_3}{\epsilon_2 + \epsilon_3} \quad (2.5.3.3)$$

$\theta_{pi}$ 'deki keskin çukur  $\epsilon_3$ 'ün belirlenmesinde kullanılır. *s*-polarizasyon için herhangi bir yüzey plazmonu oluşmaz.

#### 2.5.4. Yüzey plazmon rezonans sensör

Yüzey plazmon rezonans (SPR) olgusu ilk olarak 1902 yılında Wood tarafından gözlemlenmiştir. Wood, polarize ışığı bir kırınım düzenleyici yüzeyden bir ayna üzerine yansıttığı zaman, yansıyan ışıkta aydınlık ve karanlık bantlar gözlemlenmiştir (Wood 1902, Wood 1912). Daha sonraki yıllarda Lord Rayleigh (1907) ve Fano (1941), bu teorinin gelişimine katkıda bulunmuşlar fakat en önemli gelişme 1968 yılında Otto tarafından rapor edilmiş (Otto 1968), buna rağmen biyomoleküler etkileşim uygulamaları ancak 1990 yılında Biacore © (GE Healthcare) tarafından geliştirilmiştir (Owen 1997).

Yüzey plazmon polaritonları (SPP) elektromanyetik (EM) biçimde bulunabildiği gibi, altın ve gümüşte olduğu gibi metal yüzey ile ışığın etkileşiminden kaynaklanan salınımlar şeklinde de olabilmektedir (Otto 1968). Enine manyetik (transvers manyetik, TM) dalgalar olan SPP'ler, böylece negatif ve pozitif dielektrik sabitine sahip materyaller (metal/dielektrik tabaka vb.) arasındaki ara yüzey boyunca ilerleyebilmektedir. Drude modeline göre, SPP'nin dağılım ilişkisi ( $\beta=K_{sp}$ ; salınımların dalga vektörü) şu şekilde açıklanmaktadır (Daghestani ve Day 2010):

$$\beta = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_m \epsilon_d}{\epsilon_m + \epsilon_d}} \quad (2.5.4.1)$$

$\beta$ : salınımların dalga vektörü ( $K_{sp}$ )

$\omega$ : salınım frekansı

$c$ : vakumdaki ışığın hızı

$\epsilon_m$  ve  $\epsilon_d$ : metal ve dielektrik materyalinin dielektrik sabitleri

Gelen ışığın bir bileşenine ait dalga vektörü ise şu şekilde tanımlanır:

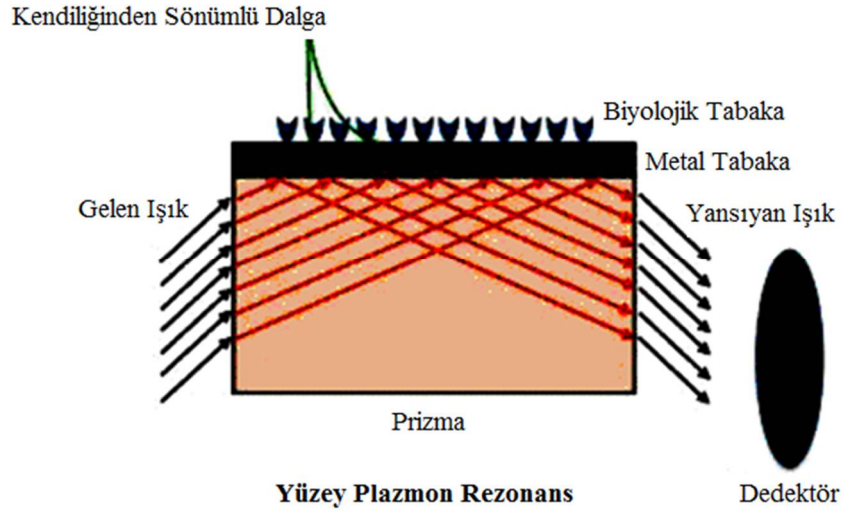
$$K_x = \frac{\omega}{c} \eta_p \sin \theta \quad (2.5.4.2)$$

$\theta$ : ışığın metal film yüzeyine geliş açısı

$\eta_p$ : prizmanın kırılma açısı

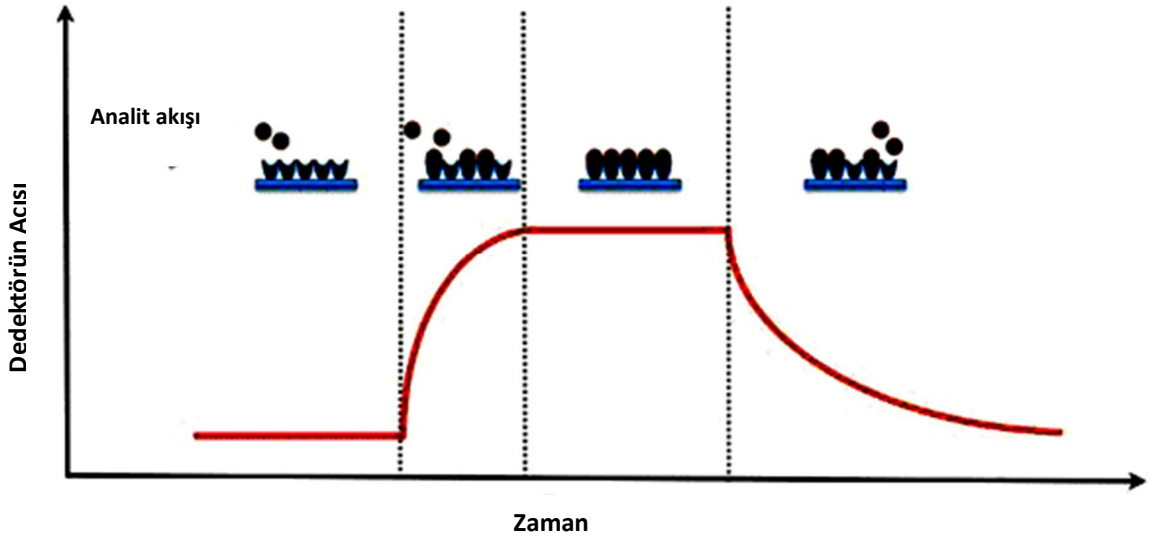
Metal yüzeye uygun  $p$ -polarize ışık metal film ile birleşmek ve yüzeyde plazmonlar oluşturmak için prizmanın içerisine girer. SPR'de  $p$ -polarize ışığın kullanılmasının nedeni, yalnızca bu ışığın uygun elektrik alan vektör salınımına sahip olmasıdır. Bu özellik, metal yüzeydeki elektron plazmonlarının enine manyetik (TM) dalgası adını almaktadır.  $s$ -Polarize enine elektrik (TE) polarizasyonunun yüzey plazmonu oluşturamamasının nedeni ise  $s$ -polarize ışığın elektrik alan vektörünün metal filme paralel olmasıdır.

SPR yönteminde geçirgen ve farklı kırılma indislerine sahip iki ortam arasında ince bir metal film (genellikle altın ya da gümüş) kullanılmaktadır. Kritik bir açının üzerindeki düzlemsel polarize ışık, kırılma indisi daha yüksek olan başka bir ortama girdiğinde toplam iç yansımaya uğrar. Bu durumda kendiliğinden sönümlü dalga (evanescent wave) denilen ışık, metal filmin içine girerek metal yüzeyinde bulunan serbest elektronların yüzey plazmonları oluşturmaya neden olur, böylece yansıyan ışığın yoğunluğu düşer. Yüzey plazmon rezonans sensörün çalışma prensibi Şekil 2.5.4.1'te şematik olarak gösterilmektedir. Bu olay belli bir açıda (rezonans açısı) gerçekleşir ve yüzey plazmon rezonans olarak adlandırılır. Yüzeye herhangi bir madde bağlandığında rezonans açısı değiştiği için, modifikasyon sonucu seçici hale getirilen yüzey, SPR biyosensörlerinin gelişmesinde önemli bir rol oynamıştır (Ertürk 2010).



**Şekil 2.5.4.1.** Yüzey plazmon rezonans sensörün şematik gösterimi (Kretchmann konfigürasyonu)

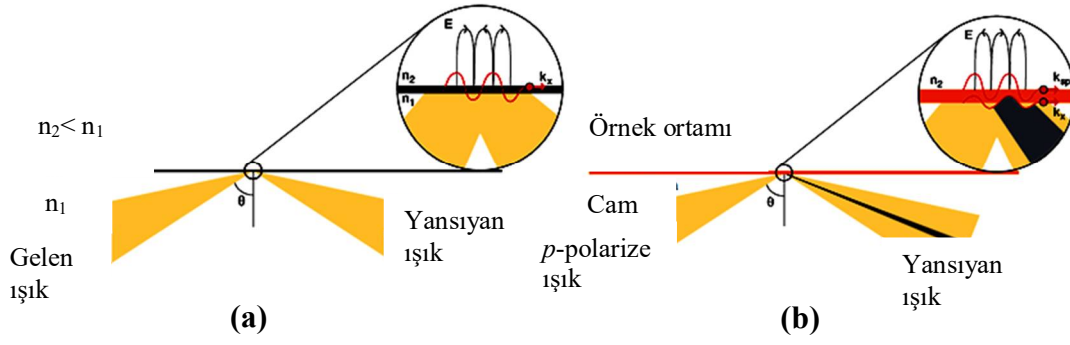
SPP'nin elektromanyetik alanı hem metal hem de dielektrik ortamda azalır, metaldeki artan sönümden dolayı en fazla elektromanyetik alan dielektrik ortamda gerçekleşir (Novotny ve Hecht 2006). Sonuç olarak, dispersiyon fonksiyonunun gerçek kısmı oldukça hassastır ve refraktif indeksteki değişim ile orantılı olarak değişmektedir (Homola 2003). SPR'nin ilkesi yalnızca ışığın dalga vektörü bileşeninin metal yüzeye paralel gelerek SPP ile eşleşmesi halinde oluşmasıdır. Bu durum sadece ışığın yansımada bir düşüş olarak görülen farklı geliş açılarında karşılaşılr (Novotny ve Hecht 2006, Homola 2003). SPR biyo-ölçümü dielektrik algılama yüzeyindeki herhangi bir değişimin yol açtığı kırılma açısının değişimi ilkesine ve bu olayın bir dedektör ile belirlenmesine dayanır (Şekil 2.5.4.2).



Şekil 2.5.4.2. SPR’de bağlanma olaylarının belirlenmesi

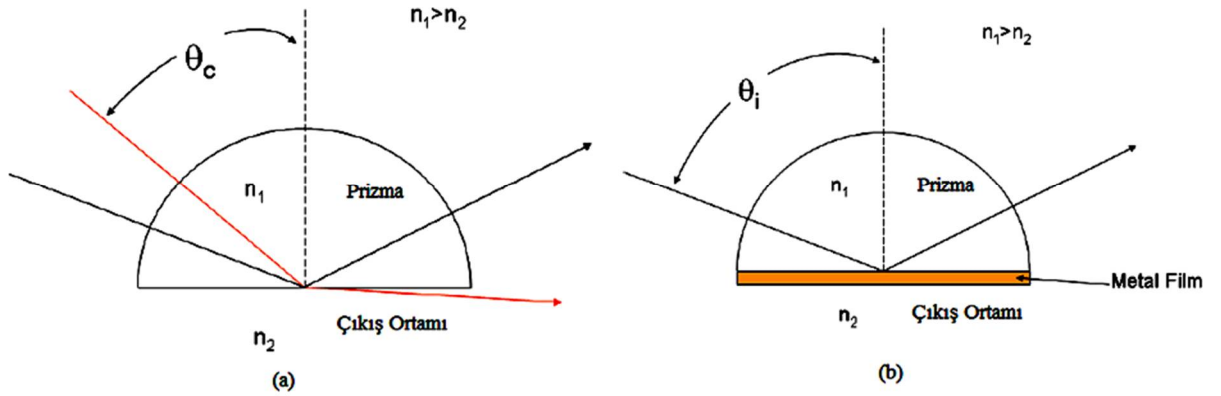
Şekil 2.5.4.2’de SPR sisteminde sensorgramın oluşumu şematize edilmiştir. Analit moleküler tanıma bölgesi üzerinden geçer ve substrata bağlanır, doyumluğa ulaşıp tüm bağlanma bölgelerinin dolması ile rezonans koşullarındaki yansımaya açısı değişir. Analitin yüzeyden desorbe edilmesiyle açı tekrar başlangıç noktasına döner (Daghestani ve Day 2010).

Otto’nun geliştirdiği ve kendi ismi ile anılan konfigürasyondan başka prizma eşleme (Kretschmann konfigürasyonu; aynı zamanda azalmış total yansımaya (ATR) olarak da adlandırılır) (Homola 2003, Kretschmann 1971), dalga eşleme (Harris ve Wilkinson 1995), kafes eşleme (Yu ve ark. 2004) ve fiber optik eşleme (Marazuela ve Moreno-Bondi 2002) gibi farklı konfigürasyonlar da mevcuttur. En yaygın kullanılan konfigürasyon Kretschmann konfigürasyonudur. Bu konfigürasyonda ışık yüksek yansımaya indeksiyle prizmadan geçer ve metal/prizma sınırında ışığın yansımaya yol açar. Total iç yansımaya (TIR) kendiliğinden sönümlü dalga (evanescent wave) oluşturarak ince metal tabakanın içine nüfuz eder ve metal/prizma ara yüzeyinde yayılır (Daghestani ve Day 2010).



**Şekil 2.5.4.3. (a)** Absorplamanın olmadığı ortamdaki TIR açısı ve **(b)** absorplamanın olduğu ortamda oluşan kritik açı

Şekil 2.5.4.3 (a)'da absorplamanın olmadığı, ışığın tamamen geriye yansıdığı ortamdaki TIR açısı gösterilmiştir. Yüksek refraktif indeksli ortamdaki yayılan gelen ışık daha düşük refraktif indeksli ara yüzey ile karşılaştığında gelen ışığın açısında bir kayma olur ve bu açıya kritik açı denir. Işık tümüyle ara yüzeyden geri yansır ve tekrar yüksek refraktif indeksli ortama geri döner. Plazmon dalgasının dalga vektörü iletken yüzeye bağlandığında, gelen ışığın bileşeninin dalga-vektörü iletken yüzeye paraleldir ve yüzey plazmonlarının dalga-vektörüne eşittir (Şekil 2.5.4.3 (b),  $k_{sp}$  ve  $k_x$ ).

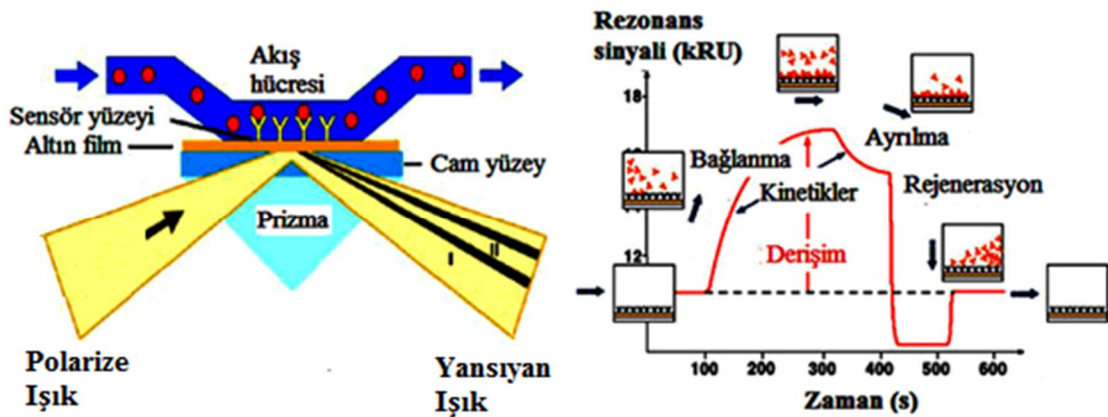


**Şekil 2.5.4.4. (a)** Prizma iç yüzeyindeki total iç yansımaya (TIR) ve **(b)** prizma eşleme konfigürasyonu kullanılan SPR

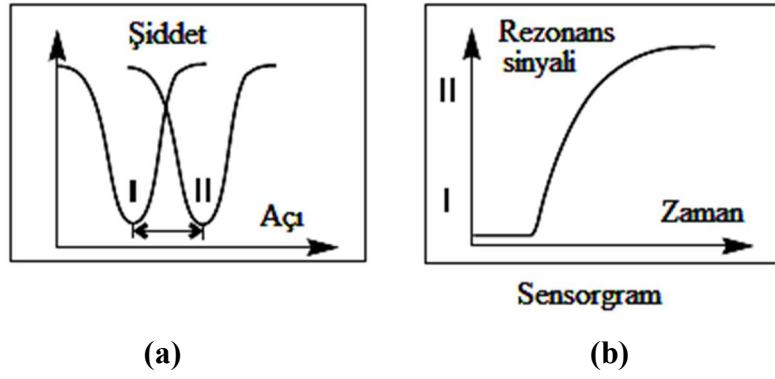
Şekil 2.5.4.4 (a)'da gösterildiği gibi total iç yansımaya öncelikle ara yüzeye girmelidir. TIR, gelen ışığın kritik açıya ( $\theta_c$ ) azalmasına dek oluşmaktadır. Bu açıda bir miktar ışık ara yüzeyden dışarıya geçer. Bu noktada ara yüzeydeki yansımaya, kaybolan alan (standing wave) çıkış ortamına nüfuz eder ve gelen ışığın dalgaboyunda  $\frac{1}{4}$  oranında düşüş yaşanır. Eğer ara yüzeye Şekil 2.5.4.4 (b)'deki gibi yarı-saydam soy metal film yerleştirilirse total

iç yansıma koşulları altında yüzey plazmon rezonans olayı gerçekleşir. Bu tasarım Kretschmann konfigürasyonu olarak bilinmektedir (Nomadics, Inc.).

SPR'nin en yaygın kullanıldığı ölçüm alanları protein-ligand (Junk ve ark. 2000), protein-protein (Karlsson ve Falt 1997) ya da nükleotid etkileşimi (Moon ve ark. 2010) olaylarıdır. Biyolojik moleküllerin doğrudan yüzeye birikiminin avantajlı olmaması nedeniyle, özellikle gümüş veya altın gibi inert metallerin yüzeyleri kullanılmaktadır. Yüzeyler daha işlevsel hale getirilerek daha iyi bağlanma sağlanır ve spesifik olmayan bağlanmalar engellenmiş olur. Şekil 2.5.4.5'te SPR biyo-ölçüm için (a) cihazın temel bileşenleri ve (b) tipik bir SPR biyo-ölçüm deneyi gösterilmiştir. Şekil 2.5.4.5 (a)'da altın ile kaplanmış cam yüzeyi prizma üzerine yerleştirilir. Işık, prizma ve cam yüzeyden doğrudan geçerken altın yüzeyden yansımaz ve prizmadan dedektöre geri yansır. Yansımaya karşı açı ya da yansımaya karşı dalga boyundaki değişiklikler, yüzeye bağlanan biyomoleküllerin oranına göre değişmektedir. Akış hücresi altın yüzey üzerindeki çözeltilerin hızlıca değişmesine olanak sağlar. Şekil 2.5.4.5 (b)'de tipik bir SPR sensör deneyi gösterilmektedir. Tanımayı gerçekleştirecek molekül immobilize edilmiş altın yüzeyden 0 anında tampon çözelti geçirilmiştir. 100. s'de analiti içeren çözelti geçirilmiştir, 300. s'de ise akış hücresinden tekrar tampon çözelti geçirilmiştir. 420-520 s aralığında ise yüzey rejenere edilmiştir (Nomadics, Inc.).



Şekil 2.5.4.5. (a) SPR biyo-ölçüm için cihazın temel bileşenleri ve (b) tipik bir SPR biyo-ölçüm deneyi



**Şekil 2.5.4.6.** Bir SPR sensorgramın oluşması (a) SPR açısındaki kayma, (b) sensorgram

Sensör çipin yüzeyine bağlanan örnek derişiminin artmasına bağlı olarak refraktif indeks artar ve SPR açısı adı verilen bir açı oluşur. Yansıma şiddetindeki keskin düşüş dedektörün pozisyonunda değişliğe neden olur ve bu değişim SPR açısı olarak okunur. Yüzeyde meydana gelen kinetik olayların (bağlanma-ayrılma) zamana bağlı okunması sensorgram olarak gösterilir (Şekil 2.5.4.6).

SPR-temelli biyosensörler, biyomoleküllerin etkileşimlerini herhangi bir işaretleme gereksiz olmadan ölçebilirler. Bu özelliğinden dolayı SPR sensörler moleküler etkileşimlerin incelenmesinde önemli analitik cihazlar haline gelmiştir. SPR sistemi etkileşimlerin eş zamanlı ölçümünde, kinetik ve termodinamik parametrelerin belirlenmesinde, derişimin ölçülmesinde veya ligant ile analitler arasındaki etkileşimlerin belirlenmesinde kullanılmaktadır. SPR-temelli biyosensörler hızlı cevap süresi ve yüksek duyarlılıklarından dolayı enzim ya da radyo-ışaretleme metotları gibi diğer teknolojiler ile kıyaslandığında düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin belirlenmesine olanak sağlar (Wolfbeis 2006). SPR-temelli biyosensörlerin diğer biyosensör sistemlerine göre bazı avantajları mevcuttur.

SPR sensörler işaretleme yapılmayan dedektör kullanımı sağladığı için moleküler etkileşimlerin karakterizasyonu açısından avantajlıdır. Aynı zamanda otomatik sistemlere olanak sağlayan mikro-akışkan örnek verme sistemi mevcuttur. Sistemin çalışma prosedürü kolay ve pratiktir. Bağlanma özgülüğü (moleküllerin hedef analite bağlanması), kinetik hızlar (etkileşimlerin hızı), afinite sabitleri (etkileşimlerin ne kadar kuvvetli olduğu, bağlanma ve ayrılma hız sabitleri), derişim (mevcut hedef analit miktarı)



ve yapısal değişimler (bağlanma ya da ayrılmanın herhangi bir yapısal değişime yol açıp açmadığı) gibi birçok parametrenin belirlenmesi mümkündür. Sistemin hızlı olması ve verilen örnek miktarının çok az olması da diğer önemli avantajlardır. Bu özelliklerinden dolayı SPR sensörler hem araştırma hem de endüstriyel alanlarda yüksek performans ve uyum sağlar.

Örnek için ön hazırlık aşamasına ihtiyaç duyulmaz. Eş zamanlı ölçümler alınır. Özellikle sensör yüzeyine yakın bölgede oldukça yüksek duyarlılıkta ölçüme olanak sağlar. Örnek çözelti için floresans modifikasyonu gibi ön işlemlere gerek yoktur. Hedef analitin bağlanma/ayrılma sabiti gibi özellikleri kolayca belirlenebilir. Kullanımı kolay ve kantitatif analizlere olanak sağlar. (Nishikawa ve Fujita 2015).

Vücut sıvılarındaki biyolojik belirteçlerin belirlenmesinde hastane ve özel laboratuarlarda enzim bağlı immünosorbent assay (ELISA), kemilüminesans, immüno floresans, radyolojik ve mikroskopik metotlar kullanılmaktadır (Luppa ve ark. 2001). Fakat bu metotlar zaman alıcı ve zahmetlidir. Ayrıca birçok farklı operasyonel basamağın eklenmesi zordur ve otomatikleştirmeye uygun değildir (McGlennen 2001).

Analitin reseptöre bağlandığını görebilmek için reaktif eklenmesi ve işaretleme gereklidir (Peter ve ark. 2001). İşaretleme uygulama zamanını uzatmakta, maliyeti arttırmakta ve yanlış negatif sonuç verebilmektedir. Bu nedenle günümüzde kanser gibi önemli hastalıkların teşhisinde immünoassay metotları kullanılmamaktadır.

İdeal bir görüntüleme sistemi hızlı, hassas, özgül, kararlı, kullanımı kolay ve medikal alanda da kullanıma uygun olmalıdır. Ayrıca test edilecek örneklerde (örneğin kan, plazma, idrar, tükürük, serebrospinal sıvı) analitin tayini herhangi bir sınırlama olmadan ve örnek hazırlama yapılmadan doğrudan yapılabilmelidir. SPR sensör işaretleme gerektirmeden doğrudan ölçüm yapılmasına olanak sağlar. Medikal uygulamalarda hedef analitlerin görüntülenmesi bu sistemde oldukça hızlıdır. SPR sensörün yazılımı, biyotanıma elemanları ve bu elemanların immobilizasyonları ve sensörün veri analizleri gibi özelliklerinden dolayı SPR sensörler özellikle medikal diagnostik için avantajlı analitik sistemlerdir (Wolfbeis 2006).

UA derişiminin kantitatif olarak tayini medikal alanda potansiyel uygulama alanı bulmaktadır. Misra ve arkadaşları tarafından (2012) yapılan bir çalışmada UA kolorimetrik olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada polivinil pirolidon kaplı gümüş nanopartiküllerin (PVP-Ag-NPs) oluşturduğu lokalize yüzey plazmon rezonans (LSPR) bandına dayalı bir ölçüm yapılmıştır. Hazırlanan nanopartiküller insan serum ve sığır serum örneklerinde UA belirlenmesi amacıyla LSPR temelli optik kimyasal sensörlerde kullanılmıştır. UA'in ürikaz enzimi varlığındaki enzimatik yıkımı sonucunda oluşan reaksiyon ürünlerinden hidrojen peroksit, gümüş nanopartikülleri oksitleyerek SPR bandında bir azalmaya yol açar. UA ve ürikaz varlığında PVP-Ag-NP'lerin LSPR optik özelliklerinde bir değişim gözlenir. Sistemin çalışma prensibi bu değişimin izlenmesi ilkesine dayanmaktadır. UA için dedeksiyon limiti  $5 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir. 11-amino-1-undekanetiol hidroklorür (AUT) kendiliğinden oluşan tek tabaka (SAM) üzerine kovalent olarak immobilize edilmiş kolesterol oksidaz biyoelektrotları kullanılarak kolesterol biyosensörü hazırlanmıştır. SPR tekniği kullanılarak 50-500 mg/dL aralığındaki kolesterol çözeltileri ölçülmüş ve sensörün duyarlılığı belirlenmiştir. Sensör seçiciliğinin belirlenmesi için sisteme 1:1 oranında kolesterol (200 mg/dL) ve askorbik asit (0,05 mM), UA (0,2 mM), glukoz (5 mM) ve üre (2 mM) gibi girişimci moleküller verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre girişimci moleküller SPR sinyalinde herhangi bir değişime yol açmamaktadır (Solanki ve ark. 2007).

Arya ve arkadaşları (2007) tarafından yapılan çalışmada, yüzey plazmon rezonans tekniği kullanılarak poli(3-hekziltiyofen) (P3HT) kendiliğinden oluşan tek tabaka (SAM) temelli kolesterol biyosensörü geliştirilmiştir. Bu amaçla kolesterol oksidaz enzimi 1-floro-2-nitro-4-azidobenzen (FNAB) ile modifiye edilmiş P3HT SAM altın kaplı cam plakalara kovalent olarak immobilize edilmiştir (ChOx/FNAB/P3HT/Au biyo-elektrot). SPR tekniğinin kullanıldığı çalışmada 50-500 mg/dL aralığındaki kolesterol çözeltileri için dedeksiyon limiti 50 mg/dL, duyarlılık ise 1,04 m<sup>o</sup>/(mg dL) olarak bulunmuştur. Askorbik asit (0,05 mM), UA (0,2 mM), glukoz (5 mM) ve üre (2 mM) gibi girişim etkisi gösteren maddeler, kolesterol (200 mg/dL) ile 1:1 oranında karıştırılarak SPR ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre girişimcilerin varlığında, SPR açısında en fazla % 2-3'lük bir değişimin gözleendiği saptanmıştır (Arya ve ark. 2007).

Dopamin (DA) için geliştirilen SPR tekniğine dayalı biyo-afinite sensöründe moleküler tanıma elemanı olarak D3 dopamin reseptörünün (DA-RC) kullanıldığı bir başka çalışmada, SPR altın yüzeyine fiziksel adsorpsiyon ile dopamin-sığır serum albumini (DA-BSA) immobilize edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre SPR biyosensörü, 85 pg/mL (ppt) – 700 ng/mL (ppb) aralığında kolesterol çözeltileri için doğrusal sonuç vermiştir. Askorbik asit (AA), UA (10 µg/mL), 3,4 dihidroksifenil asetik asit (DOPAC) ve 3-(3,4 dihidroksifenil)-alaninin (DOPA) herhangi bir girişim etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Kumbhat ve ark. 2007).

Chuekachang ve arkadaşları (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, idrarda ürik asit tayini için poli(2-aminobenzilamin)/tek duvarlı karbon nanotüp (P2ABA/SWNTS) ince film sentezlenmiş ve elektrokimyasal yüzey plazmon rezonans spektroskopisi (EC-SPR) tekniği ile ölçümler gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada askorbik asidin (AA) girişim etkisi incelenmiştir. 1 mM UA ve 1 mM AA için elde edilen kırılma değerleri sırasıyla 0,35 ve 0,31 olarak bulunmuş ve idrarda UA tayini için uygun bir metod olduğu rapor edilmiştir (Chuekachang ve ark. 2013).

Kamali ve arkadaşları (2015) tarafından yapılan bir diğer çalışmada gümüş@grafen oksit (Ag@GO) nanokompozit temelli optik sensör geliştirilmiştir. Dopamin (DA), askorbik asit (AA) ve ürik asit (UA) tayini için kullanılabilirliği araştırılmıştır. DA, AA ve UA için SPR yoğunluk temelli LOD değerleri sırasıyla 49 nM, 634 nM ve 927 nM olarak bulunmuştur. SPR band pozisyon temelli LOD değerleri ise sırasıyla 30 nM, 1,64 µM ve 2,15 µM olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre optik sensörün DA için daha hassas olduğu belirtilmiştir (Kamali ve ark. 2015).

## **2.6. Moleküler Baskılama Tekniği**

Moleküler tanıma birçok biyolojik prosesin gerçekleşmesinde önemli rol oynamaktadır. Antibadi-antijen, enzim-substrat ya da hormon reseptörü-hormon gibi özelleşmiş yapılar doğal hedefleri ile mükemmel bir uyum içerisindedirler. Sözü edilen biyo-makromolekülleri biyomedikal ve analitik kimya alanlarındaki uygulamaları ile afinite teknolojisinde tanıma sistemleri olarak kullanılabilirler. Buna rağmen, bu

biyomoleküllerin bulunduğu doğal çevrenin kararsız olması ve standart endüstriyel fabrikasyon işlemlerine çok zor entegre edilmesinden dolayı bu moleküller mükemmel araçlar olmaktan uzaklaşmaktadırlar. Ayrıca, verimin düşük olması ve tayin edilmek istenen bazı hedef moleküller için doğal bir reseptörün bulunmaması önemli bir dezavantajdır. Bu nedenle, araştırmacılar için seçiciliği yüksek yapay reseptörlerin hazırlanması son derece önemlidir. Moleküler baskılanmış sentetik polimerlerin hazırlanması, yapay makromoleküler reseptörlerin oluşturulmasında sıklıkla kullanılan basit bir yoldur.

Moleküler baskılama, hedef molekülün (veya bundan türetilmiş) kalıp olarak davrandığı, çevresindeki fonksiyonel monomerler ile etkileşime girdiği, çapraz-bağlı monomerlerin düzenlendiği ve kopolimerize olduğu bir prosestir. İlk olarak, fonksiyonel monomerler kalıp molekül ile kovalent veya kovalent olmayan etkileşimler ile ön-kompleks oluştururlar. Polimerizasyondan ve ardından kalıp molekülün uzaklaştırılması ile, kalıp molekülü şekil, boyut ve fonksiyonel grupların pozisyonu açısından tamamlayan bağlanma bölgeleri oluşur. Diğer bir değişle, polimerik yapıda bir moleküler hafıza oluşturulmuştur. Böylece kalıp molekül seçici olarak geri bağlanabilme yeteneğine sahip olur. Bu nedenle, moleküler baskılanmış polimerler (MIPler) hedef molekülü seçici olarak bağlama ve tanıma yeteneklerinden dolayı biyolojik reseptörlerin en önemli grubunu oluşturmaktadırlar. Fakat bununla birlikte, MIPler biyolojik reseptörlerden oldukça farklıdırlar. MIPlerin ilgi çekici yanlarından biri de çok sayıda farklı hedef molekül için uygulanabilir olmasıdır. Küçük organik moleküller (farmasötikler, pestisidler, amino asit ve peptidler, nükleotidler, steroidler ve şekerler) için MIPler günümüzde kolayca hazırlanabilmektedir. Bunun yanı sıra, MIPler gözenekli mikroküreler, nanoküreler, nanoteller, ince filmler, nanoyapıdaki filmler, nanokompozitler ve nanojeller gibi birçok farklı fiziksel yapıda sentezlenebilmektedir.

Doğal karşılıklarına (enzim, antibadi ve hormon reseptörleri) benzerliklerinden dolayı MIPler birçok alanda farklı uygulama alanı bulmaktadır. Afinite ayırma materyali olarak kullanımları, biyoçip hazırlanması, kimyasal ve biyo-analizler, direkt sentezler, enzim-benzeri katalizler ve biyomedikal uygulamalardaki avantajlarından dolayı MIPler

özellikle analitik kimya ve biyokimya alanlarında son zamanlarda oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır (Haupt 2012).

Antibadi ya da enzim gibi yüksek seçicilik gösteren biyomoleküller kimya, diagnostik ve biyoloji alanlarında oldukça önemlidir. Bununla birlikte, bu doğal reseptörler pahalı, üretimleri oldukça zor ve kullanım alanları sınırlıdır. Moleküler baskılama tüm bu sınırlamaları ortadan kaldırmak için geliştirilmiş bir yöntemdir. Seçici bir baskılama için, hedef molekül varlığında ön-polimerizasyon gerçekleştirilir. Polimer oluşurken sırasıyla iki olay gerçekleşir. Birinci aşamada, fonksiyonel gruplar kalıp moleküldeki fonksiyonel gruplarla etkileşime girer. İkinci aşamada ise, uygun bir çapraz bağlayıcı ile monomer-kalıp molekül fonksiyonel monomer üzerinden polimerleşir. Kalıp molekülün uygun çözücüler ile polimerden uzaklaştırıldıktan sonra polimerde kalıp moleküle uygun boşluklar oluşur. Sonuç olarak, baskılanmış polimerin şekli, üç boyutlu yapısı ve yüzey kimyası kalıp moleküle bağlıdır (Şekil 2.6.1).



**Şekil 2.6.1.** Baskılama mekanizması (a) kalıp molekülün varlığında sırasıyla iki olay meydana gelir. Ön-polimerizasyonda fonksiyonel gruplar kalıp molekülün fonksiyonel gruplarına doğru yönelirler ve etkileşime girerler (kırmızı yuvarlaklar). Daha sonra, polimer zincirleri (gri çizgiler) oluşur ve çapraz bağlanır (b) kalıp molekül uzaklaştırıldığında bağlanma bölgeleri oluşur

Doğru polimerin seçilmesi moleküler baskılamada en kritik faktörlerden birisidir. En önemli gereksinimlerden birisi kalıp molekül ile etkileşebilmesi için monomerin fonksiyonel gruplarının olmasıdır. Bu gruplar yük, dipol, van der Waals etkileşimleri ya da  $\pi$ - $\pi$  etkileşimleri gibi kovalent olmayan etkileşimleri yapabilen gruplar olmalı ve fonksiyonel gruplar kalıp molekülün uygun grupları ile doğrudan uyumlu olmalıdır. Fonksiyonel monomerin kalıp molekül ile polimerizasyon reaksiyonuna girmemesi gerekir. Biyomoleküllerin politiyoöretan üzerine baskılanmasında yaşanan sorunlar buna

örnek verilebilir. Birçok biyomolekülde bulunan alkol ya da amin grupları izotiyosiyanat ile reaksiyon verir.

Bunun yanı sıra, kalıp molekül uzaklaştırıldıktan sonra polimerik yapıda yeterli miktarda çapraz bağ bulunmalıdır. Eğer bağlanma bölgeleri çok esnek olursa, benzer molekülleri de bağlayabilirler. Örneğin, küçük moleküller çapraz bağ oranı yüksek polimerlerle daha iyi çalışılırken, büyük moleküller daha esnek polimerlerle çalışılır. Oluşturulan polimer blokların toksik olmaması gerekir (Schirhagl 2014).

Çizelge 2.6.1’de bazı polimerler ve kullanım alanları verilmiştir.

**Çizelge 2.6.1.** Bazı polimerler ve uygulama alanları

<b>Polimer</b>	<b>Uygulama</b>	<b>Metot</b>	<b>Referans</b>
Poliakrilat/polimetakrilat /polimetilmetakrilat	Sensör, kromatografi, ilaç salınımı	Yığın baskılama, yüzey baskılama, baskılanmış partiküller	Li ve ark. 2102, Puoci ve ark. 2004, Puoci ve ark. 2007
Poliakrilamid	Kromatografi, kristalizasyon	Yığın baskılama	DePorter ve ark. 2012, Saifuddin ve ark. 2011, Nematollahzadeh ve ark. 2011
Poliüretan	Sensör	Yüzey baskılama	Sreenivasan 1998, Dickert ve Thierer 1996, Dickert ve ark. 1999
Siloksanlar	Kromatografi	Yüzey baskılama	Glad ve ark. 1985
Sol-jeller	Kromatografi, sensör, katalizör	Yığın baskılama	Zang ve ark. 2011, Graham ve ark. 2002, Yu ve ark. 2009, Katz ve Davis 2000

Moleküler baskılanmış polimerlerin en önemli avantajı yüksek seçicilikte olmaları ve baskılama prosedüründe kullanılan hedef moleküle afinite göstermeleridir. Baskılanmış

polimerler protein ve nükleik asit gibi biyolojik sistemlerle kıyaslandıklarında yüksek fiziksel güç ve dayanıklılığa sahiptir, yüksek sıcaklık ve basınca direnç gösterir, asit, baz, metal iyonları ve organik solventlerle reaksiyon vermez. Ayrıca, sentezi oldukça ucuzdur ve raf ömürleri oldukça uzundur.

Moleküler baskılama, seçici moleküler tanıma yeteneğine sahip oldukça yüksek çapraz bağlı polimerlerin sentezlendiği bir tekniktir. Monomerin polimerizasyonu polimer matrisi içinde bulunan hedef (kalıp) molekülün varlığında gerçekleşir. Polimerizasyon süreci kalıp molekül, fonksiyonel monomer, çapraz bağlayıcı ajan ve başlatıcının gözenek yapıcı çözücü içinde çözünmesiyle başlar. Kararlı bir kalıp molekül-monomer kompleksi oluşturabilmek için kalıp molekülle etkileşime girebilen fonksiyonel monomerler seçilmelidir. Genellikle, kalıp molekül ve polimer matrisin fonksiyonel grupları arasında oluşan hidrojen bağı, dipol-dipol ve iyonik etkileşimler gibi moleküller arası etkileşimler moleküler tanıma olayını meydana getirir. Bu nedenle, meydana gelen polimer yalnızca kalıp molekülü tanıyabilir ve seçici olarak bağlar. Polimerizasyon sonunda kalıp molekül polimerden uzaklaştırıldığında, polimer üzerinde kalıp moleküle özgü bağlanma bölgeleri oluşur. Böylelikle, kalıp molekülü seçici olarak bağlayan ve tanıyan polimerler sentezlenmiş olur. Bağlanma bölgeleri polimerizasyon süresince kurulan etkileşimlere bağlı olarak farklı özellikler göstermektedir. Geleneksel olarak, moleküler baskılama monomer ve kalıp molekül arasında polimerizasyon boyunca süren etkileşimlerin doğasına göre sınıflandırılmaktadır.

Monomer ve kalıp molekül arasındaki iyi etkileşimler MIP ağında uygun bağlanma bölgelerinin oluşmasına yardımcı olmaktadır. Günümüzde monomer ve kalıp molekül arasındaki etkileşimlerin yol açtığı ön-polimerizasyonda iki ana strateji uygulanmaktadır:

- Kovalent olmayan yaklaşım, biyolojik tanıma sistemlerine benzemektedir. Burada hidrojen bağı, van der Waals etkileşimleri, iyonik ya da hidrofobik etkileşimler ve metal-koordinasyonu şeklinde farklı etkileşimler söz konusudur.

- Kovalent yaklaşım ise; kalıp molekül ve monomer birbirine kovalent bağ ile bağlanmakta, kalıp molekülün polimerik matriksten uzaklaştırılması için oluşan kovalent bağların kırılması gerekmektedir.

Kovalent olmayan yaklaşım, kompleks oluşumunun ve ayrılmasının kolaylığı ve fonksiyonel monomerin herhangi bir kalıp molekülle kolaylıkla etkileşime girebilmesi nedeniyle MIPIlerin hazırlanmasında oldukça yaygın kullanılan bir yöntemdir. Öte yandan, kovalent yaklaşımla hazırlanan MIPIlere göre bağlanma afiniteleri daha düşüktür. Hwang ve Lee (2002) yığın polimerizasyonu tekniği kullanarak hem kovalent hem de kovalent olmayan yaklaşımla kolesterol baskılanmış polimerler sentezlemişler ve HPLC kolonlarında durağan faz olarak kullanımlarında MIPIlerin performanslarını karşılaştırmışlardır. Kovalent baskılama ile hazırlanan MIP ve kovalent olmayan baskılama ile hazırlanmış MIPin performansları karşılaştırıldığında; kovalent baskılanmış MIPde pik genişlemesinin daha az olduğu adsorpsiyon kapasitesinin daha yüksek olduğu ve kromatografik etkinliğinin 5 kat daha fazla olduğu bulunmuştur.

Moleküler baskılanmış polimerler çözünür olmamasından dolayı zor karakterize edilirler. Buna rağmen, katı hal NMR teknikleri, elemental mikro-analiz ve Fourier-Transform İnfrared Spektroskopi (FT-IR) gibi bazı analitik teknikler kimyasal ve morfolojik karakterizasyona olanak sağlamaktadır.

MIPIlerin morfolojik karakterizasyonları ışık mikroskobu ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) gibi mikroskobik teknikler ile yapılmaktadır. Ayrıca, BET (Brunauer, Emmett ve Teller) izotermi kullanılarak azot adsorpsiyon-desorpsiyon analizi ile polimerik partiküllerin spesifik yüzey alanı, spesifik gözenek hacmi, gözenek boyut dağılımı ve ortalama gözenek çapı değerleri belirlenebilir.

Bunun yanı sıra, bağlama kapasitesi ve seçicilik gibi moleküler tanıma davranışlarının belirlenebilmesinde en önemli karakterizasyon basamağı kesikli sistemde geri bağlama çalışmalarıdır. MIPIler aynı zamanda kromatografide durağan faz olarak doğrudan kullanılabilirler. Böylece MIPIlerin bağlama özelliği doğrudan hızlı ve kolay şekilde analiz edilebilir. Scatchard analizi, kesikli sistemde geri bağlama deneylerinde MIPIlerin



bağlama davranışlarının belirlenmesinde oldukça yaygın kullanılan bir modeldir. Genellikle kalıp molekül ve fonksiyonel monomer arasındaki kovalent olmayan bağlanmalar Scatchard analizi ile açıklanır. Burada, iki düz çizgi polimerdeki bağlanma bölgelerinin afinitesinin heterojen olduğunu gösterir ve yüksek ve düşük afinite bağlama bölgelerine bağlı olarak iki değer ile hesaplanır. Öte yandan, Freundlich ve Langmuir-Freundlich (LF) izotermi MIP kolonlarının karakterizasyonu ve kromatografik özelliğinin anlaşılması için oldukça uygun teorik modellerdir. Bu metotlara devamlı heterojen bağlama modelleri de denilmektedir ve bağlama bölgelerinin toplam sayısının hesaplanması ile MIPlar karakterize edilebilmektedir.

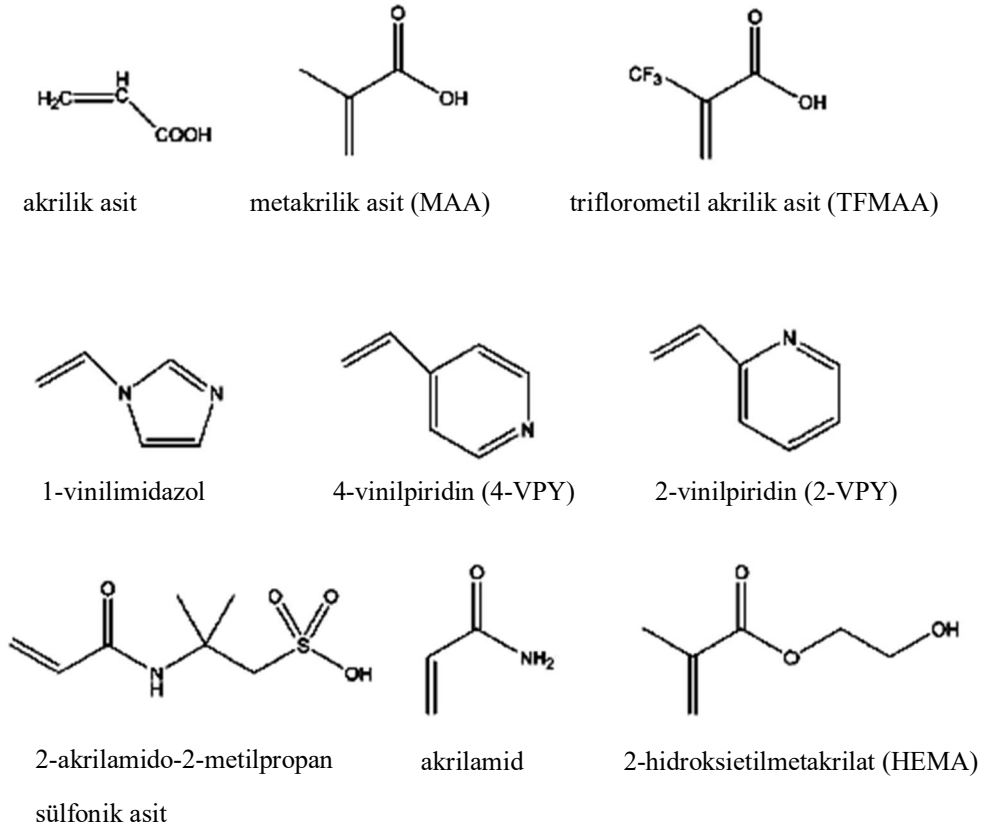
### **2.6.1. MIP sentezinin optimizasyonu**

MIPların sentezinde, polimerin morfoloji, özellik ve performansını etkileyen birçok parametre mevcuttur. Günümüzde, serbest radikal polimerizasyonu MIPların hazırlanmasında yaygın bir metot olarak kullanılmaktadır. Genellikle, sentez prosedürü yığın veya çözelti içerisinde ılımlı reaksiyon koşullarında (80 °C'nin altında ve atmosferik basınç altında) gerçekleşir. Farklı özellikte çok sayıda fonksiyonel monomer ve kalıp molekülün kullanılmasına olanak sağlar. Normalde polimerizasyon reaksiyonu oldukça hızlıdır. Reaksiyon genellikle N,N'-azobisisobütironitril (AIBN) gibi azo-başlatıcılarla ve termal veya fotokimyasal başlatıcılarla başlatılır. Elde edilen verilere göre, fotokimyasal başlatıcı kullanılan polimerizasyonlar termal başlatıcı kullanılan polimerizasyonlarla kıyaslandığında, fotokimyasal başlatıcı kullanılan polimerizasyonlar düşük sıcaklıkta ön-polimerizasyon kompleksinin kinetik enerjisini düşürürken, kararlılığını, bağlanma kapasitesini ve özgüllüğünü artırır (Puoci ve ark. 2007, Athikomrattanakul ve ark. 2009, Spivak ve ark. 1997).

MIP sentezinde kimyasal ajan seçimi verimli fonksiyonel MIPların elde edilmesinde öncelikli öneme sahiptir. İlaç, amino asit, karbohidrat, protein, nükleotid baz, hormon, pestisid ve koenzim gibi farklı kalıp moleküller kullanım için uygundur.

Kalıp moleküle yüksek özgüllükteki boşlukların oluşturulmasında monomer seçimi oldukça önemlidir. Tipik fonksiyonel monomerler (Şekil 2.6.1.1) karboksilik asitler

(akrilik asit, metakrilik asit, vinilbenzoik asit), sülfonik asitler (2-akrilamido-2-metilpropan sülfonik asit) ve heteroaromatik bazlardır (vinilpiridin, vinilimidazol). Kovalent olmayan yaklaşımda genellikle iyi bir kalıp molekül-monomer kompleksinin oluşması için, kalıp molekül:fonksiyonel monomer oranı 1:4 oranındadır ve mol sayılarıyla ilişkilidir. Bu nedenle, kalıp molekül-fonksiyonel monomer kompleksinin çok sayıda farklı konfigürasyonlarının oluşmasına yol açmaktadır. Metakrilik asidin (MAA) yaygın olarak kullanımının sebebi hem proton vericisi hem de hidrojen bağı alıcısı gibi davranma kabiliyetidir. Bunun yanı sıra, spesifik amino asit dizilerini bağlayan metal koordinasyon etkileşimleri vasıtasıyla daha kuvvetli fonksiyonel monomerler geliştirilmiştir.



**Şekil 2.6.1.1.** Moleküler baskılamada yaygın olarak kullanılan monomerlerin kimyasal yapıları

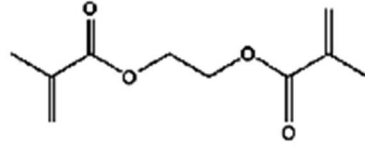
Baskılanmış polimerlerin sentezinde çapraz bağlayıcıların rolü de oldukça önemlidir. Çapraz bağlayıcı, polimer matrisin morfolojisinin kontrolünde önemlidir. Polimer matris içerisinde rijit bağlanma bölgelerinin oluşmasını sağlar ve mekanik dayanıklılık kazandırır. Şekil 2.6.1.2’de gösterildiği gibi çok sayıda farklı çapraz bağlayıcı vardır.

Yüksek çapraz bağ oranı genellikle mekanik dayanıklılık kazandırmak için makro gözenekli materyallerin sentezinde kullanılır. Etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) ve trimetilolpropan trimetakrilat (TRIM) en fazla kullanılan çapraz bağlayıcılardır.

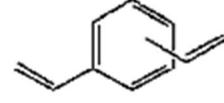
Bazı araştırmacılar, çapraz bağlayıcıların polimerlerin fiziksel karakteristiklerinde önemli rol oynadığını ve kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki spesifik etkileşimde ise çok az etki gösterdiklerini bulmuşlardır (Molinelli ve ark. 2005, Navarro-Villoslada ve ark. 2004, Shi ve ark. 2007).

Çapraz bağlayıcı olarak TRIM, EGDMA'ya göre polimere daha fazla rijitlik, yapı düzenliliği ve daha etkili bağlanma bölgeleri sağlar. Çöktürme yönteminden elde edilen polimerizasyona göre, çapraz bağlayıcı oranının optimize edilmesi ve kalıp molekül derişiminin azaltılması ile, polimerin bağlama özellikleri geliştirilmiş ve spesifik olmayan bağlanma düzeyleri azaltılmıştır (Ye ve ark. 2000).

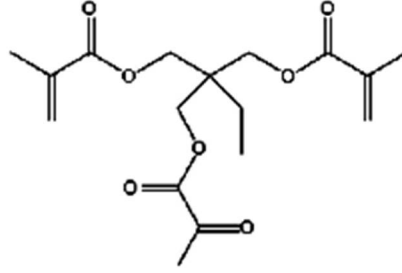
Yapılan bir başka çalışma çapraz bağlayıcı türünün MIP nanopartiküllerin verimini ve boyutunu etkilediğini göstermiştir (Yoshimatsu ve ark. 2007). Örneğin; çapraz bağlayıcı olarak divinil benzen kullanıldığında dağılmış MIP partiküller daha düşük verimle elde edilmiştir. Aksine, TRIM kullanıldığında nanopartiküller aynı formda ve % 90 gibi yüksek bir verimle elde edilmiştir.



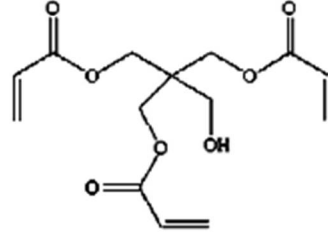
etilenglikoldimetakrilat (EGDMA)



divinilbenzen (DVB)



trimetilolpropan trimetakrilat (TRIM)



pentaeritriol triasetat (PETRA)

### Şekil 2.6.1.2. Moleküler baskılamada kullanılan en yaygın çapraz bağlayıcıların kimyasal yapıları

Moleküler baskılama prosesinde ayrıca çözücülerin doğası ve miktarı da önemli rol oynamaktadır. En fazla kullanılan çözücüler toluen, kloroform, diklorometan ya da asetonitrildir. Çözücüler tüm bileşenlerin (monomer, kalıp molekül, başlatıcı, çapraz bağlayıcı) polimerizasyon esnasında tek bir fazda tutulmasını sağlar ve makro gözenekli polimerlerde gözeneklerin oluşturulmasından sorumludurlar. MIPlere iyi bir akış kazandırmak için çözücü, büyük gözenekler üretmelidir. Bu nedenle, çözücüler genellikle porojen (gözenek yapıcı) olarak tercih edilirler, çözücü miktarı arttıkça polimerin gözenek boyutu artmaktadır. Kovalent olmayan baskılama metodunda kullanılan porojen aynı zamanda kalıp molekül-fonksiyonel monomer kompleks oluşumunun artmasındaki rolü nedeniyle önemlidir. Örneğin; kloroform ya da toluen gibi daha az polar olan çözücüler hidrojen bağı gibi kovalent olmayan polar etkileşimler sayesinde kompleks oluşumunu arttırırken, daha polar çözücüler polimer kompleksindeki kovalent olmayan etkileşimleri ayırma eğilimindedir. Özellikle protik çözücüler hidrojen bağlarının yüksek oranda bozulmasına yol açmaktadırlar. Buna rağmen bazı araştırmalarda güçlü kalıp molekül-monomer etkileşimlerinin oluşması için polar çözücüler (örneğin; asetonitril/su ya da metanol/su) tercih edilmiştir.

Genellikle MIP sentezinde toluen ya da kloroform gibi protik olmayan çözücüler tercih edilirken kompleksleşme işlemine hidrofobik etkileşimler dahil edilecekse su ya da diğer protik çözücüler seçilebilmektedir. Ayrıca, polimerizasyondan sonra geri bağlama performansı optimize edilerek polimerizasyon esnasındaki koşullar ya da benzer koşullar ile geri bağlama koşulları karşılaştırılmalıdır. Çizelge 2.6.1.1’de polimerizasyon sentez prosedürüyle ilgili genel bilgiler özetlenmiştir.

**Çizelge 2.6.1.1.** Baskılanmış polimerlerin polimerizasyon değişkenleri

Baskılama mekanizması	- Kovalent - Kovalent olmayan - Metal koordinasyonu
Çapraz bağlayıcı miktarı	- Yüksek - Düşük
Ortam	- Organik - Sulu - Çözücüsüz

## 2.6.2. MIPLerin fiziksel formu ve hazırlanma metodları

MIPLer farklı metotların uygulanmasıyla değişik fiziksel formlarda sentezlenebilir (Poma ve ark. 2010, Wei ve Mizaikoff 2007).

Geleneksel yaklaşım MIPLerin yığın polimerizasyonu ile sentezlenmesi, daha sonra oluşan polimerlerin havanda ya da öğütücüde öğütülmesi ve spesifik uygulama alanlarına göre geriye kalan farklı boyuttaki polimerleri elekten geçirme şeklindedir. Bu metot kolay olmasından dolayı oldukça popülerdir. Buna karşın; uygun partikül boyutlarını elde edebilmek için kullanılan ezme, öğütme ve eleme işlemleri uğraştırıcı ve zaman alıcıdır. Ayrıca üretilen partiküllerin boyut ve şekilleri düzensiz olmaktadır. Ezme işlemi sırasında etkileşme bölgeleri zarar görmekte ve MIP yükleme kapasitesi azalmaktadır. Moleküler baskılama ile ilgili çoğu araştırmada hala bu metot kullanılırken, son yıllarda bu problemlere çözüm bulabilmek için MIPLer, tanecikler (beads), membranlar, *in situ* hazırlanmış monolitler, yüzey baskılama, moleküler baskılanmış tek tabakalar gibi farklı fiziksel formlar ve alternatif metotlar geliştirilmektedir (Poma ve ark. 2010).

Çöktürme polimerizasyon yöntemi kullanılarak eş boyutlu tanecikler elde edilebilir. Bu teknik ile yığın metodunda kullanılan aynı reaksiyon karışımında yüksek miktardaki gözenek yapıcı dışında baskılanmış tanecikler oluşur. Polimer zincirler büyümeye devam eder ve yalnızca reaksiyon karışımında çözünmeyecek büyüklüğe ulaştıklarında çöktürülürler. Daha sonra polimer tanecikler yıkama ve santrifügasyon ile kolaylıkla geri kazanılır. Kolay olan bu teknik aynı zamanda yığın polimerizasyonuna göre daha kısa sürede biter ve iyi verimlerde daha düzgün taneciklerin sentezlenmesini sağlar. Taneciklerin çapları azalırken, artan porojen hacmi, daha az oligomer ve çekirdek oluşumuna bağlı olarak daha az monomer ve çapraz bağlayıcı yüzeye difüze olur ve daha küçük partiküllerin içinde polimerize olurlar. Örneğin, reaksiyon koşullarını değiştirerek nanopartiküllerden mikrotaneciklere uzanan farklı boyutlarda polimerler sentezlenebilmektedir. İki farklı çapraz bağlayıcının (DVB ve TRIM) miktarlarını değiştirerek aynı çöktürme polimerizasyon koşullarında 130 nm'den 2,4 µm aralığında farklı boyutlarda polimerler sentezlenebilir.

Son yıllarda moleküler baskılanmış polimer membranlar oldukça ilgi çekmektedir. *in situ* polimerizasyon metodu kullanılarak gözenekli yapıdaki moleküler baskılanmış polimer membranlar sentezlenir. Bu metot birbiri içinde nüfuz edebilen polimer ağların sentezi ilkesine dayanmaktadır. Sentezlenen bu polimerlerin sulu çözeltilerden triazin herbisitlerinin katı-faz ekstraksiyonu için kullanımı araştırılmıştır (Sergeyeva ve ark. 2007).

Monolitik MIPLer oldukça basit, tek adımda, *in situ* serbest-radikal polimerizasyon tekniği ile sentezlenirken, öğütme, eleme ve kolon paketlemesine ihtiyaç duyulmadan doğrudan kromatografik kolon olarak kullanılabilirler.

Moleküler baskılanmış tek tabakaların kullanım alanlarından birisi de sensörlerdir. Lahav ve arkadaşları fotokimyasal baskılama metodu kullanarak naftasenekinon türevleri için altın elektrot üzerindeki tiyol gruplarında tanıma bölgeleri oluşturmuşlardır (Lahav ve ark. 2001). Lotierzo ve grubu domoik asit için etilen glikol dimetakrilat ile çapraz bağlanmış amino-süstitüye olmuş metakrilat kullanılan MIP sensör geliştirmişlerdir. Yapılan çalışmada polimer yüzey plazmon rezonans (SPR) dedeksiyonuna uygun hassas

altın tabaka üzerinde direkt foto-aşılama yöntemi ile hazırlanmıştır (Lotierzo ve ark. 2004).

Çizelge 2.6.2.1'de moleküler baskılanmış polimerlerin düzenlenme biçimleri özetlenmiştir.

#### Çizelge 2.6.2.1. MIPlerin fiziksel formları

Fiziksel Form	Referanslar
Fragmanlanmış polimer monolitler	Vlatakis ve ark. 1993, Shea ve ark. 1993, Wulff ve Minarik 1990, Dhal ve Arnold 1992, O'Shannessy ve ark. 1989
Kompozit polimer tanecikler	Norrlow ve ark. 1984, Glad ve ark. 1995, Dhal ve ark. 1995, Plunkett ve Arnold 1995
Süspansiyon, emülsiyon ya da dispersiyon polimerizasyonu sonucu elde edilen polimer tanecikler	Byström ve ark. 1993, Hosoya ve ark. 1994, Mayes ve Mosbach 1996, Sellergen 1994
<i>In situ</i> polimerizasyon	Matsui ve ark. 1993, Nilsson ve ark. 1994
İnce tabakalara bağlanmış polimer partiküller	Kriz ve ark. 1994
Polimer membranlar	Hedborg ve ark. 1993, Piletsky ve ark. 1995, Mathew-Krotz ve Shea 1996, Kobayashi ve ark. 1995
Yüzey-baskılanmış polimer fazlar	Kempe ve ark. 1995, Norrlöw ve ark. 1987, Dhal ve Arnold 1992, Tahmassebi ve Sasaki 1994, Uezu ve ark. 1994, Shnek ve ark. 1994

#### 2.6.3. MIPlerin uygulama alanları

MIPlerin kendine has özellikleri, onların ayırma ve saflaştırma, sensör ve biyosensörler, katalizör ve ilaç salınımı gibi birçok farklı alanda kullanımlarını arttırmaktadır. Kromatografik ayırmada oldukça yüksek uyumluluk gösteren moleküler baskılanmış kromatografi tekniği MIPler için kapsamlı bir çalışma alanıdır. Optik olarak saf bileşikler

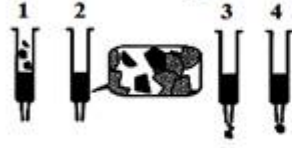
olmasından dolayı MIPLeri ilaçlarda rasemik ayırma için önemli kılmaktadır (Dhal ve ark. 1995). MIPLer ayrıca katı faz ekstraksiyon (SPE) prosedürlerinde yeni seçici sorbent olarak da kullanılmaktadır. Sadece örneklerin temizlenmesi ve deriştirilmesi için değil, aynı zamanda kompleks karışımdan hedef analitin seçici bir şekilde ekstraksiyonuna da olanak sağlamaktadır.

MIPLer ayrıca doğal antibadilerin yapay bağlama mimikleri olarak ve immünoassay tipi analizlerde tanıma elemanı olarak da kullanılmaktadır (Piletsky ve ark. 2006). Ayrıca bazı reaksiyonları katalizlemede aktif materyal olarak kullanılmış ve doğal enzimlerin mimiklerini taklit edebildikleri için enzim benzeri katalizlerde kullanılmışlardır (Li ve Li 2006, Wulff 2002). MIPLerin bir başka kullanım alanı da terapötikler ve medikal terapidir. MIPLerin spesifik koşullarda biyoaktif molekülleri bağlama yeteneğinden dolayı uygun dozaj formlarının geliştirilmesinde kullanılmaktadırlar (Vasapollo ve ark. 2011).

MIPLerin analitik prosedürlerde örnek hazırlama, analitik ayırma ve biyo- ve farmosötik uygulamalar için belirleme teknikleri olmak üzere 3 temel kullanım alanı vardır (Şekil 2.6.3.1). Çizelge 2.6.3.1'de MIPLerin genel uygulama alanları verilmiştir. Çizelge 2.6.3.2'de ise MIPLerin kullanıldığı bazı analitik yöntemler ve baskılama yapılan analitler verilmiştir.



a) Katı Faz Ekstraksiyonu



- Analit
- Matriks bileşenleri
- Moleküler baskılanmış polimer (MIP)
- Moleküler baskılanmış polimer kiral durağan faz
- Radyoaktif etiket

b) Kiral Ayırma



c) Afinite Uygulaması



**Şekil 2.6.3.1.** Moleküler baskılanmış polimerlerin uygulamaları (a) örnek hazırlama, (b) analitik ayırma ve (c) tanımlama. a: (1) örneğin verilmesi, (2) analitin ayrılması, (3) yıkama, (4) analitin elüsyonu (Owens ve ark. 1999)

**Çizelge 2.6.3.1.** MIPlerin uygulama alanları

Gelişmeler	Referanslar
Tanıma çalışmaları	Ramstrom ve ark. 1993, Dhal ve Arnold 1992, Mathew ve Buchardt 1995, Andersson ve ark. 1990, Wulff ve ark. 1986
Ayırma, izolasyon - Kiral ayırma - Substrat-seçimli ayırma	Wulff ve Schauhoff 1991, Kempe ve Mosbach 1995, Nicholls ve ark. 1995, Mayes ve ark. 1994, Siemann ve ark. 1996, Matsui ve ark. 1995, Dhal ve Arnold 1991
Antibadi/reseptör bağlanma mimikleri - Yarışmalı ligand bağlama çalışmaları - Diagnostik uygulamalar	Andersson ve ark. 1995, Siemann ve ark. 1996, Muldoon ve Stanker 1995, Andersson 1996, Vlatakis 1994
Enzim mimikleri/kataliz	Müler ve ark. 1993, Beach ve Shea 1994, Sellerren ve Shea 1994, Ohkubo ve ark. 1994, Morihara ve ark. 1992, Robinson ve Mosbach 1989
Biyosensör-benzeri aygıtlar	Kriz ve ark. 1995 (a), Kriz ve ark. 1995 (b), Hedborg ve ark. 1993, Piletsky ve ark. 1995

**Çizelge 2.6.3.2.** MIPIlerin kullanıldığı bazı yöntemler

<b>Yöntem</b>	<b>Analit</b>	<b>Referans</b>
Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi	Teofilin	Wang ve ark. 2003
Katı faz ekstraksiyonu	Teofilin	Wang ve ark. 2003
UV dedeksiyonlu yüksek basınçlı sıvı kromatografisi	Clenbuterol	Lomgren ve ark. 2002
Kapiler elektrokromatografi ve kapiler sıvı kromatografisi	L-tetrahidropalmitin ve (5S,11S)-(-)-Trolger's bazı	Ou ve ark. 2007
Sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi	Verapamil	Mullett ve ark. 2004
Kolorimetrik sensör	Aromatik aminler	Greene ve Shimizu 2005
Amperometrik sensör	Morfin	Kriz ve Mosbach 1995
Kondüktometrik sensör	Atrazin	Sergeyeva ve ark. 1999

### **2.6.3.1. UA baskılanmış polimerler**

MIP polimerik membranlar kan filtrasyon cihazlarında UA uzaklaştırılması için kullanım potansiyeline sahiptir. Bu amaçla Cristallini ve arkadaşları (2004) tarafından UA baskılanmış poli(akrilonitril-ko-akrilik asit) membranları sentezlenmiş ve kandan UA uzaklaştırılmasındaki seçiciliği araştırılmıştır. Yarışmacı molekül olarak teofilin kullanılmıştır. Mikro ve ultra filtrasyon sistemine uyarlanan membranın seçiciliği incelenmiş ve gram membran başına bağlanan UA ve teofilin sırasıyla yaklaşık 14 mg ve 6 mg olarak bulunmuştur. Ayrıca membranın hidrolik akışkanlığı incelenmiş, membranın NaCl ve B12 vitamini için bağlama kapasitesinin düşük albumin için yüksek olduğu bulunmuştur.

Leshchinskaya ve arkadaşlarının (2015) yaptığı bir çalışmada, süspansiyon kopolimerizasyonu yöntemiyle UA baskılanmış polimerik sorbentler sentezlenmiştir. Sentezlenen sorbentlerin fizikokimyasal ve sorpsiyon özelliklerinin incelenmesi amacıyla

aynı zamanda UA baskılanmamış polimerik sorbentler de hazırlanmıştır. Sorpsiyon kapasitesinin incelenmesi için kesikli süreçte bir deney tasarlanmıştır. 293 nm dalga boyunda UV spektrofotometresi ile ölçümler alınmış ve baskılama faktörü incelenmiştir. 0,8 M'lık UA çözeltisinin içine yarışmacı molekül olarak % 0,9 NaCl eklenmiş ve baskılama faktörü değerleri bu durumda hesaplanmıştır. Yarışmacı molekülün olmadığı durumda baskılama faktörü en fazla 1,5 bulunurken, yarışmacı molekül varlığında bu değer 3,8'e yükselmiştir.

Mujahid ve arkadaşları (2015) tarafından yapılan bir başka çalışmada, sol-jel metoduyla sentezlenen UA baskılanmış titania (titanyum dioksit) nanopartiküller ile UA tayini yapılmıştır. 0,01-0,095 mmol aralığında çalışılmış ve nanopartiküllere UA bağlanması ve geri kazanımı spektrofotometre ile takip edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre tayin limiti 10 µmol olarak hesaplanmış ve AA ile guaninin girişimi incelenmiştir (Mujahid ve ark. 2015).

## **2.7. Nanoteknoloji**

Bilim dünyası, gelişmekte olan teknolojiyle birlikte çevresindeki birçok olayı moleküler boyutta inceleyebilmektedir. Özellikle kimya ve fizik bilimleri sayesinde elde edilen ve geliştirilen teknolojiler ile birlikte son 30-40 yıldır moleküler biyoloji, biyokimya, genetik ve biyoteknoloji alanlarında önemli çalışmalar yapılmıştır. Yapılan bu çalışmalarda moleküler düzeye inme ve bu boyuttaki yapıların işlevlerini anlama isteği nanoteknoloji biliminin doğmasına neden olmuştur (Kocaefe 2007).

Nanoteknoloji, nano boyuttaki malzemelerin, aletlerin ve sistemlerin metrenin milyarda biri büyüklüğünde tarif edildiği, üretildiği, uygulamaya sokulduğu bir bilim dalıdır (Bouwmeester ve ark. 2009). Bu bilim dalı sayesinde minyatürleştirilenin yanı sıra nanomalzeme ve/veya nanosistemlerin özellikleri de kontrol edilmektedir (Serrano ve ark. 2009). 100 nm'nin altındaki (özellikle 10 nm'nin altındaki) bir sistemde, yüksek esneklik, optik ve termal özelliklerde önemli değişiklikler, yüksek reaktif ve katalitik aktivite, daha hızlı elektron/iyon transferi ve yeni fizikokimyasal özellikler gözlenir (Vaddiraju ve ark. 2010).

Nanobilim ve nanoteknolojinin odak noktası, düşük boyutlarda baskın hale geçen boyut, sınır ve kuantum etkileri gibi temel fizik araştırması içeren konuların yanı sıra, atomik boyutlarda görüntüleme deneysel yöntemlerin geliştirilmesi, Å altı ( $< 10^{-10}$  m) boyutlarda ölçüm yapabilme teknikleri, düşük boyutlarda eş tip malzeme üretebilme, malzeme yapısını atomik boyutlarda kontrol edebilme, kızılaltı ve morötesi radyasyonlara tepkisi kontrol edilebilir malzeme ve özel amaca yönelik aygıt geliştirme yöntemleridir (Nanobilim ve nanoteknoloji stratejileri, Vizyon 2023 projesi, nanoteknoloji strateji grubu, TÜBİTAK 2004).

1827 yılında nanoteknolojinin ilk endüstriyel örneği ışığa duyarlı gümüş nanopartiküllerin üretimine dayanan fotoğrafçılık sektörüdür. 1857 yılında ise Michael Faraday ilk metalik kolloidleri farketmiştir. Faraday'ın altın kolloidleri karakteristik elektronik ve optik özelliklere sahiptir ve bu altın kolloidler metalik nanopartiküller olarak bilinirler.

1908 yılında Alman fizikçi Gustav Mie partiküllerden ışık saçılımıyla ilgili bir teori öne sürerek nanoteknolojide önemli bir rol oynamıştır. Gustav'ın ileri sürdüğü Mie Teorisi ve sonradan geliştirilen diğer teoriler araştırmacıların nanopartiküllerin boyutunun tahmin edilmesini ve belirlenmesini sağlar. 1930'lu yılların başında Max Knott ve Ernst Ruska adlı iki Alman bilim insanı elektron mikroskobu adı verilen yeni bir mikroskop türü geliştirdiler. Bu aletin bulunması nano düzeyde araştırma yapacak alet ve cihazların gelişimi için önemli bir basamak olarak tarihe geçti. 1947 yılında minyatürleşme adına mikro elektriğin kapısını açan transistörler keşfedilmesi elektrik endüstrisinde önemli bir gelişme olarak kabul edilmektedir. 1953 yılında Nature Dergisinde James Watson ve Francis Crick adlı iki araştırmacının DNA'nın ikili sarmal yapısını tarif eden bir makalesi yayınlandı. Keşfedilen nano boyuta sahip bu molekül ilerleyen yıllarda yaşam bilimlerinde nano düzeyde yapıların geliştirilmesi yönünde ilham kaynağı olacaktır. Bu keşiften beş yıl sonra Sony'de çalışan Japon fizikçi Leo Esaki taramalı tünelleme mikroskobunu icat etmiş ve nanoelektronik için önemli bir temel atmıştır. (<http://www.discovernano.northwestern.edu/whatis/History/HistoryPopup>).

29 Aralık 1959 yılında Richard Feynman, Amerikan Fizik Cemiyeti'nin Kaliforniya Teknoloji Enstitüsü'ndeki toplantısında yaptığı 'Aşağıda daha çok yer var' (There is Plenty of Room at the Bottom) adlı konuşmasında ilk kez malzemelerin ve aygıtların nanometre aralığındaki özelliklerinin gelecekte fırsatlara olanak tanıyacağını söyledi. Böylece 20. yüzyılın son çeyreğinde, doğada bulunmayan yeni nanoyapıların atomsal düzeyde tasarlanarak sentezlenmesi devri başladı (Çıracı 2006, Ayhan 2004).

Nanoteknoloji kelimesi ilk defa 1974 yılında Norio Taniguchi tarafından Tokyo Bilim Üniversitesi'nde kullanılmıştır. Taniguchi'ye göre nanoteknoloji, malzemelerin atom atom ya da molekül molekül ayrılması, birleştirilmesi ve bozulmasıdır (Ayhan 2004).

Moleküler üretime ait temel fikirlere 1980'li yıllarda K. Eric Drexler 'Moleküler İmalata Yönelik Protein Tasarımı' adlı makalesinde yer verilmiştir. 1990'lı yılların başında Rice Üniversitesinde Richard Smalley ve arkadaşları tarafından 60 karbon atomunun simetrik biçimde sıralanmasıyla elde edilen futbol topu şeklindeki fulleren molekülleri geliştirildi. Elde edilen molekül 1 nm büyüklüğünde ve çelikten daha güçlü, plastikten daha hafif, elektrik ve ısıyı geçirebilen bir yapıya sahiptir. Bu araştırmacılar 1996 yılında Nobel Kimya ödülünü aldılar. 1991 yılında Japon NEC firması araştırmacılarından Sumio Iijima, karbon nano tüpleri buldu. Karbon nano tüpler, fullerene molekülünün esnetilmiş bir şekli olup benzer şekilde önemli özelliklere sahipti, çelikten 100 kat daha güçlü ve ağırlığı çeliğin ağırlığının 6'da 1'i kadardı (Ayhan 2004).

Nanoteknoloji devriminin insanlığın yakın geleceğinde yaratacağı değişiklik yalnızca ana hatları ile tahmin edilebilir. Nanobilim ve nanoteknoloji çeşitli alanlarda hızla günlük yaşantımıza girmiştir. Bu etki bilişim, haberleşme, savunma sanayi, uzay ve uçak teknolojileri, moleküler biyoloji ve gen mühendisliğine kadar uzanır.

Nanoteknoloji uygulamalarında materyal boyutları küçültülerek fiziksel özellikleri değiştirilir. Örneğin nanopartiküller çok büyük yüzey alanı/hacim oranına sahiptirler. Buna bağlı olarak floresans gibi optik özellikler partikül çapının bir fonksiyonu haline gelir. Nanopartiküller kullanılarak yapılan malzemelerde sertlik ve elastikiyet özellikleri değişir. Geleneksel polimerik yapıların nanopartiküller kullanılarak güçlendirilmesi

mümkündür. Nanoteknolojik olarak güçlendirilmiş materyallerin ağırlığı azalırken dayanıklılık ve fonksiyon çeşitliliği artmaktadır (Çorman 2010).

### 2.7.1. Nanomalzemeler

Nanoboyutlu malzeme olarak tanımlanan yapılar; nanokristaller, nanopartiküller, nanotüpler, nanoteller, nanoçubuklar ya da nano-ince filmler gibi farklı sınıflara ayrılmaktadır. Nanomalzemeler hem anorganik (metalik, seramik vb.) hem de organik (polimerik vb.) temelli olabilmektedirler. Nanoteknolojik yöntemlerle elde edilen ürünler elektronik, bilişim ve iletişim, tıp, yaşam bilimi, otomobil üretimi, savunma ve uzay, kimya, malzeme, enerji ve çevre gibi değişik alanlarda uygulama alanı bulunmaktadır (Tübitak, 2004, Vizyon 2023 Projesi Nanoteknoloji Strateji Grubu, Nanobilim ve Nanoteknoloji Stratejileri, Ankara).

### 2.7.2. Nanomalzemelerin üretim yöntemleri

Nanomalzemeler; metal, metal alaşımı, seramik ve polimer esaslı ya da bunların karışımından (kompozit) istenilen yüzey özelliklerine sahip bir şekilde hazırlanabilir. Nanomalzemelerin elde edilmesinde iki ana yöntem bulunur. Aşağıdan yukarıya (bottom-up) ve yukarıdan aşağıya (top down) olarak adlandırılan iki yaklaşım vardır (Gürmen ve Ebin 2008).

**a. Aşağıdan yukarıya (Bottom-up):** Aşağıdan yukarıya yaklaşım (küçükten büyüğe), moleküler nanoteknolojiyi ifade eder. Organik veya anorganik yapıları, maddenin en temel birimi olan atomlardan başlayarak atom atom, molekül molekül inşa edilmesi yöntemidir. Bu yaklaşımda nano malzemeler ve yapılar moleküllerin kendiliğinden bir araya gelip bağ oluşturması gibi termodinamik esaslara dayanan atomların ve moleküllerin bir araya gelmesiyle üretilir (Khademhosseini ve Langer 2007). Nano boyuttaki tek zincirli DNA molekülleri kullanılarak istenilen özellikte ve şekilde moleküller üretilir (Rothmund 2006). Aşağıdan yukarıya yaklaşımda, atomik veya moleküler boyuttaki yapıları kimyasal reaksiyonlar ile büyütürük partikül oluşumu

gerçekleştirilir. Bu yaklaşımda kimyasal buhar kaplama, kimyasal buhar yoğunlaştırma, sol-jel ve sprey piroliz yöntemleri kullanılır.

**b. Yukarıdan aşağıya (Top-down):** Yukarıdan aşağıya yaklaşım (büyükten küçüğe), makineler, asitler ve benzeri mekanik ve kimyasal yöntemler kullanılarak nano yapıların fabrikasyonu ve üretimidir. Yukarıdan aşağıya yaklaşımda hacimsel malzemeye dışarıdan mekaniksel ve/veya kimyasal işlemler ile enerji verilmesi sonucunda malzemenin nano boyuta kadar inebilecek küçük parçalara ayrılması esas alınır. Böylece moleküler boyutlarda çalışabilecek nano malzeme ve yapılar üretilebilir. Bilgisayar çipleri, veri toplama birimleri ve bilgisayarlarda kullanılan birleştirilmiş elektrik devreleri bu yöntem ile üretilmektedir. Yukarıdan aşağıya yaklaşımda mekanik öğütme ve aşındırma yöntemleri kullanılır (Gürmen ve Ebin 2008, Özkan 2006, Özer 2008).

### 2.7.3. Nanobiyoteknoloji

Modern bilim sayesinde biyolojik olaylara moleküler düzeyde bakılabilmekte böylece çok hızlı ve çok sayıda paralel ve/veya ard arda devam eden biyolojik reaksiyonları anlamaya ve buradaki bilgiler ile yaşam kalitesini arttıracak teknolojik gelişmeler sağlamaya çalışır. Yaşamla ilgili tüm bilgi DNA'dadır. Bu bilgi farklı şekillerde ürünlere dönüştürülür ve farklı fonksiyonları olan birçok biyolojik molekül yaşamla ilgili birçok fonksiyonu yerine getirir. DNA'da zamanla oluşabilecek değişiklikler (mutasyon), yanlış ürün (biyolojik molekül) üretimi nedeniyle biyolojik fonksiyonlar bozular. Böylece birçok farklı hastalık meydana gelir. Genetik değişikliklerin ve/veya oluşan biyolojik moleküllerin izlenmesi ile oluşan veya oluşabilecek hastalıkların izlenmesi, erken tanısı ve hastalıklara başlangıçta müdahale oldukça önemlidir. Biyolojik moleküllerin tanısında kullanılacak en duyarlı ve özgün yaklaşım, tanıyıcı olarak bu moleküllerin eşleniklerinin (DNA tek sarmalının eşleniği oligonükleotid, proteinin karşısı antibadi molekülü) kullanıldığı biyoafinite sistemlerinin (tanı kitleri, biyoçipler, biyosensörler) uygulanmasıdır.

Biyoteknoloji alanı, tıpta tanı ve tedavi, tarım, hayvancılık, endüstriyel ve gıda gibi birçok farklı alanda genetik modifikasyonlar ile ürün türünü, verimliliğini arttırmak ve

ekonomik üretim olanağı sağlamak yönünde kullanılmaktadır (Vizyon 2023 projesi nanoteknoloji strateji grubu, 2004).

## 2.8. Nanopartiküller

Nanopartiküller 10 – 1000 nm aralığındaki boyutlara sahip katı partikül ya da tanecikli çözelti olarak tanımlanmaktadır. Hazırlanma yöntemlerine göre, nanopartiküller, nanoküreler ya da nanokapsüller olarak adlandırılırlar. Nanokapsüller, tek bir polimer membran tarafından oluşturulan boşluklara etken maddelerin hapsedildiği ya da adsorbe olduğu sistemlerken, nanoküreler ise etken maddelerin düzgün olarak çözündüğü matriks sistemlerdir (Mohanraj ve Chen 2006).

Nano boyuttaki materyallerin tek-, iki- ve üç-boyutlu sınıflandırılması şu şekildedir: kuantum noktalar ya da nanokristaller, fullerenler, partiküller, kolloidler, çöktürücüler ve katalizörler üç-boyutlu nanometrik yapıları oluşturur. Nanotüpler, dendrimerler, nanoteller, fiberler ve fibriller iki boyutlu nanometrik yapılarırken, yüzey kaplamaları, ince filmler ve arayüzeyler ise tek boyutlu nanometrik yapılarıdır (Ostiguy ve ark. 2006).

Eş boyutlu olan nanopartiküller biyoetiketleme uygulamalarında uygundur. Biyolojik etiketleme, biyolojik veya moleküler kaplama, biyoorganik yüzeye sahip tabaka oluşturma nanopartiküllere bağlı olarak yapılmalıdır. Biyolojik kaplama; antibadileri, kollajen gibi biyopolimerleri ve küçük moleküllerin tek tabakalarını içermektedir (Salata 2004).

Nano boyuttaki yapıların özellikleri yığın materyalden ziyade her bir molekül ile doğrudan ilişkilidir. Bu durum nanopartiküllerin oldukça farklı özelliklerde olmasına yol açar. Nanopartiküllerin özelliklerinin değişmesinde iki temel faktör rol oynar. Bunlardan birincisi partikül boyutu ile reaksiyona girme yatkınlığı arasındaki ilişkidir. Partikül boyutu azaldıkça reaksiyona girme etkinliği artar (Ostiguy ve ark. 2006). Diğer faktör ise nanopartiküllerin yüzey alanı/kütle oranıdır. Bu diğer bileşiklerin adsorblanma ve taşınma kapasitesini artırır. Adsorplanmış bileşiklerin ve tepkenlerin bulunmasına bağlı olarak nanopartiküllerin termodinamik koşulları değişir. Öte yandan, nanopartiküller



geniş (fonksiyonel) yüzeye sahip oldukları için, ilaç, prob ya da protein gibi diğer bileşiklerin bağlanması, adsorpsiyonu ve taşınmasına olanak sağlar (Borm ve Kreyling 2004).

Nanopartiküller yüksek yüzey alanları nedeniyle birçok kullanım alanında büyük avantaj sağlar. Nanoparçacıkların boyutları azaldıkça, yüzeylerinin hacimlerine olan oranı artar. Özellikle adsorpsiyon gibi yüzeye ilgili fiziksel olaylarda yüksek yüzey alanı/kütle oranı sayesinde hem kapasitenin artmasına, hem de işlem sürecinin kısılmasına olanak sağlamaktadır. 100 nm'lik bir nanopartikülde yaklaşık olarak atomların % 60'ı partikül yüzeyinde bulunur. Nanopartiküller yüzeye ilgili; adsorpsiyon, katalizör uygulamaları, enzim immobilizasyonu, kontrollü ilaç salınımı, yüzey modifikasyonu, arıtım teknolojileri gibi yüzeysel etkileşime dayalı uygulamalarda büyük avantajlar sağlar (Chowdhury ve Yanful 2010, Menciloğlu 2008, Işık ve ark. 2012, Karakoç 2013).

Özelliklerinden dolayı nanopartiküller, yüksek aktiviteli katalizörler, optik uygulamalar için özel teknolojik malzemeler, süper iletkenler, aşınmaya karşı katkı maddeleri, yüzey aktif maddeler, ilaçtaşıyıcılar ve özel teşhis aletleri gibi birçok teknolojik ve farmakolojik ürünlerin hazırlanmasında kullanım alanı bulmaktadır. Öte yandan, malzemelerin nanoboyut seviyesinde kontrolü nanotaşıyıcılar, sensörler, nanomakineler ve yüksek yoğunluklu veri depolama hücreleri gibi kendine özgü işlevselliğe sahip minyatürleştirilmiş aygıtların geliştirilmesine de izin vermektedir (Gürmen ve Ebin 2008, Çorman 2010).

Polimerik nanopartiküller biyo-bozunur polimerlerden oluşmaktadır. Biyo-uyumluluk, doku mühendisliği, ilaç ve gen salınımı ve yeni aşılama stratejileri açısından son derece önemlidir. Çoğu biyo-bozunur polimerler poli(laktik asit), poli(laktid-ko-glikolid) gibi sentetik polimerlerden meydana gelmektedir. Ayrıca kitosan, jelatin, sodyum aljinat gibi doğal polimerler de bazı toksikolojik problemlerin giderilmesi için önemli polimerlerdir (Abhilash 2010).

Nanopartiküller spesifik fiziksel ve kimyasal özelliklerinden dolayı biyomedikal uygulamalarda son yıllarda oldukça yaygın kullanılmaktadırlar. Nanopartiküller yığın

materyaller ile kıyaslandığında normal biyolojik aktiviteyi değiştirme özelliğine sahiptir (Yildirimer ve ark. 2011). Nanopartiküllerin bu alanda kullanımının artması ile bu tür partiküllerin insan sağlığı üzerine etkisi de artmaktadır. Bu nedenle yeni düzenlenmelerin ve uyarlamaların yapılması gerekmektedir (Lövestam ve ark. 2010).

Nanopartiküllerin biyolojik sistemlerde birçok kullanım doku ya da hücre ile etkileşimde bulunması, kromatografi veya sensör gibi alanı vardır. Bu nedenle nanopartiküllerin boyutu ve sentez yöntemleri değişmektedir (Moreno-Vega ve ark. 2012).

### **2.8.1. Nanopartikül Sentez Yöntemleri**

Nanopartiküller 100 nm'den küçük ve boyutlarına özgü özelliklere (elektron tutucu etki, geçici mıknatıslık özelliği, yüzey plazmon rezonansı gibi) sahip bileşiklerdir. Boyutları ve bu özellikleri nedeniyle biyolojik sistemlere kolayca entegre olabilirler. Biyoölçümler için ilk nanopartikül uygulamaları 1970'lerde 5-50 nm çaplı kolloidal altın kullanımı ve elektron mikroskop için immunositokimyasal prob kullanımı ile başlamıştır (Hayatt 1989). Araştırmalar peptid, protein ve nükleik asit gibi biyolojik moleküllere bağlanabilen ve optik, elektronik ve manyetik özelliklere sahip nanopartiküllerin geliştirilmesi üzerinde yoğunlaşmıştır. şu anda üzerinde çalışılan konu süspansiyon içinde yer alan nanopartiküllerdir.

Nanopartiküller günümüzün son teknolojisini oluşturmaktadır. Ancak nanopartiküller şu anda var olan teknolojilere göre daha iyi ölçüm performansı, kullanım kolaylığı ve daha ucuz fiyat olanakları sağladığı zaman biyoölçümler için geçerli olacaktır. Nanopartiküller daha geniş üretim hacmi ve dağıtım kapasitesine ulaşılabildiğinde ve geniş kitleler tarafından ticari olarak eldesi mümkün olduğunda biyoölçümler için rutin olarak kullanılabilir hale gelecektir (Portakal 2008).

Nanokapsül hazırlanması için, aktif madde sentetik ya da doğal bir polimer içine hapsedilir. Eğer nanoküre hazırlanacaksa aktif madde hazırlanan nanopartikül yüzeyine adsorbe edilir ya da polimerik yapı içinde çözünerek bir matriks yapısı oluşturulur. Nanopartikül hazırlanmasında kullanılan polimerler doğal polimerler ve sentetik

polimerler olmak üzere ikiye ayrılır. Albümin, jelatin gibi proteinler ve aljinat, kitosan ve dekstran gibi polisakkaritler doğal polimerleri oluşturur. Sentetik polimerler ise önceden sentezlenen (polianhidrit, polikaprolakton (PECL), polilaktik asit (PLA), polilaktik-koglikolik asit (PLGA)) ve nanopartikül hazırlanması sırasında sentezlenenler (polisiyanoakrilat (PACA), polibütül-siyano-akrilat (PBCA)) şeklinde ikiye ayrılır.

İlk nanopartiküller, albumin gibi doğal ve poli(akrilamid), poli(metil metakrilat) gibi biyolojik olarak parçalanmayan sentetik polimerlerden hazırlanmıştır. Protein bazlı polimerlerin dezavantajı bu polimerik yapılara karşı gelişen antijenik yanıtlardır. Biyolojik olarak parçalanmayan sentetik polimerlerin en önemli dezavantajı ise toksisite riskleridir. Son yıllarda polisakkaritler peptit, protein ve nükleik asitlerin taşınmasında kullanılmaktadır. Nanopartikül sentez yöntemleri aşağıda sıralanmıştır (Calvo ve ark. 2001, Friese ve ark. 2000, Lockman ve ark. 2003, Tosi ve ark. 2005):

1. Misel Polimerizasyonu
2. Emülsiyon Polimerizasyonu
3. Emülsiyon-Çözücü Buharlaştırma Yöntemi
4. Nanoçöktürme Tekniği
5. Yüzeyleyarak Polimerizasyon
6. Aktif Maddenin Nanopartiküllere Adsorpsiyonu
7. Su/Yağ Emülsiyonunda Isı Denatürasyonu ve Çapraz Bağlanma
8. Sıcak Mikroemülsiyon Öncülleri ile Hazırlama

## **2.9. Biyosensör uygulamaları için moleküler baskılanmış polimerler**

Moleküler baskılama, polimer ile matrikste spesifik tanıma bölgelerinin hazırlanmasına olanak vermesinden dolayı endüstri, diagnostik ve çevre analizleri için güçlü sensörlerin geliştirilmesinde kullanılmaktadır. Bu sensörlerde, moleküler baskılanmış polimerler kantitatif analizler için uygun dönüştürücüler (transdüserler) ile birleştirilmiştir (Yano ve Karube 1999).

Biyosensörler diagnostik, çevresel görüntüleme ve gıda proseslerinde oldukça yaygın kullanım alanlarına sahiptir (Chen ve Karube 1992, Karube ve ark. 1995). Spesifik hedef molekülü tanımlarından dolayı mikroorganizma, antibadi ya da enzimler gibi birçok farklı biyolojik molekül biyosensörlerde biyolojik tanıma katmanı olarak kullanılabilir. Buna rağmen, yüksek sıcaklık, pH ve organik çözücüler ile muamelede bozulma özelliklerinden dolayı biyolojik moleküllerin pratik olarak kullanımı oldukça zordur.

Moleküler baskılama tekniğinin gelişmesi polimerik matrikste hedef moleküle özgü tanıma ve katalitik bölgelerin oluşturulması enzim, antibadi, mikroorganizma gibi doğal biyomoleküllere alternatif olmuştur. Biyosensörlerde biyolojik moleküllerin yerine MIPIlerin geçmesi oldukça kararlı sensörlerin geliştirilmesine olanak sağlamıştır. MIPIler doğal tanıma elementlerinin olmadığı durumlarda tek alternatiftir.

MIPIler yüksek özgüllük ve kararlılığından dolayı sensör teknolojisinde enzim, antibadi ve diğer doğal reseptörlere alternatif olarak kullanım alanı bulmuştur. MIP sensörlerin hazırlanmasında üç önemli nokta bulunmaktadır:

- Yüksek duyarlı dönüştürücünün (transdüser) geliştirilmesi, bağlanma işleminin görüntülenmesi ve bunun işlenebilir sinyale dönüştürülmesi,
- Uygun koşullar altında ve gerekli afinite ve özgüllükte hedef molekül (analit) ile bu moleküle özgü tanıma bölgeleri içeren baskılanmış polimerlerin birbirleri ile etkileşimlerinin geliştirilmesi,
- MIPin dönüştürücüye entegre edilmesi

MIP sensörlerin geliştirilmesinde üç ana tür vardır: a) afinite sensörleri, b) reseptör sensörleri ve c) katalitik sensörler (Piletsky ve Turner 2002).

Moleküler baskılanmış immünosensör benzeri afinite sensörleri ilk kez Tabushi ve arkadaşları (1987) tarafından geliştirilmiştir. Bu araştırmacılar yaptıkları çalışmada kalay dioksit ve silikon dioksit varlığında oktadesilklorosilanın kemisorpsiyonunu gerçekleştirmişlerdir.

Tek tabakaların hazırlanmasında kullanılan moleküler baskılama tekniği ile, fenilalanine özgü indiyum oksit (InO<sub>2</sub>) elektrodları hazırlanmıştır (Starodub ve ark. 1993). Bu yöntem nükleik asitlerin, kolesterolün (Piletsky ve Starodub 1992) ve katekol türevlerinin (Morita ve ark. 1997) belirlenmesinde geliştirilen sensörlerde kullanılmıştır.

Geleneksel üç-boyutlu polimerler sensörlerin tasarlanmasında sıklıkla kullanılırlar. Bu nedenle fenol ve anilin için geliştirilen amperometrik sensörlerde polianilin baskılanmış polimerler kullanılmıştır (Piletsky ve ark. 1994). Metal iyonları için spesifik potansiyometrik sensörler Murray ve çalışma arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (Murray ve ak. 1997). Bu çalışmada yüksek duyarlılıkta ve yüksek seçicilikteki MIP sensörlerin, kompleks bir ortamda kalay ve uranil iyonlarının analizi için uygun olduğu rapor edilmiştir.

Yapılan bir başka çalışmada, morfin-duyarlı sensör geliştirilmiş, polimer boncukların bulunduğu agaroz membran ile kaplı elektrod tarafından seçici olarak absorblanabildiği gösterilmiştir. Bu çalışmada hazırlanan sensörün morfin için yüksek seçicilikte (0,1 – 10 mg/L), dengeli ve ağır kimyasal çevreye karşı dirençli bir sensör olduğu rapor edilmiştir. Yarışmacı molekül olarak elektroaktif yarışmacı molekül (kodein) kullanılmış ve morfin örneğinin morfin elektro-oksidasyonuna bağlı olarak akımda artış gözlenmiştir (Kriz ve Mosbach 1995).

Tüm analitlerin kolayca indirgenmemesi ve yükseltgenmemesi nedeniyle amperometrik sensörle belirlenemez. Ligant-polimer bağlanma olaylarının miktarının belirlenmesi ve ölçümünde MIPIlerin non-spesifik elektro-aktif belirleyiciler olarak kullanımı araştırılmıştır (Piletsky ve ark. 1992). MIPIlerin non-spesifik belirleyici moleküllerin yerini almasıyla multi-sensör sistemleri gelişmektedir.

Afinite sensörleri, optik absorbans, floresans ya da elektrokimyasal aktivite gibi spesifik özelliklere sahiptir (Kroger ve ark. 1999). İnert hedef molekülün doğrudan ölçümünde reseptör sensörleri kullanılır. Hedef molekülün bağlanmasıyla meydana gelen konformasyon ya da yüzey potansiyelindeki değişim özelliğinden dolayı MIPIler uyarılır (Piletsky ve ark. 1992, Yoshimi v ark. 2001, Piletsky ve ark. 1994, Hedborg ve ark. 1993,

Cheng ve Wang 2001). Genellikle, MIP sensörler membrandaki elektro-iletkenlik değişimini ölçer, hedef molekülün bağlanmasıyla MIPlerde spesifik bir etkileşim gözlenir. L-fenilalanin, kolesterol (Piletsky ve ark. 1994), şekerler (Piletsky ve ark. 1998) ve atrazin (Sergeyeva ve ark. 1999) için spesifik olan sensörler, mikromolar-nanomolar aralığında yüksek seçicilik ve duyarlılık gösterir.

Bir diğer yaklaşım da reseptör-taklit eden MIPlerin kapasitans (direnç) ölçümüne dayanan sensörlerin tasarlanmasıdır (Hedborg ve ark. 1993, Cheng ve ark. 2001). Bu tür çalışmalara verilebilecek ilk örnek SiO<sub>2</sub> kaplı silikon levhaların (wafers) bulunduğu MIP membranların algılama tabakası olarak kullanıldığı çalışmalardır (Hedborg ve ark. 1993).

MIPlerin sensör teknolojisindeki kullanımları kullanılan dönüştürücülere göre Çizelge 2.9.1'de özetlenmiştir. Metotlar genellikle florimetre ve optik tanıma dayanan yöntemlerdir.

**Çizelge 2.9.1. MIPlerin sensör teknolojisindeki kullanımları**

Sınıf	Analit tipi	Fonksiyonel monomer	Tanıma aralığı	Referans
Florimetri	Triazin	MAA	0,01-100 mM	Piletsky ve ark. 1997
	Sialik asit	Allilamin + TVPhB	0,5-10 µM	Piletsky ve ark. 1996
	Dansil-L-fenilalanin	MAA, 2VPy	0-30 µg/mL	Kriz ve ark. 1995
	Piren	Aromatik poliüretan	40 µg/L	Dickert ve ark. 1998
	cAMP	DMASVBP + HEMA	0,1-100 µM	Turkewitsch ve ark. 1998
	NATA	HEAPTES + TES	Kalitatif	Lulka ve ark. 1997
Kondüktometri	Atrazin	DEAEM	0,01-0,5 mg/L	Piletsky ve ark. 1995
	Sialik asit	Allilamin + TVPhB	1-50 µM	Piletsky ve ark. 1998
	Morfin	MAA	Kalitatif	Kriz ve ark. 1995
	L-fenilalanin	DEAEM	0,05-0,4 mM	Piletsky ve ark. 1994
Optik	Kloramfenikol	DEAEM	1-1000 µg/mL	Levi ve ark. 1997
	Kloramfenikol	DEAEM	3-30 µg/mL	McNiven ve ark. 1998
Potansiyometri	Fenilalanin anilid	MAA	33-3300 µg/mL	Andersson ve ark. 1990
Kapasitans	Fenilalanin anilid	MAA	Kalitatif	Hedborg ve ark. 1993
Amperometri	Morfin	MAA	0,1-10 µg/mL	Kriz ve Mosbach 1995
SAW, QMB	<i>o</i> -Ksilen	Aromatik poliüretan	Kalitatif	Dickert ve ark. 1998
Lüminesans	PMP	EuIII + DVMB	0,125-15.10 <sup>4</sup> µg/L	Jenkins ve ark. 1997
pH	Glukoz	STACNCu	0,25 mM	Chen ve ark. 1997
SPR	Teofilin	MAA	0,4-6 mg/mL	Lai ve ark. 1998

cAMP: adenozin 3P:5P-siklik monofosfat; DEAEM: dietilaminoetil metakrilat; DMASVBP: trans-4-[p-(N,N-dimetilamino)stiril ]-N-vinilbenzilpiridinium klorür; DVMB: 3,5-metil divinil benzoat; HEAPTES: bis(2-hidroksietil)-aminopropiltrioksasilan; HEMA: 2-hidroksietil metakrilat; MAA: metakrilik asit; NATA: N-asetiltriptofanamid; PMP: pinakolil metil fosfonat; QMB: kuvars mikrobals; SAW: yüzey akustik dalga; SPR: yüzey plazmon rezonans; STACNCu: Cu[1-(4P-vinilbenzil)-1,4,7-triazasiklononan]SO<sub>4</sub>; TES: tetraethoksisilan; TVPhB: tris(4-vinilfenil)boroksin; 2VPy; 2-vinilpiridin.

### 2.9.1. MIP temelli UA sensörler

Son yıllarda moleküler baskılanmış polimerler (MIP), çeşitli elektroaktif özelliklerinden dolayı, özellikle biyomoleküllerin belirlenmesi amacıyla analitik gereçler olarak kullanım alanı bulmaktadırlar. MIP sensörler, enzimleri taklit edebildikleri ve enzim gibi reaksiyonu katalizleme görevi yapabildikleri için enzim temelli sensörlerin yerine geçmişlerdir. Ayrıca enzimlere göre düşük maliyetli ve yüksek termal ve kimyasal kararlılığa sahip olmalarından dolayı büyük bir avantaj sağlamaktadır (Chen ve ark. 2010).

Moleküler baskılama tekniği, moleküler tanıma bölgeleri içeren polimer matrikslerin hazırlanmasında oldukça kullanışlı bir yöntemdir. Bu matriksler polimerizasyon işlemi süresince hedef moleküllerin ortama eklenmesiyle oluşur. Moleküler baskılanmış polimerler, kromatografi, katalist, ilaç salınımı, yapay antibadi ve tanıma olaylarında oldukça yaygın kullanım alanı bulmaktadır. Sıvı kromatografisinde kullanılan MIPler özellikle enantiyomerlerin ayırımında durağan faz olarak kullanılmaktadır. Moleküllerin adsorpsiyonunun ya da bağlanmasının izlendiği dedeksiyon tekniklerinde ise elektrokimyasal, piezo-elektrik, impedans ve optik metotlar kullanılmaktadır (Chen ve ark. 2009).

UA için yapay reseptör görevi gören silika jel-bağlı moleküler baskılanmış polimer [poli(melamin-co-kloranil)], kolon kromatografisinde MIP-katı-faz ekstraksiyon (MISPE) için sorbent olarak kullanılmıştır. MIP-modifiye civa damla elektrodun ((HMDE) kullanıldığı sensör sistemi MISPE ile birleştirilmiştir. MISPE materyali ürik asidin ön-deriştirilmesi ve voltametrik sensörde tanıma reseptörü olarak görev almaktadır. Yalnızca MIP-modifiye HMDE sensörün kullanıldığı sistemde tayin limiti 0,024 mg/L iken MISPE-MIP-modifiye HMDE sensörde tayin limiti 0,0008 mg/L olarak bulunmuştur (Prasad ve ark. 2007).

Chen ve Ho tarafından yapılan çalışmada, UA baskılanmış poli(N,N-bis(4-aminofenil)-N',N'-difenil-1,4-fenilendiamin)-(3,3',4,4'-benzo-fenonetetra karboksilik dianhidrit) [poli(PD-BCD)] UA sensörü hazırlanmış ve amperometrik ölçümler alınmıştır. Elde



edilen sonuçlara göre, baskılama verimi (MIPin duyarlılığı/NIPin duyarlılığı) 3,7 olarak, tayin limiti ise  $2,4 \times 10^{-3}$  mM olarak bulunmuştur (Chen ve Ho 2007).

Moleküler baskılanmış poli-metakrilik asit (PMAA) sentezlenerek, çok-duvarlı karbon nanotüp (MWCNT) yüzeyinde polimerizasyonu sağlanmıştır. Farklı derişimlerdeki UA'in polimere adsorpsiyonu gerçekleştirilmiş ve 60 dakikalık adsorpsiyon sonunda ortamdaki UA miktarı UV-GB spektrometresi ile 292 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Elektrokimyasal testlerin yapılabilmesi için amperometrik deneyler gerçekleştirilmiş ve 80-800  $\mu$ M derişim aralığındaki UA çözeltileri 0,4 V potansiyelde ölçümler alınmıştır. 80-500  $\mu$ M aralığında doğrusallık iyiyken, 800  $\mu$ M'a doğru ilerledikçe doğrusallıktan sapmalar gözlenmiştir. Seçici molekül olarak yalnızca AA kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, baskılama verimi 4,41 olarak elde edilirken LOD miktarı 22  $\mu$ M olarak bulunmuş ve hazırlanan elektrokimyasal sensörün insan serumunda UA tayininde kullanılabileceği önerilmiştir (Chen ve ark. 2009).

UA baskılanmış poli(N,N-bis(4-aminofenil)-N',N'-difenil-1,4-fenilendiamin)-(3,3',4,4'-benzofenonetetra karboksilik dianhidrit) [poli(PD-BCD)], elektrokimyasal sensör olarak kullanılmıştır. UA'in amperometrik tayini sonucunda tayin limiti 0,3  $\mu$ M olarak bulunmuştur. Baskılanmış ve baskılanmamış elektrotların seçicilik değerleri kıyaslandığında baskılanmış elektrot için seçicilik değeri 28,76 iken baskılanmamış elektrot için 8,85 olarak bulunmuştur (Chen ve ark. 2010).

Motghare ve arkadaşları (2015) tarafından fonksiyonel monomer olarak akrilik asidin kullanıldığı ve termal polimerizasyon ile sentezlenen UA baskılanmış polimeri karbon pasta elektroduna modifiye edilmiş ve voltametrik olarak UA tayini gerçekleştirilmiştir. Glukoz, laktoz, glisin, triptofan ve AA'in girişim etkisi incelenirken, elde edilen sonuçlara göre tayin limiti 0,1  $\mu$ M olarak bulunmuştur (Motghare ve ark. 2015).

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

L-sistein metilester hidroklorür ( $C_4H_9NO_2S.HCl$ )	Aldrich	410209
Ürik asit ( $C_5H_4N_4O_3$ )	Sigma	U0881
L-askorbik asit	Sigma	A5960
Üre	Sigma	U-5378
Teofilin	Sigma	T1633
Sodyum sülfat (susuz)	Acros Organics	196640010
Polivinil alkol (PVA)	Aldrich	341584
Metakrilolil klorür ( $C_4H_5ClO$ )	Fluka	64120
Etil alkol ( $C_2H_5OH$ )	Merck	1.00986
Sülfürik asit ( $H_2SO_4$ )	Fluka	84721
Amonyak ( $NH_3$ )	Merck	1.05422
Demir (III) nitrat nonahidrat ( $Fe(NO_3)_3.9H_2O$ )	Sigma-Aldrich	31233
Etilenglikol dimetakrilat ( $[H_2C=C(CH_3)CO_2CH_2]_2$ )	Sigma-Aldrich	33568-1
Hidroksietil metakrilat ( $C_6H_{10}O_3$ ) (HEMA)	Merck	8.00588
Hidroklorik asit (HCl)	Carlo Erba	7647-01-0
Sodyum dodesil sülfat (Sodosil <sup>®</sup> 02, SDS)	Riedel-de Haen	16167
Diklormetan ( $CH_2Cl_2$ )	Riedel-de Haen	24333
2-Propen-1-tiyol ( $C_3H_6S$ )	Fluka	06030
Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ )	Merck	1.08597
Trietilamin ( $C_6H_{15}N$ )	Across Organics	157910010
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck	1.06462
Sodyum bikarbonat ( $NaHCO_3$ )	Sigma	S5761

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. N-Metakriloil-amidosistein metil ester (MAC) monomerinin sentezi

N-metakriloil-amidosistein metil ester (MAC) monomerinin sentezi için; 75 mL diklorometan ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) içerisinde çözülen 25 mmol L-sistein metil ester üzerine 52,4 mmol trietilamin  $0\text{ }^\circ\text{C}$  ve azot atmosferi altında yavaşça ilave edildi. Diklorometan (25 mL) içinde çözülmüş metakriloil klorür (25 mmol) çözeltisi hazırlanan birinci çözeltiliye azot atmosferi altında yavaşça eklendi ve 30 dakika boyunca  $0\text{ }^\circ\text{C}$ 'de, daha sonra oda sıcaklığında 1 gece karıştırıldı. Elde edilen karışım etil asetat ile yıkandı ve çözücü evaporatörde uzaklaştırıldı.

### 3.2.2. N-Metakriloil-amidosistein metil ester (MAC) monomerinin karakterizasyonu

#### 3.2.2.1. Fourier transform infrared spektrofotometre (FTIR) analizi

Sentezlenen fonksiyonel monomerin (MAC) kimyasal yapı analizi FTIR spektrofotometresi (Perkin Elmer, Spectrum 100, USA) ile yapıldı.

#### 3.2.2.2. Nükleer manyetik rezonans (NMR) analizi

Sentezlenen fonksiyonel monomerin (MAC) yapısal karakterizasyonu NMR (Varian AS 400 MHz) ile gerçekleştirildi.

#### 3.2.3. MAC- $\text{Fe}^{3+}$ -UA ön-kompleksinin hazırlanması

Ön-kompleksin hazırlanması için ilk önce N-metakriloil-amidosistein metil ester (MAC) monomeri (2 mmol) ile  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  (1 mmol) 15 mL etil alkol içerisinde çözüldü. Daha sonra kalıp molekül (2 mmol UA) MAC- $\text{Fe}^{3+}$  karışımına hızlıca eklendi. Karışımın pH'ı ön-kompleksin oluştuğu pH aralığına getirildi ve 3 saat boyunca 260 rpm'de oda sıcaklığında karıştırıldı. Hazırlanan ön-kompleks süzüldü, % 99'lük etil alkol (250 mL)

ile yıkandı ve vakum etüvünde (100 mmHg basınç altında) 50 °C'de 24 saat boyunca kurutuldu.

#### **3.2.4. UA baskılanmış nanopartiküllerin sentezi ve karakterizasyonu**

Ürik asit (UA) baskılanmış nanopartiküller emülsiyon polimerizasyonu tekniğiyle hazırlandı. Bu teknikte iki ayrı su fazı ve yağ fazı hazırlandı. Birinci sulu fazda 5 mL saf suda 93,8 mg polivinil alkol (PVA), 14,43 mg sodyum dodesil sülfat (SDS) ve 11,73 mg NaHCO<sub>3</sub>, ikinci sulu fazda ise 100 mL saf suda 50 mg PVA ve 50 mg SDS çözüldü. Yağ fazını hazırlamak için MAC-Fe<sup>3+</sup>-UA kompleksi, HEMA ve EGDMA birlikte 20 dakika boyunca 25 000 rpm'de homojenize edildi ve yağ fazı birinci sulu faza eklendi. Karışımı hazırlamak için ikinci sulu faz, 57,5 mg NaHSO<sub>3</sub> ve 63 mg amonyum persülfat (APS) ilave edildi. Polimerizasyon karışımı 40 °C'de 6 saat bekletilerek gerçekleştirildi. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra reaksiyona girmemiş monomerlerin uzaklaştırılması için nanopartiküller etanol ve su ile yıkandı. Kalıp molekülün (UA) uzaklaştırılması için nanopartiküller pH: 4 tamponu ile 3 defa yıkandı. Her bir yıkamanın ardından polimer 14 000 rpm'de 2 saat boyunca santrifüjlendi ve süpernatantın 286 nm'de UV-GB spektrofotometresinde absorbansı ölçülerek ortamdaki UA miktarı takip edildi. Kalıp molekül tamamen uzaklaştırıldıktan sonra polimer saf su içerisinde 4 °C'de muhafaza edildi. UA baskılanmamış nanopartiküller, UA eklenmeden aynı yöntem kullanılarak sentezlendi. MAC-Fe<sup>3+</sup> ve MAC-Fe<sup>3+</sup>-UA kompleksleri FTIR tekniği kullanılarak karakterize edildi.

##### **3.2.4.1. Elementel analiz**

UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartiküllerin % C, % N ve % S içeriği elementel analiz ile belirlendi. Analizler Leco Elemental Analyzer (CHNS-932, St. Joseph, MI) cihazı ile gerçekleştirildi.

#### **3.2.4.2. Enerji dağılımlı x-ışınları analizi (EDS)**

UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartiküllerin küçük bir alanda elementel kompozisyonunu tanımlamak için enerji dağılımlı X-ışınları analizi yapıldı. Yöntemde enerji dağılım spektrometre (EDS) bağlantısı olan elektron mikroskobunda (SEM) (Carl Zeiss Evo 40, Almanya) yapılan analiz, örnek üzerine taramalı bir elektron demeti düşürülerek gerçekleştirilir. Bu elektronların bazıları örnekteki elektronlar ile çarpışarak elektronların yörüngelerinden çıkması sağlar. Boşalan pozisyonlar X-ışınları yayan yüksek enerjili elektron tarafından doldurulur. Toz halindeki UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartiküller EDS ile analiz edilerek yüzeyin elementel kompozisyonu belirlendi.

#### **3.2.4.3. Yüksek çözünürlüklü taramalı elektron mikroskobu (FE-SEM) analizi**

UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartiküllerin morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (FE-SEM) (QUANTA 400F Field Emission SEM, Oregon, ABD) kullanılarak incelendi. Analiz edilecek nanopartiküller ilk olarak vakum yüksek çözünürlüklü altında çok ince bir altın tabaka (100 Å) ile kaplandı ve farklı büyütme oranlarında görüntüleri alındı.

#### **3.2.4.4. Geçirimli elektron mikroskobu (CTEM) analizi**

UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartiküllerin morfolojisi yüksek çözünürlüklü kontrastlı geçirimli elektron mikroskobu (CTEM) (FEI Tecnai G<sup>2</sup> Spirit Biotwin, Hillsboro, ABD) kullanılarak incelendi. Kurutulmuş poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartiküller etanol ile birlikte eppendorf tüpün içerisine konuldu. Süspansiyon içindeki katı numune tam olarak homojen bir şekilde dağılana kadar ultrasonik su banyosu içerisinde tutuldu. Karbon kaplı ızgara (grid) cımbız ile tutulup sabitlendi. Elde edilen süspansiyon mikropipet yardımıyla sabitlenmiş olan karbon kaplı ızgara üzerine 10 µL olacak şekilde damlatıldı. Karbon kaplı ızgara üzerine konulan nanopartiküller kuruyana kadar bekletildi. Mikroskopta aydınlık alan kırınım görüntülemesi yöntemi kullanılarak nanopartiküllerin CTEM görüntüleri alındı.

### 3.2.5. UA baskılanmış SPR sensörün hazırlanması ve karakterizasyonu

#### 3.2.5.1. SPR altın çip yüzeyinin modifikasyonu

SPR çipin altın kaplı yüzeyi allil merkaptan ( $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{SH}$ ) ile modifiye edildi. Modifikasyon öncesi altın yüzey (SPRchip<sup>TM</sup>, Amerika Birleşik Devletleri) (Şekil 3.2.5.1.1.) bazik pirana çözeltisi ( $\text{NH}_3:\text{H}_2\text{O}_2$ ; 3:1 (v/v)) ile temizlendi. Yüzeyi temizlenen SPR çip 3 mM allil merkaptan içeren 5 mL etil alkol:d.H<sub>2</sub>O (4:1) çözeltisi içerisine daldırıldı, 12 saat boyunca çözelti içerisinde bekletildi. Çözeltiden çıkarılan altın çip, saf etil alkol ile yıkandı ve vakum etüvünde (200 mmH, 40 °C), 3 saat kurutuldu.



Şekil 3.2.5.1.1. GWC SPRimager II sisteminde kullanılan SPRchip<sup>TM</sup> altın çip (Osman 2011)

#### 3.2.5.2. SPR altın çip yüzeyine poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartiküllerin kaplanması

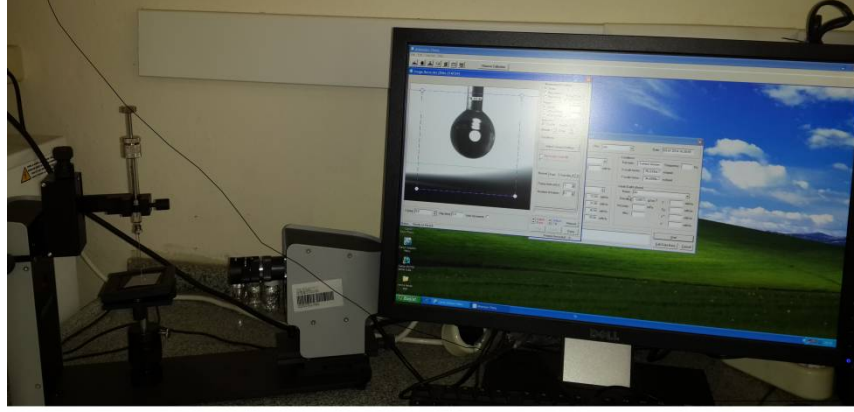
Allil merkaptan ile modifiye edilmiş olan SPR altın çip yüzeyine 1/200 oranında seyreltilmiş 100 µL poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartikül çözeltisi damlatıldı (Şekil 3.2.5.2.1). Tozsuz ortamda 37 °C'de 6 saat kurutuldu. Nanopartiküllerle (UA baskılanmış-MIP ya da UA baskılanmamış-NIP) kaplanmış SPR altın çip yüzeyi sırasıyla deiyonize su ve saf etil alkol ile yıkandı ve vakum etüvünde (200 mmHg, 40°C) kurutuldu.



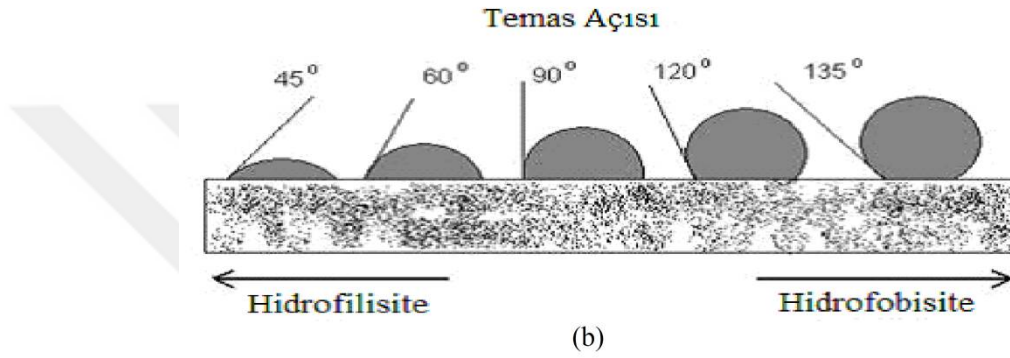
**Şekil 3.2.5.2.1.** Poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartiküllerin SPR sensör yüzeyine kaplanması

### 3.2.5.3. Temas açısı analizi

Temas açısı ölçümleri Attension KSV Instruments (Finlandiya) cihazı ile gerçekleştirildi (Şekil 3.2.5.3.1). Analizde, SPR altın çip, allil merkaptan ile modifiye edilmiş altın çip ve UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartikül kaplı SPR altın çip yüzeyine 1 damla su damlatılarak yapışık damla (Sessile Drop) yöntemi kullanıldı. Yüzeyin 5 farklı bölgesi kullanılarak 40 ayrı fotoğraf çekildi ve her biri için ayrı temas açısı belirlendi. Damlacığın sağ ve sol tarafından alınan temas noktaları, temas açıları olarak belirlendi. Her iki noktanın ortalaması alınarak ortalama temas açısı değerleri elde edildi. Altın yüzey, allil merkaptan ile modifiye edilmiş altın yüzey ve UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartikül kaplanmış sensör yüzeyleri için temas açısı değerleri ayrı ayrı ölçüldü. Di-iyodometan, etilen glikol ve formamid damlatılarak her üç yüzeyin 5 farklı bölgesi kullanılarak 40 ayrı fotoğraf çekilerek yüzeyle yapılan temas açıları belirlendi. Asit-baz metodu kullanılarak yüzey serbest enerjileri (SFE) hesaplandı.



(a)



(b)

**Şekil 3.2.5.3.1. (a)** Temas açısı ölçüm prensibi ve **(b)** damlaların hidrofilik ya da hidrofobik olmasına bağlı olarak ölçülen temas açılarının şematik gösterimi

#### 3.2.5.4. Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) analizi

Allil merkaptan ile modifiye edilmiş altın yüzey, UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartikül kaplanmış SPR altın çip yüzeyinin karakterizasyonu için atomik kuvvet mikroskobu (Nanomagnetics Instruments, Ambient AFM/MFM, Oxford, İngiltere) yarı degen modda kullanıldı. Görüntüleme çalışmaları hava ortamında gerçekleştirildi. Atomik kuvvet mikroskobu, serbest kantileverli interferometre özelliği ile 4096 x 4096 piksel gibi çok yüksek çözünürlükte ölçüm alabilmektedir. Salınım rezonans frekansı, 289 kHz olarak uygulandı. Salınım genliği 2,10 VRMS'dir. Örneklerden 0,7 µm/s tarama hızında, 256 x 256 piksel çözünürlükte, 1 x 1 µm<sup>2</sup>'lik alanların görüntüsü alındı.



### **3.2.5.5. Zeta boyut dağılımı analizi**

Sentezlenen UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartiküllerin boyut dağılımı analizi, Nano Zetasizer (NanoS, Malvern Instruments, Londra, İngiltere) ile belirlenmiştir. Zeta boyut analizi, ışık saçılması tekniği ile ölçüm yapan partiküllerin hidrodinamik boyutu (0,6 nm-6,0 µm aralığında), zeta potansiyeli (maksimum iletkenlik 200 mS) ve molekül ağırlığının (1x10<sup>3</sup>-2x10<sup>7</sup> aralığında) tayinine olanak sağlayan bir sistemdir. Zeta boyut analizi için izlenen deneysel yöntem şu şekildedir; nanopartikül çözeltisi (3 mL) boyut analizörünün örnek yuvasına yerleştirilmiştir. Işık saçılması 90°'lik geliş açısında 25 °C'de tayin edilmiştir. Veri analizi için, deiyonize suyun yoğunluğu (0.88 mPa.s) ve kırınma indeksi (1,33) kullanılmıştır. Işık saçılma sinyali partikül sayısı (partikül sayısı/s) olarak hesaplanmıştır. Örnekteki nanopartikül yoğunluğu yeterli yoğunluktadır.

### **3.2.5.6. Optik profilometre ile poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartikül kaplama kalınlığının ölçümü**

SPR altın çip yüzeyindeki poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartikül kaplama kalınlığı Zeta Instruments (San Jose, CA, ABD) optik profilometre cihazı ile ölçüldü. 100 kat büyütme optik lens kullanılarak yüzey görüntüleri alındı. Cihazla birlikte verilen yazılım kullanılarak kaplama kalınlığı belirlendi.

## **3.2.6. Yüzey plazmon rezonans sistemi ile kinetik analizler**

### **3.2.6.1. SPR sisteminin analiz için hazırlanması**

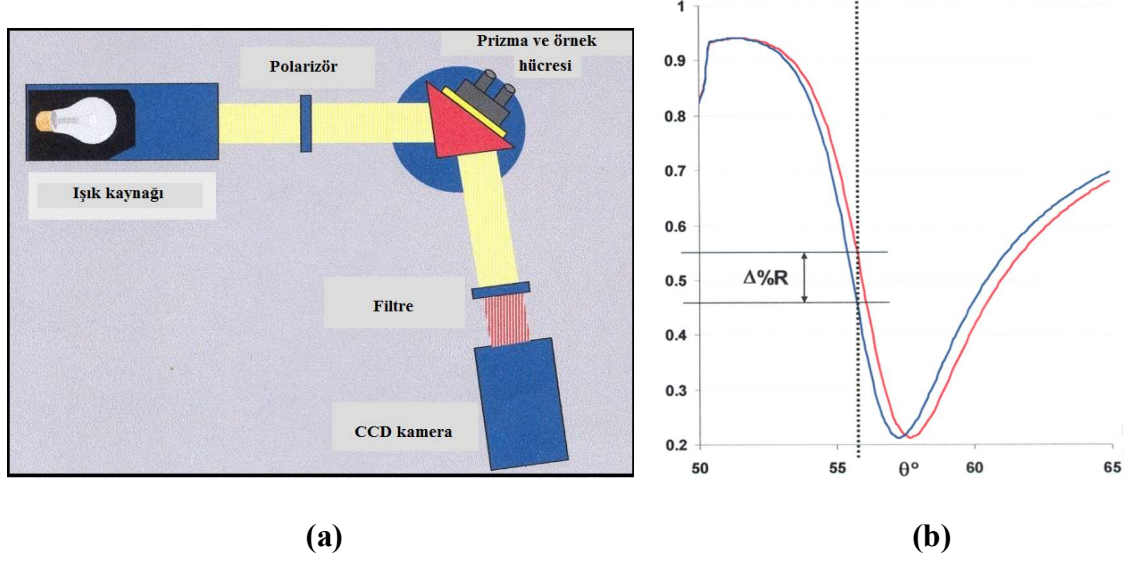
Hazırlanan UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartikül kaplı SPR altın çip ile kinetik analizler Şekil 3.2.6.1.1'de gösterilen yüzey plazmon rezonans sistemi SPRimager II (GWC Technologies, Madison, ABD) ile gerçekleştirildi. Sensorgramların elde edilmesinde sistem ile birlikte sağlanan Digital Optics V++ görüntüleme yazılımı ve bu yazılımla birlikte çalışan Microsoft Excel programı kullanıldı.



**Şekil 3.2.6.1.1.** SPRImager II (GWC Technologies, Madison, ABD) yüzey plazmon rezonans sistemi

GWC SPRImager II cihazında yüzey plazmon rezonans etkisi, yüzey plazmon rezonans açısına yakın sabit bir açıda uyarılmış olan örnekten yansıyan ışığın ölçülmesi prensibine göre çalışmaktadır (Şekil 3.2.6.1.2 (b)). SPRImager II sisteminde ışığın dalga boyu (800 nm) ve geliş açısı ( $40^\circ - 70^\circ$ ) sabittir. Cihaz ışık kaynağı, kutuplayıcı, örnek hücresi, dar band filtresi, altın sensör yüzeyindeki tüm optik alanı yakalayabilen CCD kameradan oluşan bir dedektör ve sıcaklık değişimini önlemek için bir sıcaklık sensörü içermektedir (Şekil 3.2.6.1.3).

Cihazın çalışma prensibi Şekil 3.2.6.1.2 (a)'da özetlenmiştir. Koşutlanmış polikromatik bir kaynaktan gelen ışık yüzey plazmon rezonans açısına yakın bir bölgedeki açıda bir polarizörden (kutuplayıcı) geçerek prizma/ince altın film/örnek üçlüsünün beraberce oluşturduğu örnek hücresine çarpılmaktadır. Işık, prizma/altın arayüzeyi ile etkileşerek yansıyan ışığın şiddetindeki azalmaya neden olan yüzey plazmonlarını oluşturur. Örnekten yansıyan ışık sadece dedektörün algılayabileceği aralığa denk gelen dar bir band aralığındaki ışığın geçişine izin veren bir filtreden geçer ve bu sayede yansıyan ışığın şiddeti ölçülür.



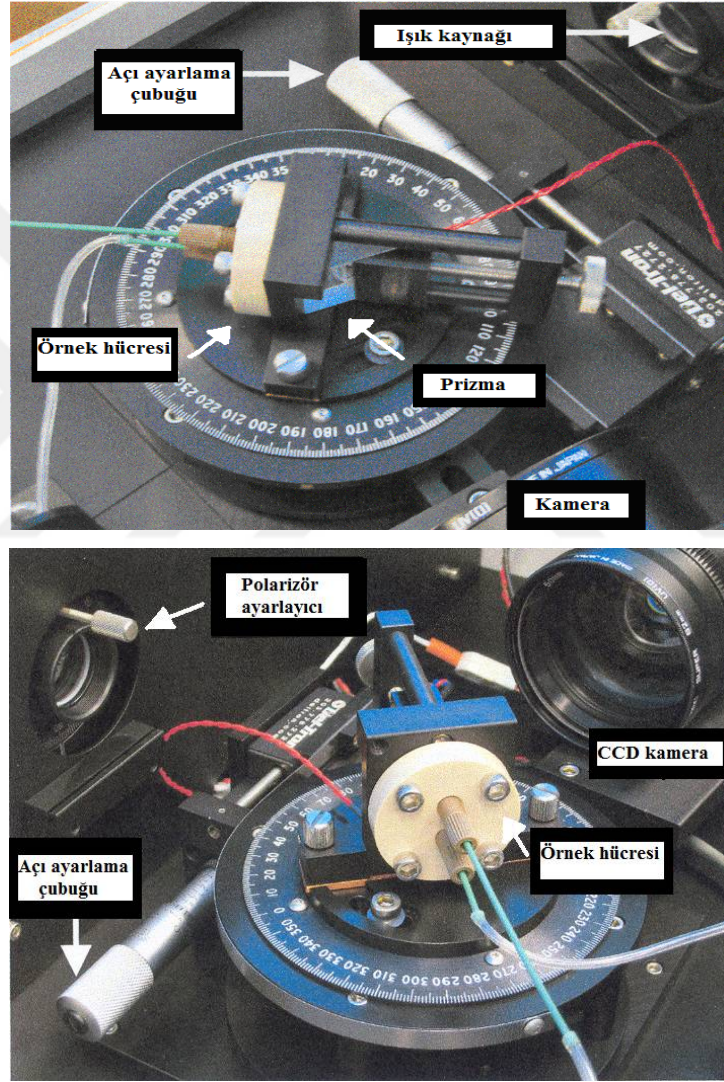
**Şekil 3.2.6.1.2.** SPRImager II sisteminin (a) çalışma ve (b) sensogram oluşturma prensibi

UA baskılanmış yüzey plazmon rezonans sensör ile kinetik analizler yapılabilmesi için hazırlanan sensör nanopartikül kaplı yüzeyi akış hücresi yönünde olacak şekilde örnek tutucuya yerleştirildi ve üzerine kırılma indisi eşitleyici sıvı (kırılma indisi:  $1,720 \pm 0,0005$ , Cargille Laboratuaries series M fluid) damlatılarak üzerine prizma yerleştirildi. Bu sayede SF-10 cam prizma ile altın sensör arasındaki bağlantı sağlanmış oldu (Şekil 3.2.6.1.4). Ardından akış hücresi, giriş ve çıkış uçları da örnek tutucuya eklenerek örnek hücresi hazırlandı ve kinetik analizlerin gerçekleştirilmesi için cihaza yerleştirildi. Sıcaklık sensörü kullanılarak sıcaklık  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 'a sabitlendi ve tüm sensogramlar bu sıcaklıkta alındı.

### 3.2.6.2 Yüzey plazmon rezonans sistemi ile sensorgram alınması

Örnek hücresi hazırlanarak cihaza yerleştirildi. İlk olarak sisteme pH: 8 çözeltisi gönderilerek SPR sensör yüzeyinin ıslanması sağlandı ve yüzeyden  $150 \text{ } \mu\text{L}/\text{dakika}$  hızında 30 dakika süre ile pH: 8 çözeltisi geçirilmeye devam edildi. Daha sonra geliş açısı yüzey plazmon rezonans açısına yakın bir açıya sabitlenerek sensorgram alınmaya başlandı. Sistemden yine ilk olarak pH: 8 çözeltisi geçirildi ve ardından analizi yapılacak olan çözelti (UA içeren sulu çözelti, yarışmacı molekül çözeltileri ya da idrar örnekleri) sensör yüzeyine gönderilerek yansıyan ışığın şiddetindeki değişim farkı değerleri anlık olarak gözlenerek denge durumuna geldiğinde (yaklaşık 40 dakika) sisteme tekrar pH: 8

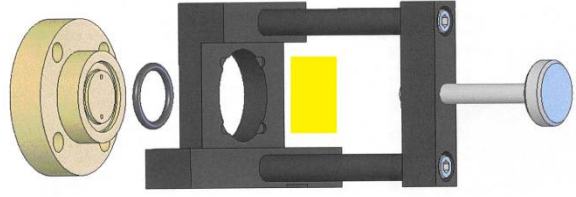
çözültisi verilerek spesifik olarak bağlanmayan analit molekülleri yüzeyden uzaklaştırıldı. Ardından yüzeyden 10 dakika süre ile pH: 4 çözültisi geçirilerek desorpsiyon işlemi gerçekleştirildi. Desorpsiyon işleminden sonra, SPR sensör yüzeyi 10 dakika ultra saf su ve tekrar dengeye gelene kadar (yaklaşık 10 dakika) pH: 8 çözültisi ile yıkanarak rejenere edildi. Ardından cihazla birlikte verilen yazılımlar kullanılarak sensorgram elde edildi.



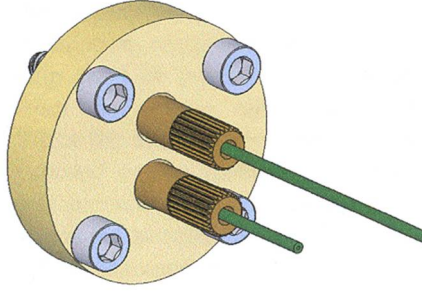
Şekil 3.2.6.1.3. GWC SPRimager II cihazının temel ekipmanları



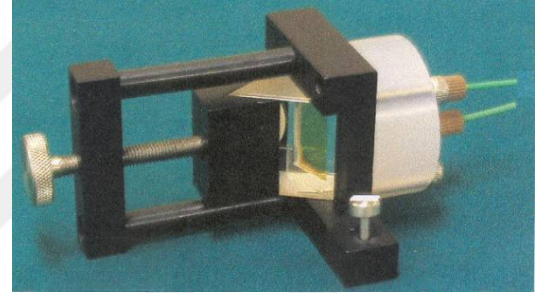
(a)



(b)



(c)



(d)

**Şekil 3.2.6.1.4.** Örnek hücresinin hazırlanması (a) yüzey plazmon rezonans çipin örnek tutucuya yerleştirilmesi (b) akış hücresinin takılması (c) giriş ve çıkış uçlarının yerleştirilmesi (d) prizma ve akış hücresinin bir araya getirilmesiyle örnek hücresinin hazırlanması

### 3.2.7. UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensör ile kinetik analizler

UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensörü hazırlandıktan sonra, derişim ile SPR sinyali arasındaki ilişkinin değerlendirilebilmesi için farklı derişimlerde (0,5-40 mg/L) UA çözeltileri hazırlandı (pH: 8). Çözeltiler peristaltik pompa yardımıyla SPR sensör yüzeyiyle etkileştirilerek sensorgramlar alındı. Standart bir ölçümde sistemden ilk önce denge tamponu, daha sonra UA çözeltisi, ardından denge tamponu geçirildi ve daha sonra desorpsiyon işlemi gerçekleştirildi. Baskılama seçiciliğini belirlemek için UA

baskılanmamış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensör için de aynı işlemler tekrar edilmiştir.

### **3.2.8. Yarışmalı kinetik analizler**

UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensörün seçiciliğini göstermek için UA (10 mg/L), askorbik asit (AA, 10 mg/L), üre (U, 100 mg/L) ve teofilin (Teo, 10 mg/L) çözeltileri ve 10 mg/L derişimindeki UA, AA, Teo ve U çözeltilerinin kullanılmasıyla oluşturulan karışımlar (pH 8) (tekli, ikili, üçlü, dörtlü) SPR sistemine gönderilerek yarışmalı adsorpsiyon çalışmaları gerçekleştirildi. Yarışmacı molekül çözeltileri için anlatıldığı şekilde sensorgramlar oluşturuldu.

### **3.2.9. SPR sensörün baskılama seçiciliğinin belirlenmesi**

UA baskılanmış SPR sensörün seçiciliğini göstermek için UA baskılanmamış (NIP) SPR sensör hazırlandı. UA (10 mg/L), AA (10 mg/L), U (10 mg/L) ve Teo (10mg/L) çözeltileri ve 10 mg/L derişimindeki UA, AA, Teo ve U çözeltilerinin kullanılmasıyla oluşturulan karışımlar (pH 8) (tekli, ikili, üçlü, dörtlü) SPR sistemine gönderildi. Baskılama seçiciliği deneyleri için anlatıldığı şekilde plazmon eğrileri alındı. Çözeltiler SPR sensörle etkileştirildi ve kinetik veriler alınarak V<sup>++</sup> yazılımı ile analiz edildi.

### **3.2.10. İdrar örneği ile analizler**

Hazırlanan UA baskılanmış yüzey plazmon rezonans sensörün gerçek örnekler ile kullanılabilirliğinin ve mevcut yöntemler ile uyumluluğunun araştırılabilmesi için idrar örneği kullanıldı. Sağlıklı bir insanın 24 saatlik idrarı toplandı ve oda sıcaklığında 5 000 g'de 15 dakika santrifüjlendi. Daha sonra santrifüjat kısmı 0,45 µm'lik filtreden geçirildi ve -20 °C'da dondurularak saklandı. Kullanmadan önce idrar 37 °C'da 1 saat bekletilerek tavlandı. UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensörün etkinliğinin belirlenebilmesi için, standart katma yöntemi kullanıldı. Bunun için, idrar örneğindeki toplam seyrelme miktarı 1:20 olacak şekilde önce kör örnek, ardından da aynı seyrelme oranında, UA derişimi 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 mg/L olan çözeltiler hazırlandı (pH: 8).

Hazırlanan bu çözeltiler UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> sensör yüzeyine gönderilerek %  $\Delta R$ /zaman değişiminden oluşan sensorgramlar alındı. Hazırlanan sensörün etkinliğini göstermek için idrar örneğindeki UA derişimi enzimatik yöntem (COBAS INTEGRA Uric Acid ver.2 (UA2), Rotkreuz, İsviçre) ile de belirlendi.

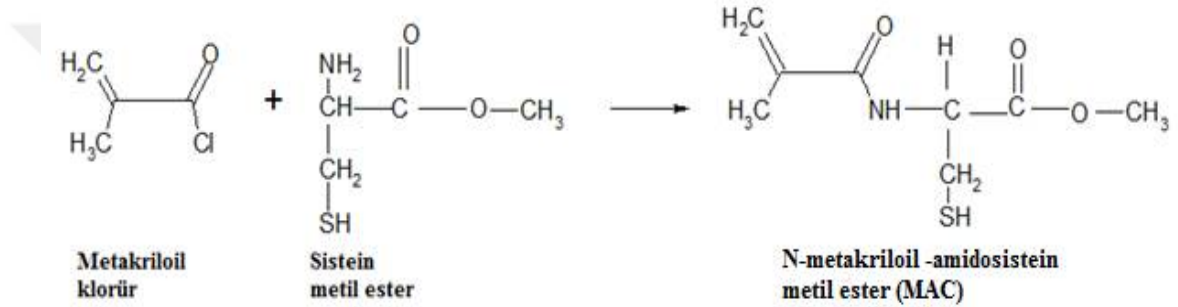
### **3.2.11. Tekrar kullanım**

UA baskılanmış SPR sensörün tekrar kullanımının belirlenmesi için idrar örneği kullanıldı. İdrar örneğindeki toplam seyrelme miktarı 1:20 olacak şekilde önce kör örnek ve aynı seyrelme oranında 35 mg/L UA spike edilmiş idrar örneği hazırlandı (pH: 8). Sistem kör ile dengeye getirildikten sonra ilk önce denge tamponu, daha sonra 35 mg/L UA içeren idrar çözeltisi, ardından denge tamponu geçirildi ve daha sonra desorpsiyon işlemi gerçekleştirildi. Bu işlem arka arkaya 5 defa tekrarlandı ve %  $\Delta R$ /zaman değişiminden oluşan sensorgramlar alındı.

## 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

### 4.1. N-Metakriloil-amidosistein metil ester (MAC) monomerinin sentezi ve karakterizasyonu

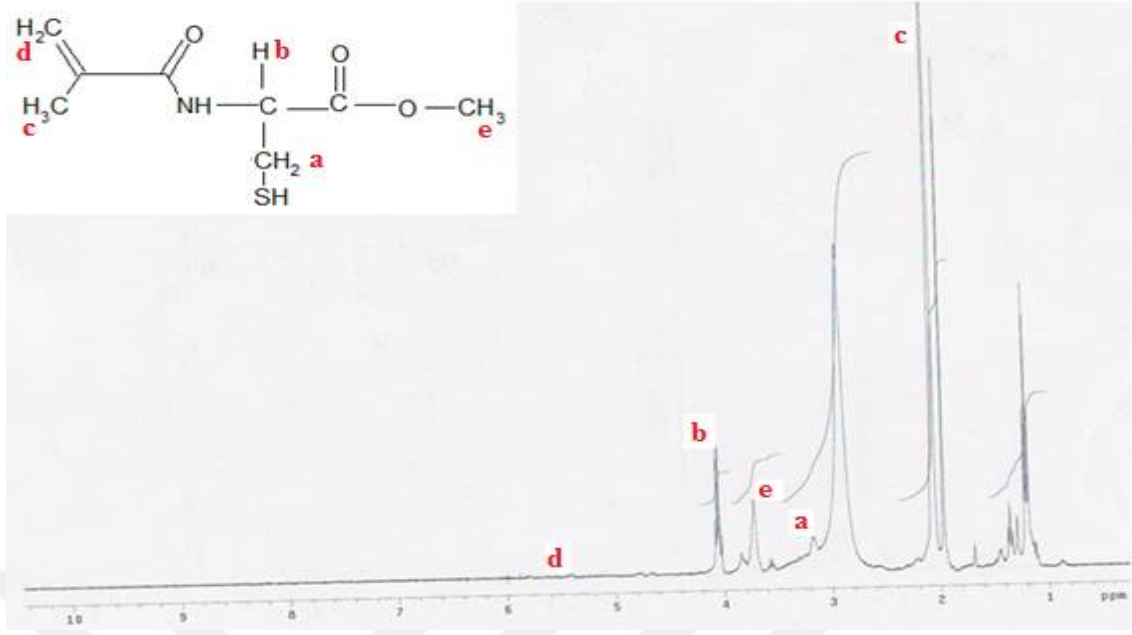
N-metakriloil-amidosistein metil ester (MAC) monomeri, L-sistein metil esterin metakriloil klorür ile reaksiyonu sonucu elde edildi (Şekil 4.1.1). Elde edilen monomerin yapısal karakterizasyonu NMR ve FTIR teknikleri kullanılarak gerçekleştirildi. Fonksiyonel monomerin kimyasal yapısı ve sentez reaksiyonu Şekil 4.1.1’de verilmiştir.



**Şekil 4.1.1.** N-metakriloil-amidosistein metil ester (MAC) monomerinin sentez reaksiyonu

Sentezlenen MAC monomerinin kimyasal yapısının aydınlatılabilmesi için ilk olarak <sup>1</sup>H-NMR tekniği kullanıldı. Şekil 4.1.2’de MAC monomerine ait <sup>1</sup>H-NMR spektrumu gösterilmektedir.

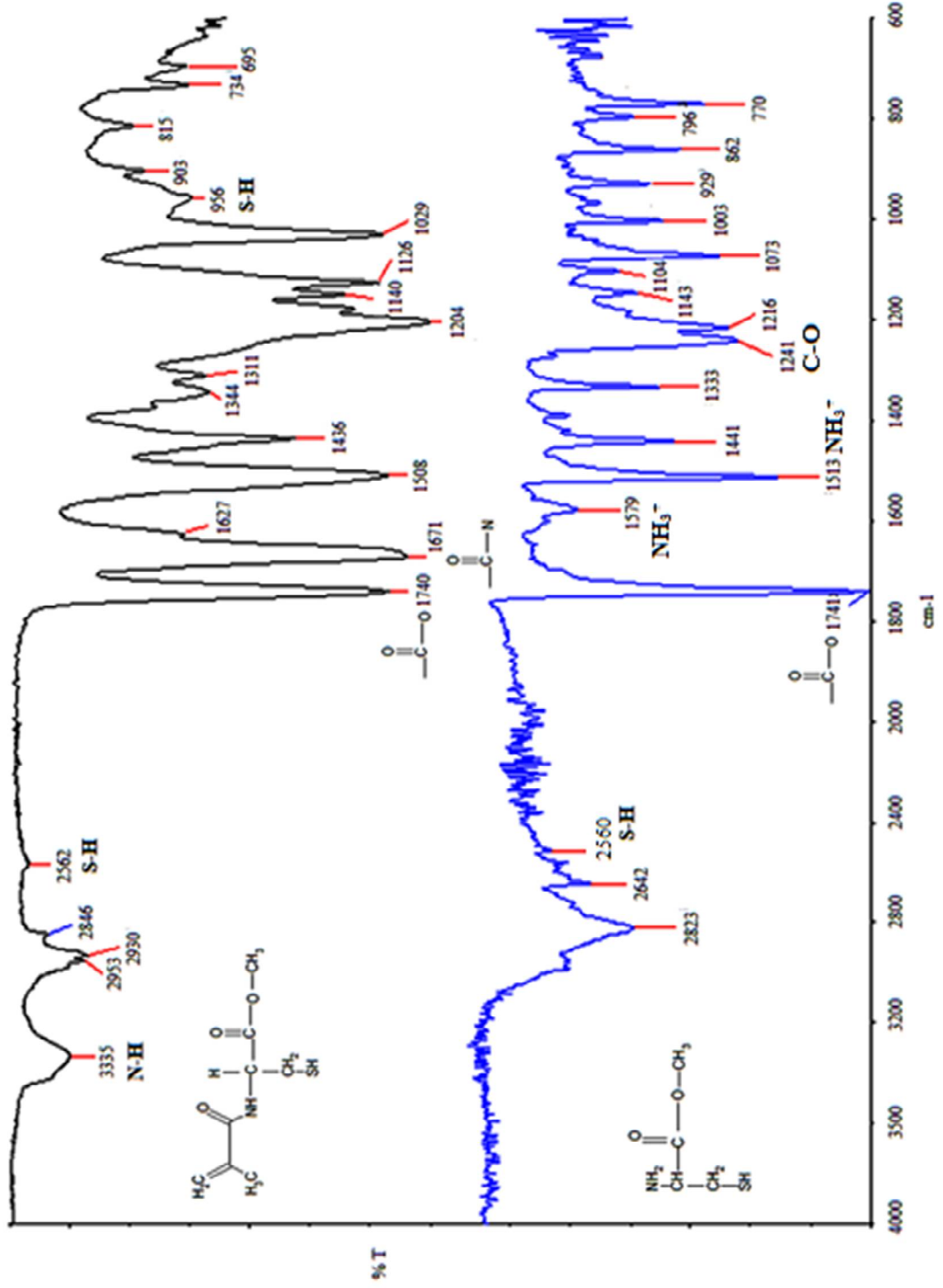




**Şekil 4.1.2.** N-metakriloil-amidosistein metil ester (MAC) monomerine ait NMR spektrumu

$^1\text{H}$ -NMR spektrumunda MAC monomerine ait karakteristik pikler şunlardır:  $\delta =$  (a) 3,20-3,40 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), (b) 4,00-4,10 (t, 1H, CH), (c) 2,01 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), (d) 5,44-5,82 (s, 1H,  $\text{C}=\text{CH}_2$ ), (e) 3,80 (s, 3H,  $\text{O}-\text{CH}_3$ ), (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ). 6,73-6,81 ppm ve 7,67-7,37 ppm'de  $-\text{NH}$  ve  $-\text{SH}$  protonlarına ait pikler beklenmiştir. Fakat buradaki protonların hareketli olmasından dolayı bu pikler NMR spektrumunda gözlenememiştir. Elde edilen sonuçlar MAC monomerinin başarılı bir şekilde sentezlendiğini göstermiştir (Lele ve ark. 1999, Sarı ve ark. 2006, Utku ve ark. 2008).

L-sistein metil ester ve MAC monomeri için elde edilen FTIR spektrumu Şekil 4.1.3'te verilmiştir. MAC monomerine ait FTIR spektrumunda  $3335\text{ cm}^{-1}$ 'de N-H bükülme absorpsiyonuna ait geniş band gözlenmektedir. MAC monomerindeki S-H eğilme (bending) ve bükülme (stretching) bantları sırası ile  $2562\text{ cm}^{-1}$  ve  $956\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenmektedir.  $1671\text{ cm}^{-1}$ 'de amid karbonil ( $\text{C}=\text{O}$ ) grubuna,  $1740\text{ cm}^{-1}$ 'de ise ester karbonil ( $\text{C}=\text{O}$ ) grubuna ait absorpsiyon bandları görülmektedir. MAC ve L-sistein metil esterinin FTIR spektrumları karşılaştırıldığında MAC monomerine ait spektrumda  $1671\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenen amid karbonil grubuna ait absorpsiyon bandı metakriloil klorür ile L-sistein metil esterinin amid bağı ile bağlandığını kanıtlamıştır.

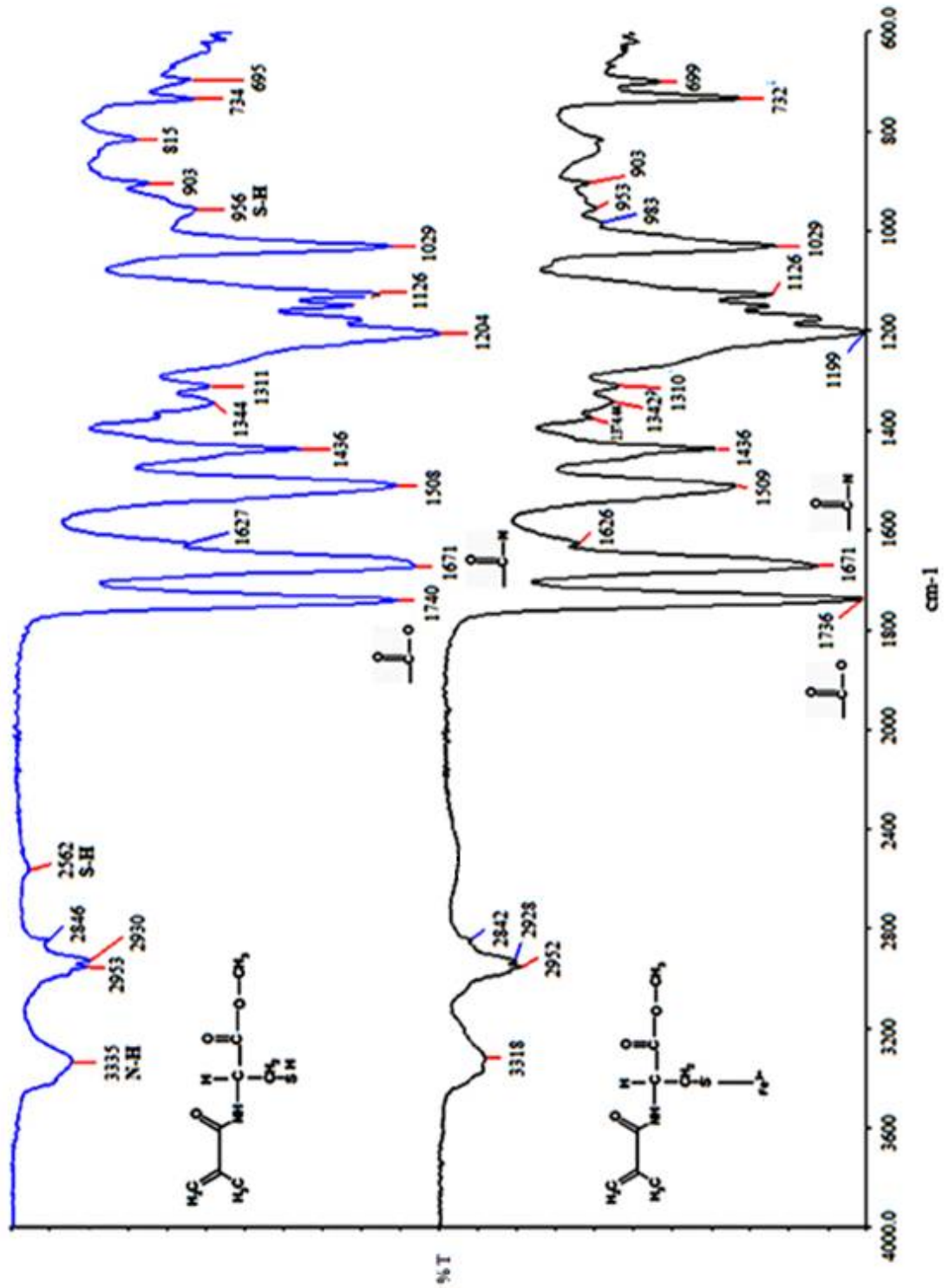


Şekil 4.1.3. N-metakriloil-amidosistein metil ester (MAC) monomerine (siyah) ve L-sistein metil esteri (mavi) ait FTIR spektrumları.

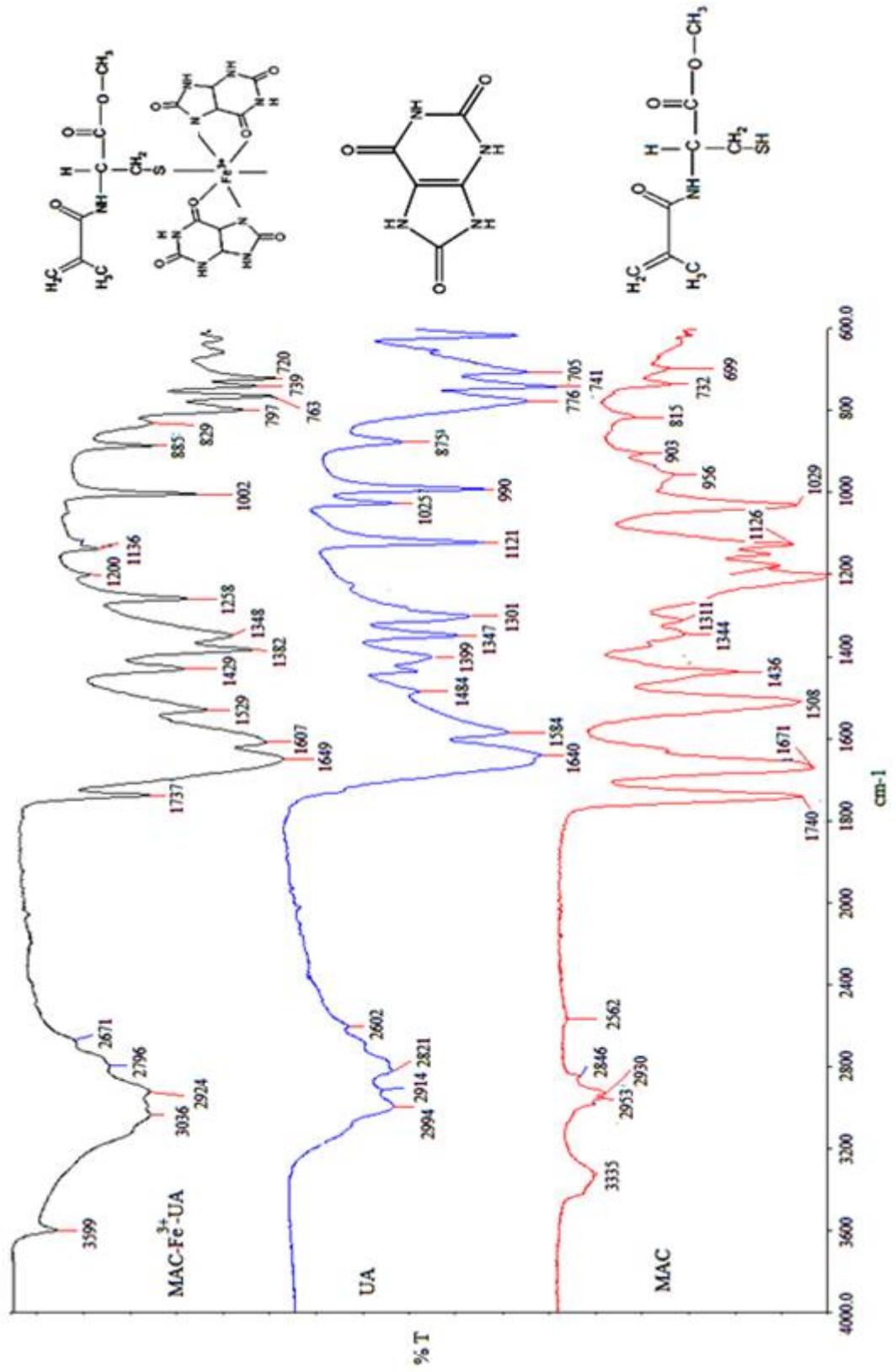
## 4.2. MAC-Fe<sup>3+</sup> kompleksi ve MAC-Fe<sup>3+</sup>-UA ön-kompleksinin karakterizasyonu

Sentezlenen MAC-Fe<sup>3+</sup> kompleksi ve MAC-Fe<sup>3+</sup>-UA ön-kompleksinin yapısal karakterizasyonu için FTIR tekniği kullanıldı. Bu amaçla MAC ve MAC-Fe<sup>3+</sup> kompleksinin FTIR spektrumları karşılaştırıldı (Şekil 4.2.1). MAC-Fe<sup>3+</sup> kompleksinde Fe-S bağının oluşumunu göstermek için, S-H eğilme ve bükülme bantlarına bakıldı. MAC monomerindeki S-H eğilme (bending) ve bükülmesine (stretching) ait absorpsiyon bandları sırasıyla 2562 cm<sup>-1</sup> ve 956 cm<sup>-1</sup>'de gözlenmektedir. MAC-Fe<sup>3+</sup> kompleksine ait FTIR spektrumunda 2562 cm<sup>-1</sup>'deki S-H eğilme bandı kaybolurken, 956 cm<sup>-1</sup>'deki S-H (stretching vibration) bükülme titreşimine ait bant ise 953 cm<sup>-1</sup>'de daha küçük bir bant olarak gözlenmektedir. Bu değişim MAC monomerinin -SH (tiyol) grubundaki S ile Fe<sup>3+</sup> iyonunun bağlanması ile yeni bir bağ oluşması olarak yorumlanabilir (Fe-S bağı).

Li ve arkadaşlarının (2013) yaptığı çalışmada, L-sistein ve L-sistein bağlı Mn-katkılı CdTe kuantum noktaların FTIR spektrum değişimleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, L-sisteindeki tiyol grubundaki S-H bağının kırıldığı ve S ile Cd'un Cd-S bağını oluşturduğu gözlenmiştir. Bu nedenle L-sisteindeki 2551 cm<sup>-1</sup>'deki S-H eğilme bandı Cd'un L-sistein ile bağ oluşturması sonucu kaybolmuştur. Zhang ve arkadaşları (2015) tarafından yapılan bir başka çalışmada L-sistein-altın nanopartiküller sentezlenmiştir. 2550 cm<sup>-1</sup>'de sisteine ait S-H eğilme bandı, L-sisteinin altın yüzeye bağlanmasıyla kaybolmuştur. Bunun nedeni sisteindeki kükürt ile altın arasında Au-S bağının oluşmasıdır.



Şekil 4.2.1. MAC monomeri (mavi) ve MAC-Fe<sup>3+</sup> kompleksinin (siyah) FTIR spektrumları.

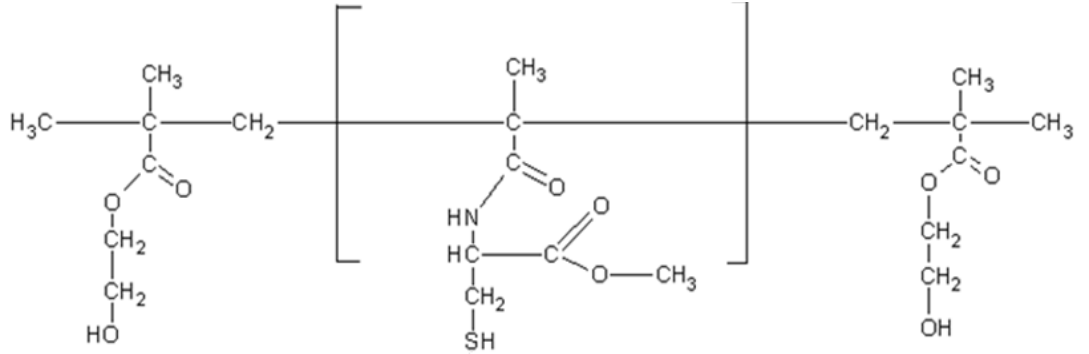


Şekil 4.2.2. MAC-Fe<sup>3+</sup>-UA ön-kompleksinin (siyah), kalıp molekülün (UA) (mavi) ve MAC monomerin (kırmızı) FTIR spektrumları.

Şekil 4.2.2’de MAC, UA ve MAC-Fe<sup>3+</sup>-UA kompleksinin FTIR spektrumları verilmiştir. UA’in 3600-2600 cm<sup>-1</sup> aralığında birçok N-H bükülme bandlarının varlığı ile kolaylıkla belirlenebilen karakteristik infrared spektrumu vardır. 2602, 2821, 2914 ve 2994 cm<sup>-1</sup>’deki kuvvetli bandlar N-H bükülmesine aittir. İki karakteristik absorpsiyon bandından ilki 1640 cm<sup>-1</sup>’de üre grubuna ait karbonil (C=O) ve 1584 cm<sup>-1</sup>’deki ikinci band ise konjuge amide ait karbonil grubundan kaynaklanmaktadır. C=C gerilmesine ait absorpsiyon bandı amid ve karbonil gruplarının hipsokromik etkisi nedeniyle 1435 cm<sup>-1</sup>’de gözlemlendi. C-N titreşimleri sırasıyla O=C-N için 1121 cm<sup>-1</sup>’de ve =C-N için 1025 cm<sup>-1</sup>’de tespit edilmiştir. UA, MAC, MAC-Fe<sup>3+</sup>-UA spektrumları karşılaştırıldığında, MAC-Fe<sup>3+</sup>-UA spektrumunda 1737 cm<sup>-1</sup>’de MAC monomerine özgü ester karbonil grubuna ait (C=O) absorpsiyon bandının gözlenmesi ve 2562 cm<sup>-1</sup> ve 956 cm<sup>-1</sup>’de SH titreşim ve eğilmesine ait absorpsiyon bandlarının bulunmaması MAC-Fe<sup>3+</sup>-UA kompleks oluşumunu desteklemektedir.

### 4.3. UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartiküllerin karakterizasyonu

#### 4.3.1. FTIR analizi

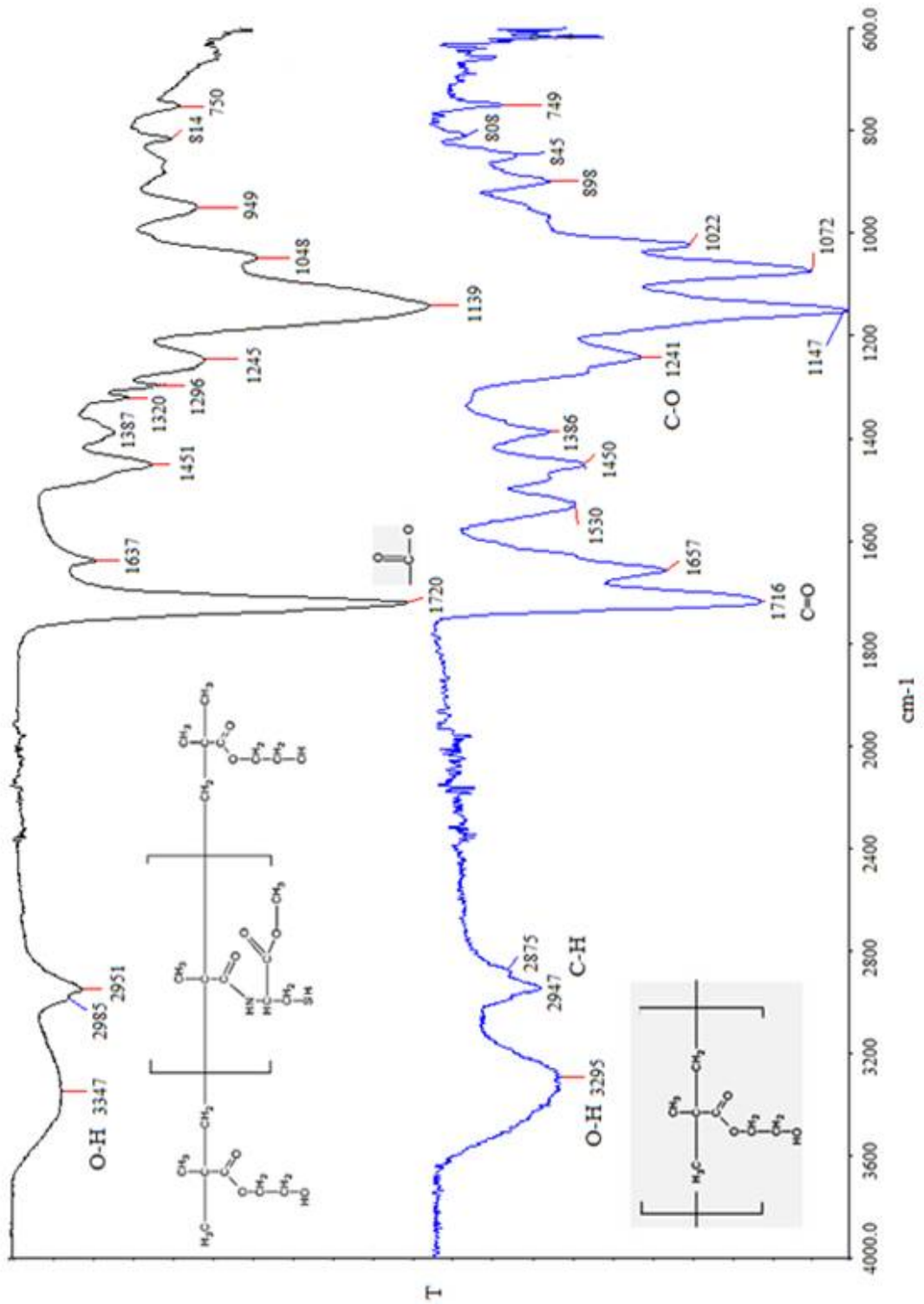


Şekil 4.3.1.1. Poli(HEMA-MAC) nanopartiküllerin kimyasal yapısı

UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartiküllerin karakterizasyonu için ilk olarak FTIR spektrumu alındı. MAC monomerinin polimerik yapıya dahil edildiğini ispatlamak amacıyla sadece komonomer olarak kullanılan HEMA, çapraz bağlayıcı EGDMA varlığında polimerleştirilerek poli(HEMA) sentezlendi. Daha sonra poli(HEMA) ve poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> için FTIR spektrumları hazırlandı (Şekil 4.3.1.2). Poli(HEMA) ve poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> için elde edilen spektrumlar

karşılaştırıldığında birbirinden farklı oldukları açıkça görülmektedir. Bu durum MAC monomerinin yapıya dahil edildiğinin ilk kanıtıdır. Poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup>'e ait spektrumda 1720 cm<sup>-1</sup>'deki absorpsiyon bandı yapıda tekrar eden ester C=O (karbonil) gruplarına aittir. 3347 cm<sup>-1</sup>'de OH gruplarına ait band görülmektedir. Bu band içerisinde MAC yapısından kaynaklanan N-H gerilme titreşimleri de yer almaktadır. 1050 ve 1300 cm<sup>-1</sup> frekans aralığında C-O gerilme titreşimine ait bandlar görülmektedir.





Şekil 4.3.1.2. UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartiküllerin (siyah) ve poli(HEMA) nanopartiküllerin (mavi) FTIR spektrumları.

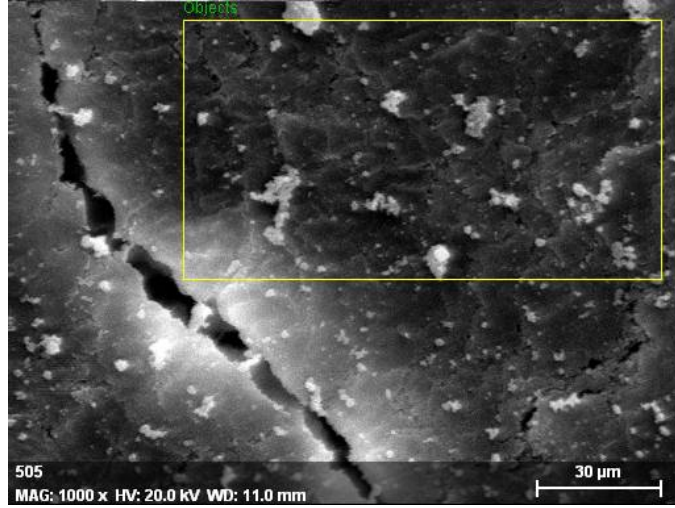


#### 4.3.2. Elementel analiz

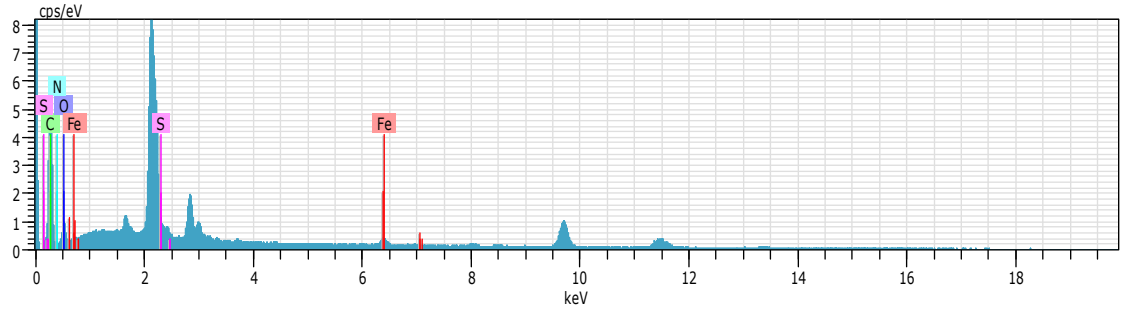
Poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartiküllerin sentezlendiğini kanıtlamak amacıyla nanopartiküllerin yapısındaki karbon (C), azot (N) ve kükürt (S) elementlerinin % miktarı analiz edildi. Poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartiküllerin elementel analiz sonuçlarına göre C, N ve S oranları sırasıyla % 46,7242, % 1,415 ve % 0,0637 olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, N ve S atomlarının varlığı fonksiyonel monomerin (MAC) polimerik yapıya başarılı bir şekilde dahil edildiğini göstermektedir.

#### 4.3.3. Enerji dağılımlı x-ışınları analizi (EDS)

Poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartiküllerin elementel kompozisyonunu tanımlamak için aynı zamanda enerji dağılımlı X-ışınları analizi yapıldı. Toz halindeki poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartiküllerin elementel kompozisyonu taramalı elektron mikroskobuna bağlı EDS ataçmanı kullanılarak araştırıldı. Şekil 4.3.3.1’de toz nanopartiküller ile hazırlanan yüzey (a) ve EDS spektrumu (b) verilmiştir. Çizelge 4.3.3.1’de poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartiküllere ait analiz sonuçları özetlenmiştir.



(a)



(b)

**Şekil 4.3.3.1. (a)** UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartiküller ile hazırlanan yüzey ve **(b)** UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartiküllerin EDS spektrumu.

**Çizelge 4.3.3.1.** UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartiküllere ait EDS sonuçları.

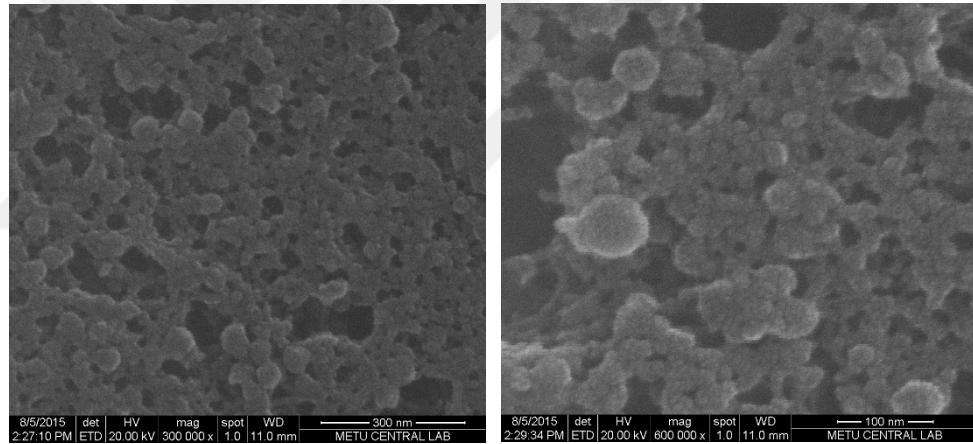
Element	C	O	N	S	Fe
Atom (% ağırlık)	39,39	37,85	19,23	2,96	0,57

EDS tekniği, incelenen numunenin elementel kompozisyonunu belirlemede sıklıkla kullanılan bir tekniktir. Bu yöntem nanopartiküllerin kompozisyonunu, spektrum ve elementel haritalama ile doğrular (Zheng ve ark. 2011). Elde edilen sonuçlara göre, poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartiküller sırasıyla % 19,23 ve % 2,96 oranında N ve S

içermektedir. Bu elementlerin varlığı, MAC monomerinin polimerik yapıya başarılı bir şekilde dahil edildiğini göstermekte ve elementel analiz sonuçlarını desteklemektedir. Aynı zamanda % 0,57 oranında Fe elementinin bulunması da  $Fe^{3+}$  iyonları ile MAC monomerinin etkileştiğine dair bir kanıt oluşturmaktadır.

#### 4.3.4. Yüksek çözünürlüklü taramalı elektron mikroskobu (FE-SEM) analizi

Emülsiyon polimerizasyonu tekniği ile sentezlenen UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)- $Fe^{3+}$  nanopartiküllerin morfolojisi yüksek çözünürlüklü taramalı elektron mikroskobu (FE-SEM) kullanılarak incelendi (Şekil 4.3.4.1 (a, b)). Poli(HEMA-MAC)- $Fe^{3+}$  nanopartiküller ilk olarak vakum altında çok ince bir altın tabaka (100 Å) ile kaplandı. Ardından 300 000 ve 600 000 kat büyütme oranlarında görüntüldü.



(a)

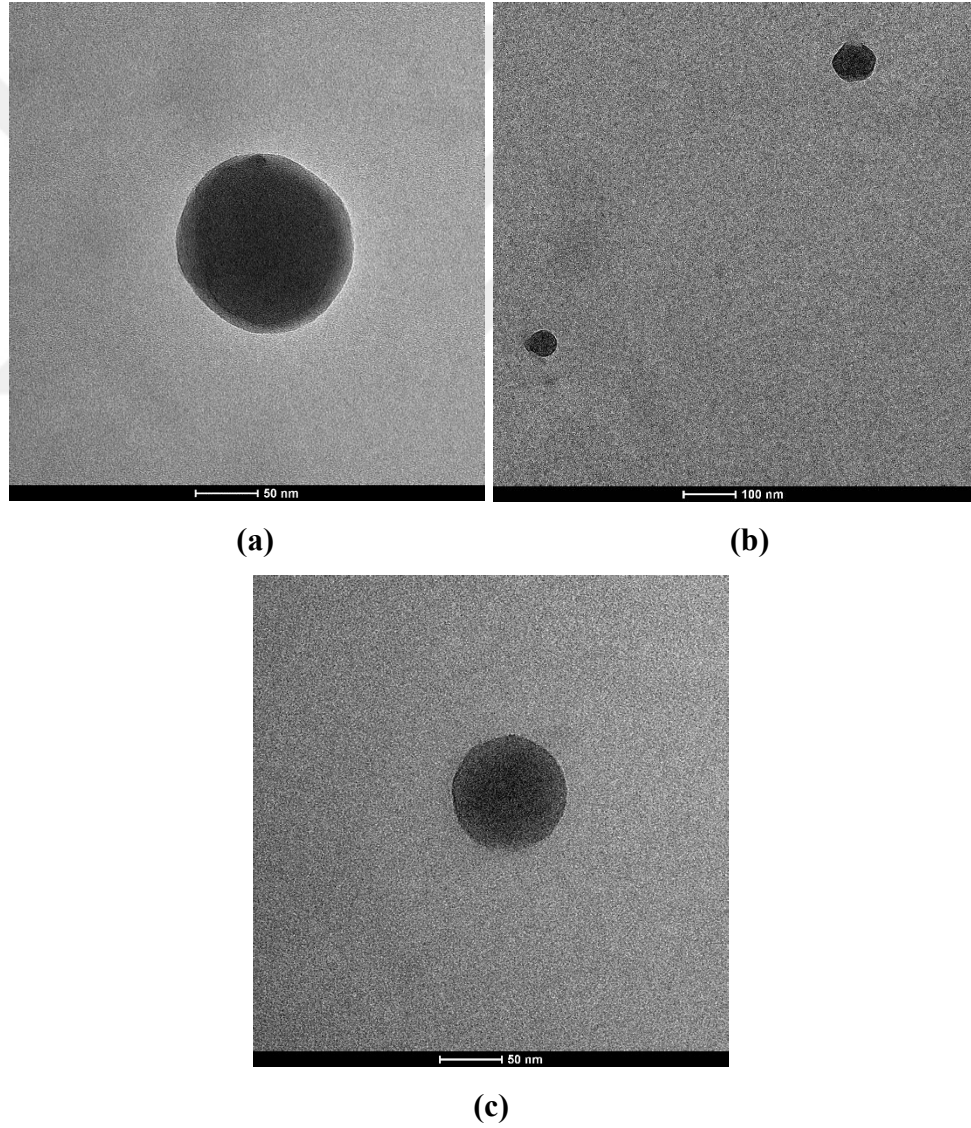
(b)

**Şekil 4.3.4.1.** UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)- $Fe^{3+}$  nanopartiküllere ait SEM görüntüleri (a) 300 000 X ve (b) 600 000 X.

Elde edilen SEM görüntüleri poli(HEMA-MAC)- $Fe^{3+}$  nanopartiküllerin küresel formda olduğunu açıkça göstermektedir. Ancak nanopartiküller oldukça küçük olup geniş bir boyut dağılımına sahiptir. Sulu ortamda dağılan ve kararlı bir süspansiyon oluşturan poli(HEMA-MAC)- $Fe^{3+}$  nanopartiküller, kurutma ile biraraya gelmektedir. Hazırlanan nanopartiküllerin boyutu SPR sensör yüzeyinde moleküler tanıma katmanının oluşturulması için uygundur.

#### 4.3.5. Geçirimli elektron mikroskobu (CTEM) analizi

UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartiküller yüksek çözünürlüklü kontrastlı geçirimli elektron mikroskobu (CTEM) kullanılarak da görüntüledi. Sıvı poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartiküllerin TEM görüntüleri aydınlık alan kırınım görüntülemesi yöntemi kullanılarak alındı (Şekil 4.3.5.1 (a, b)). Elde edilen görüntülere göre sentezlenen nanopartiküller küresel formdadır. Aynı zamanda hedeflendiği gibi nano boyuttadır. Nano boyuttaki partiküller SPR sensör yüzeyine tutturulduğunda ince polimerik filmlere göre daha geniş yüzey alanına ve dolayısıyla daha fazla bağlanma bölgesine sahip olacaktır (Wackerlig ve Lieberzeit 2015).

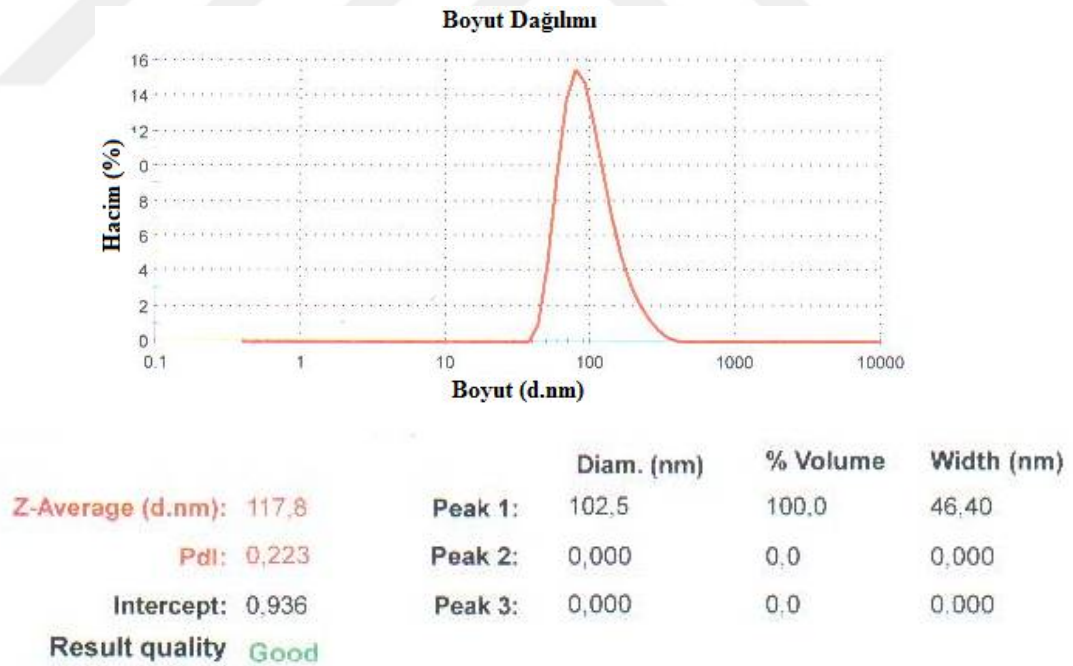


**Şekil 4.3.5.1.** UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartiküllerin CTEM görüntüleri.

#### 4.3.6. Zeta boyut dağılımı analizi

UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartiküllerin boyut dağılımı analizi için zeta boyut dağılımı analizi yapılmıştır. Zeta boyut analizi sulu ortamda bulunan poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartiküllerin boyut dağılımı hakkında bilgi vermektedir. Şekil 4.3.6.1’de UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartiküllerin boyut dağılım grafiği verilmiştir. Nanopartiküllerin ortalama çapı 117,8 nm, polidispersite indeksi ise 0,223 olarak belirlenmiştir.

Nano boyuttaki partiküllerin partikül büyüklüğü/boyutu dağılımını ifade eden polidispersite indeksi (PDI) değeri, genel olarak, 0,1-0,25 arasında olduğunda monodisperse yakın dar bir dağılım elde edilmektedir. PDI değeri 0,5’in üzerinde olduğunda ise, geniş çaplı partiküllerin varlığına ve agregat oluşumuna bağlı olarak geniş bir partikül boyutu dağılımından bahsedilebilir (Kavaz 2011, Nidhin ve ark. 2008, Mohammadpour ve ark. 2012, Tripathi ve ark. 2010).



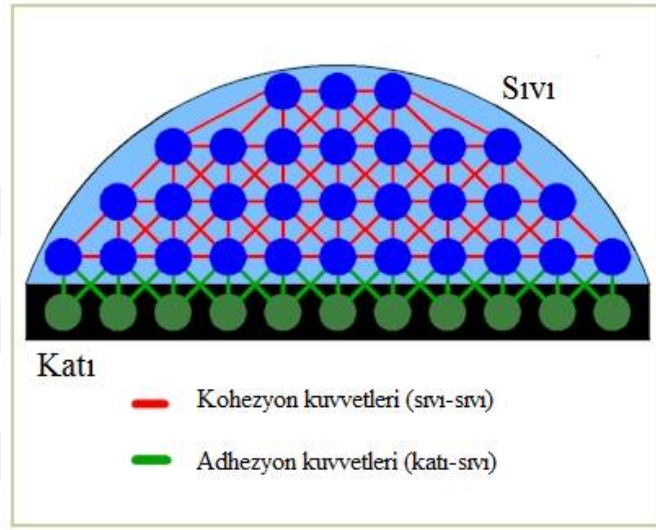
Şekil 4.3.6.1. UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartiküllerinin zeta boyut dağılımı analizi.

UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartiküller için elde edilen PDI değeri (0,223) sulu ortamda monodisperse yakın bir dağılım olduğunu göstermektedir.

#### 4.4. UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensörün karakterizasyonu

##### 4.4.1. Temas açısı ölçümleri

Katı bir yüzeye sıvı damlatıldığında damla yüzeyde yayılır. Su damlasının şekli damlatılan katı malzemenin fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre şekil alır. Su damlası hareket edene kadar 3 fazın yüzey gerilimleri toplamı sıfırdır. Damlanın katı yüzey üzerinde oluşması adhezyon ve kohezyon kuvvetlerine bağlıdır (Şekil 4.4.1.1).



Şekil 4.4.1.1. Damla oluşumunda etkin olan adhezyon ve kohezyon kuvvetleri.

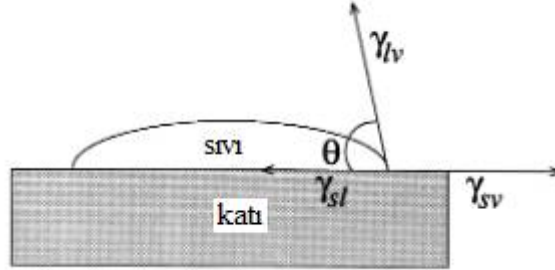
Yüzey serbest enerjisi (SFE), katı yüzeyler üzerindeki sıvıların temas açısının ölçülmesiyle tahmin edilebilmektedir. Katı yüzeyler üzerinde sıvıların temas açıları Young'ın bulduğu eşitlik ile açıklanabilir (Young ve ark. 1959).

$$\cos \theta = \left( \frac{\gamma_{sv} - \gamma_{sl}}{\gamma_l} \right) = 1 \quad (4.4.1.1)$$

Eşitliğe göre  $\theta$  temas açısı eşitliği,  $\gamma_l$  sıvının yüzey gerilimi,  $\gamma_{sl}$  katı ve sıvı arasındaki ara bölgenin yüzey gerilimi,  $\gamma_{sv}$  sıvının doymuş buharıyla dengede olan katının yüzey gerilimidir. Adhezyon gerilimi  $A = \gamma_{sv} - \gamma_{sl}$  eşitliği ile verilir ve dağılan basınç  $\pi_e$  ise;

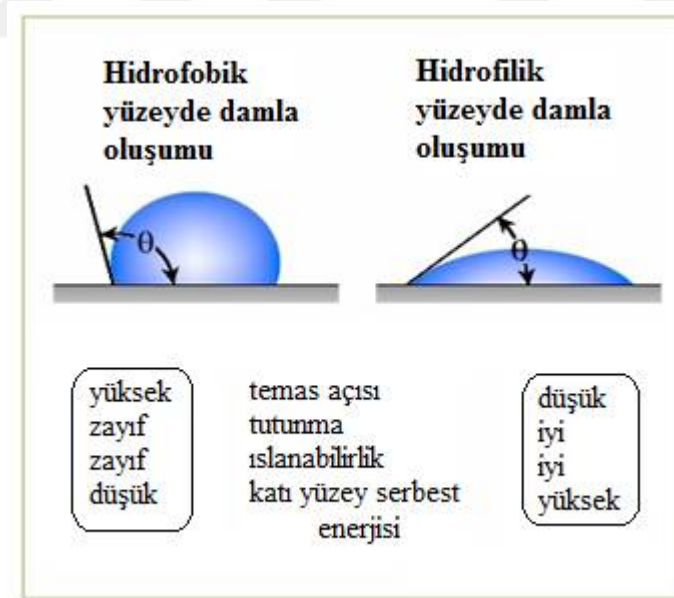
$$A = \gamma_{lv} \cos \theta = \gamma_{sv} - \gamma_{sl} - \pi_e \quad (4.4.1.2)$$

$\gamma_{sl}$ ; boş katının yüzey gerilimidir ve  $\pi_e = \gamma_{sl} - \gamma_{sv}$  'dir. Şekil 4.4.1.2'de bir damlanın katı yüzeye damlatıldığında oluşturduğu temas açısının şematik gösterimi verilmiştir.



**Şekil 4.4.1.2.** Damlanın temas açısının şematik gösterimi (Kwok ve Neumann 1999).

Katı yüzeyler yüksek veya düşük enerjili olarak karakterize edilirler. Yüksek enerjili yüzeylerde su yüzeyde düzgün olarak dağılarak ince bir film oluşturur. Bu durumda temas açısı sıfırdır ve yüzey tamamen ıslanır (hidrofilik). Benzer olarak düşük enerjili yüzeylerde su damlaları ayrı ayrı yerleşirler. Bunlarda temas açısı 90°'den büyüktür ve yüzey hidrofobiktir. Su damlacıkları düşük enerjili yüzeylerden ayrılmaya çalışır (Şekil 4.4.1.3).



**Şekil 4.4.1.3.** Hidrofobik ve hidrofilik yüzeylerin karşılaştırılması.

Fox ve Zisman (1950) katıların yüzey gerilimlerini şu şekilde açıklamışlardır: verilen katı için, sıvıların homolog serileriyle birlikte, sıvının yüzey gerilimine karşı  $\cos \theta$  grafiğe

geçirilir. Daha sonra ‘kritik yüzey gerilimi’ ( $\gamma_c$ ),  $\cos \theta = 1$  için  $\gamma_1$  değerleri katılar için yüzey geriliminin ölçülmesini sağlar. Bu metodun temelinde, pürüzsüz ortamda  $\theta \rightarrow 0$ ,  $\gamma_{sl} \rightarrow 0$  ve  $\pi_e \rightarrow 0$ ’a gider.

Yüzey ve ara yüzey enerjilerinin tahmini, söz konusu katıların temas açısı verileriyle yüzey gerilimlerinin hesaplanması ile mümkündür. Sıvı-sıvı sistemler için aşağıdaki eşitlik önerilmiş ve test edilmiştir.

$$\gamma_{ab} = \gamma_a + \gamma_b - 2\Phi (\gamma_s \gamma_b)^{1/2} \quad (4.4.1.3)$$

a ve b alt indisleri sıvı yada katı gibi iki fazı vermektedir. Sıfıra yakın benzerlikte,  $\Phi$  birim değerine eşittir. Birinci benzerlikte düzenli ara yüzeyler için  $\Phi$  değeri aşağıdaki eşitlik ile verilir:

$$\Phi = 4 (V_a V_b) / (V_a^{1/2} + V_b^{1/2})^2 \quad (4.4.1.4)$$

$V$  molar hacmi vermektedir.  $V_a$  ve  $V_b$  birbirinden tamamen farklı değildir ve  $\Phi$  değeri birim değerine yakındır.

Eğer katı yüzey homojen ve pürüzsüzse Eşitlik 4.4.1.2 ve 4.4.1.3 birleştirilerek aşağıdaki eşitlik elde edilir:

$$\gamma_s = [\gamma_1 (1 + \cos \theta) + \pi_e]^2 / 4 \Phi^2 \gamma_1 \quad (4.4.1.5)$$

Eğer  $\pi_e$  ihmal edilirse;

$$\gamma_s = \gamma_1 (1 + \cos \theta)^2 / 4 \Phi^2 \quad (4.4.1.6)$$



Formüller yeniden düzenlendiğinde, Eşitlik 4.4.1.5 ve 4.4.1.6 aşağıdaki hale gelir (Good ve Girifalco 1960).

$$\cos \theta = 2\Phi \sqrt{\frac{\gamma_s}{\gamma_l}} - 1 - \frac{\pi e}{\gamma_l} \quad (4.4.1.7)$$

$$\cos \theta = 2\Phi \sqrt{\frac{\gamma_s}{\gamma_l}} - 1 \quad (4.4.1.8)$$

SPR altın çip, allil merkaptan ile modifiye edilmiş altın çip ve UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensörün yüzey karakterizasyonu Attension KSV Inst. (Finlandiya) temas açısı cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Temas açısı değerleri cihazla birlikte verilen yazılım kullanılarak hesaplandı. Çizelge 4.4.1.1'de SPR altın çip, allil merkaptan ile modifiye edilmiş altın çip ve UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensörün yüzeyine sırasıyla su, diiyodometan, etilen glikol ve formamid damlatılmasıyla elde edilen temas açıları ve bu yüzeylere ait yüzey serbest enerjileri (SFE) verildi. Yüzey serbest enerjilerinin hesaplanmasında asit-baz metodundan yararlanıldı.

Asit-baz metodu, vanOss-Chaudhury-Good yaklaşımına dayanmaktadır. Bu yaklaşım sıvı ve katı ara yüzeyindeki moleküller arasındaki elektron alma ve verme etkileşimleri dikkate alınarak vanOss, Good ve Chaudhury tarafından önerilmiştir (vanOss ve ark. 1988). Bu yaklaşıma göre, katının yüzey gerilimi iki bileşen arasındaki Lifshitz-van der Waals kuvvetlerinin  $[(\gamma)^{LW}]$  ve Lewis asit-baz etkileşimlerinin  $[(\gamma)^{AB}]$  toplamıdır (Eşitlik 4.4.1.9).

$$\gamma_{SV}^{TOT} = \gamma_{SV}^{LW} + \gamma_{SV}^{AB} \quad (4.4.1.9)$$

Kalıcı ve geçici dipolleri veren ve genellikle van der Waals kuvvetleri olarak adlandırılan üç tür etkileşim vardır. Bunlar dipol/dipol (Keesom), dipol/indüklenmiş dipol (Debye) ve dispersiyon (London) kuvvetleridir (Della Volpe ve Siboni 2000). Bu kuvvetler  $\gamma^{LW}$  apolar etkileşimleri verir.  $\gamma^{AB}$  asit-baz etkileşimleri ise hidrojen bağı,  $\pi$  bağı ve ligand oluşumları gibi polar etkileşimlerdir (Cantin ve ark. 2006, Rieke 1997). Asit-baz eşitliğinin hesaplanabilmesi için katının yüzey gerilim bileşenleri olan  $\gamma^{asit}_{SV}$ ,  $\gamma^{baz}_{SV}$ ,  $\gamma^{LW}_{SV}$  değerlerinin bulunması gerekir. Bu sebepten dolayı özellikleri bilinen en az 3

standart test sıvısının kullanılması gerekmektedir. Temas açısı ölçümlerinde genellikle standart test sıvısı olarak yüzey gerilim bileşenleri bilinen diiyodometan, su ve formamid gibi sıvılar kullanılır. Diiyodometan Lewis asit etkileşimi göstermeyen (dispersif) monopolar özellikte bir sıvıdır. Formamid ise yüksek oranda bazik özellik gösterirken, su ise düşük oranda asidik karakter gösteren bipolar ve eşit asit-baz karakteri gösterir (Rieke 1997, Hansen 2004, Damar Hüner ve Güleç 2016).

Asit-baz yaklaşımı kullanılarak, polar bileşenler asit ve baz bileşenlerine ayrılır ve Eşitlik 4.4.1.10 türetilir:

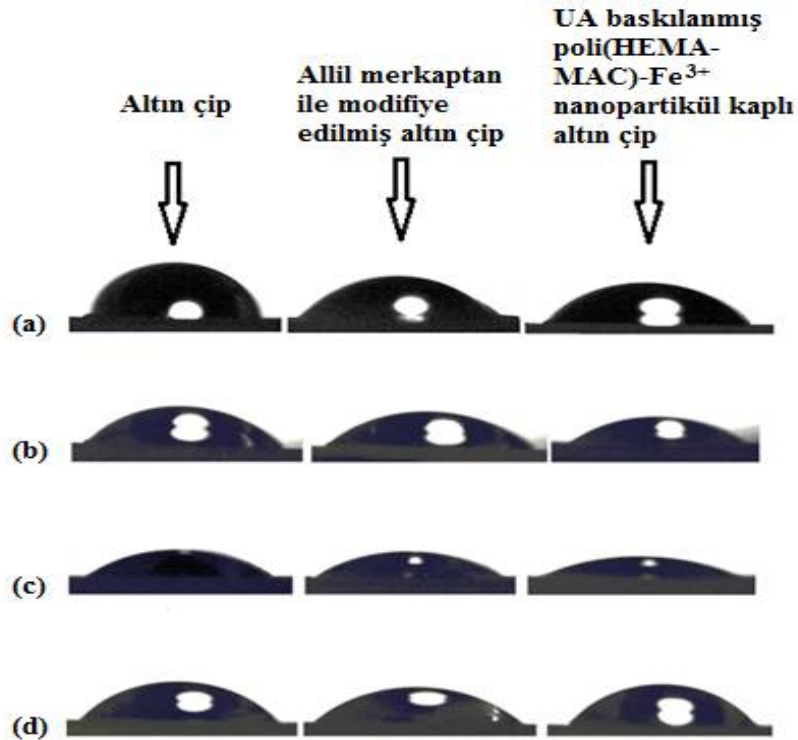
$$\sqrt{\gamma_{sv}^d \gamma_{lv}^d} + \sqrt{\gamma_{sv}^{asit} \gamma_{lv}^{baz}} + \sqrt{\gamma_{sv}^{baz} \gamma_{lv}^{asit}} = 0.5 \gamma_{lv} (1 + \cos\theta_Y) \quad (4.4.1.10)$$

Eşitliği çözebilmek için  $\gamma_{sv}^d$ ,  $\gamma_{sv}^{asit}$  ve  $\gamma_{sv}^{baz}$  gibi üç bilinmeyen için, özellikleri bilinen en az üç sıvıya ihtiyaç vardır. Bunlardan biri diiyodometan gibi dispersif, diğerleri ise su ve gliserol gibi polar özellikte olan sıvılar kullanılmalıdır. Asit-baz metodu SFE hesaplamalarının geliştirilmesinde kullanılmaktadır. Bu metod katı yüzeyin özellikleri hakkında bilgi vermektedir fakat sıvıların kullanılmasıyla temas açısı ölçümlerindeki küçük farklılıklara duyarlı olması bir dezavantajdır (Attention TN 4 Derleme).

**Çizelge 4.4.1.1.** SPR altın çip, allil merkaptan ile modifiye edilmiş altın çip ve UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartikül kaplı SPR altın çip altın çip yüzeyine sırasıyla su, etilen glikol (EG), diiyodometan (DIM) ve formamid damlatılmasıyla elde edilen temas açıları ve serbest yüzey enerjileri (SFE).

	Temas Açısı				SFE (mN/m)
	d.H <sub>2</sub> O	E.G.	DIM	Formamid	
<b>SPR altın çip</b>	86,52	46,12	41,72	49,30	40,85
<b>Allil merkaptan ile modifiye edilmiş altın çip</b>	77,16	40,03	39,10	58,24	41,97
<b>UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartikül kaplı altın çip</b>	65,55	44,20	26,54	52,92	43,73

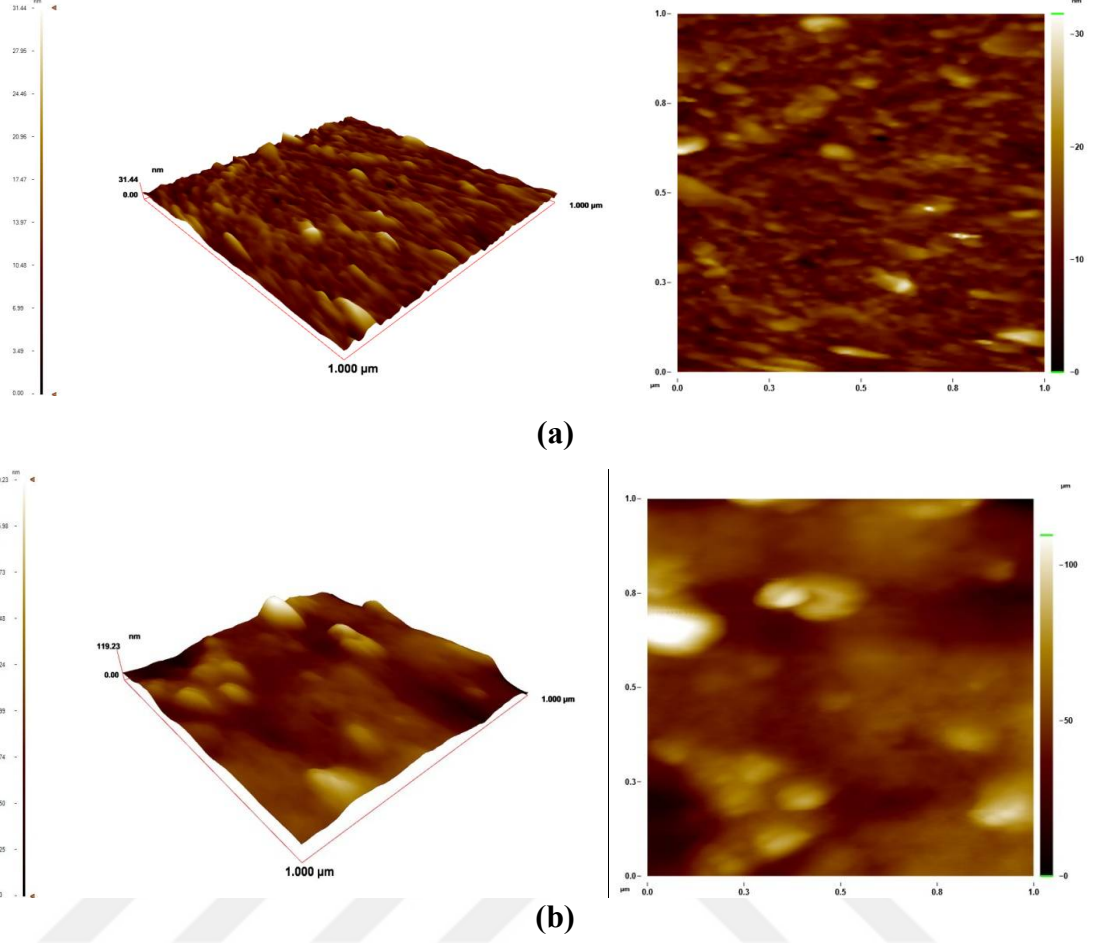
Temas açısı ölçümlerinden görüldüğü gibi, SPR altın çip yüzeyinin su ile yaptığı temas açısı değeri 86,52°, allil merkaptan ile modifiye edilmiş altın çipte 77,16°'ye ve UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartikül kaplanmasyla 65,55°'ye düşmüştür. Yüzeyin temas açısının önemli miktarda azalması, yüzeyin hidrofilik özelliğinin arttığını ve SPR altın çip yüzeyinin allil merkaptan ile modifiye edildiğini ve nanopartiküllerin modifiye edilmiş SPR altın çip yüzeyine tutunduğunu göstermektedir. Yüzeyin hidrofilik özelliği arttıkça yüzey serbest enerjisi (SFE) de artar. Bu çalışmada temel yaklaşım nanopartikül temelli bir SPR sensör hazırlamaktır. Bu amaçla UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartiküller SPR altın çip yüzeyine kaplanmaktadır. Nanopartiküllerin yüzeye tutturulması sonucunda yüzeydeki pürüzlülük artmaktadır. Yüzey pürüzlülüğündeki artış yüzeyin hidrofilitisini arttırmaktadır. Şekil 4.4.1.4'te temas açısı ölçümleri alınan SPR altın çip, allil merkaptan ile modifiye edilmiş SPR altın çip ve UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartikül kaplı SPR altın çip yüzeyine sırasıyla su, diiyodometan, etilen glikol ve formamid damlatılması ile elde edilen temas açılarına ait görüntüler verilmiştir.



**Şekil 4.4.1.4.** (a) Saf su, (b) etilen glikol, (c) diiyodometan, (d) formamid damlatılmış altın çip, allil merkaptan ile modifiye edilmiş altın çip ve UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartikül kaplı altın çip yüzeylerinin temas açısı görüntüleri.

#### 4.4.2. Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) analizi

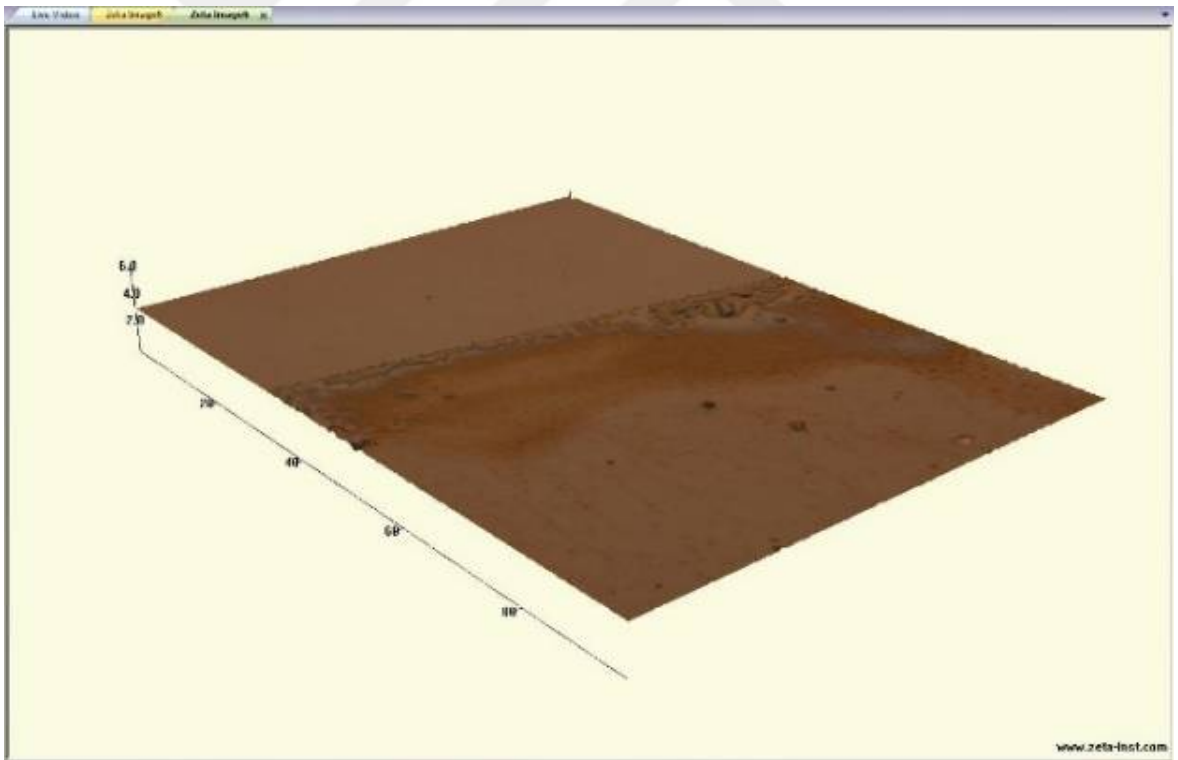
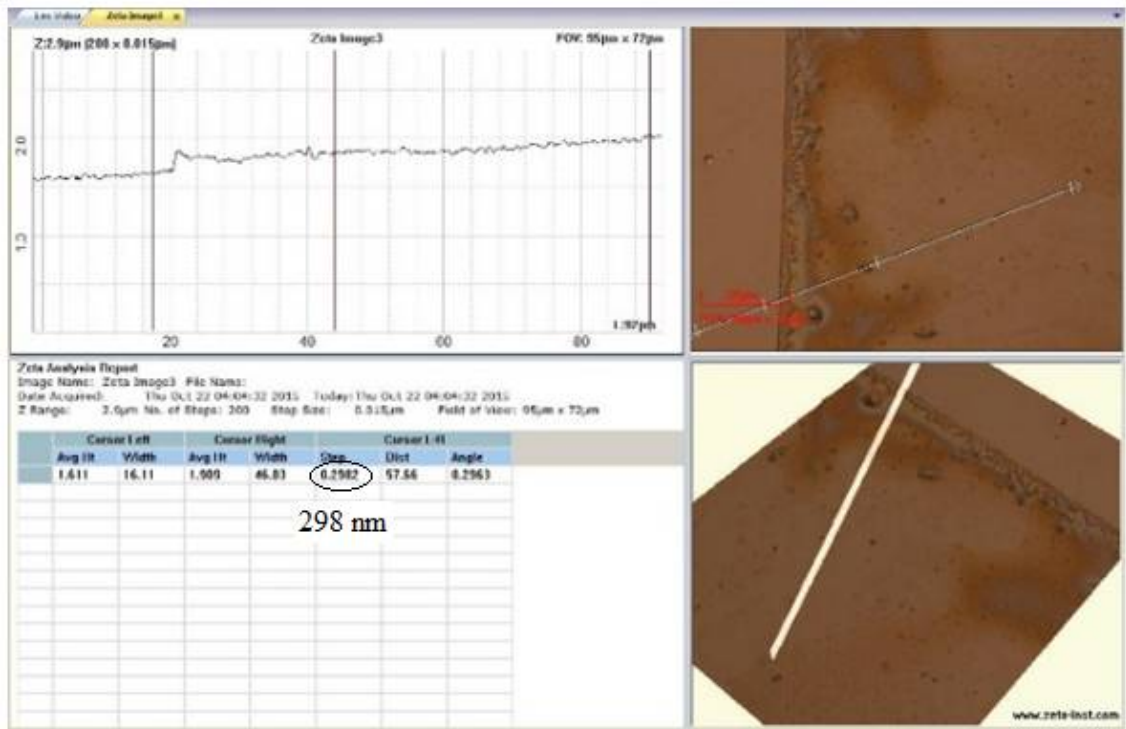
SPR altın çip yüzeyinin UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartiküller ile kaplandığını göstermek için allil merkaptan ile modifiye edilmiş altın çip ve UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartikül kaplı SPR altın çip yüzeyi atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ile karakterize edildi. AFM yarı değen modda kullanıldı. Görüntüleme çalışmaları hava ortamında gerçekleştirildi. Elde edilen görüntüler incelendiğinde allil merkaptan ile modifiye edilmiş altın çipin yüzey derinliği 31,44 nm, UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartikül kaplanmış SPR altın çip yüzeyinin derinliği ise 119,23 nm olarak ölçülmüştür. Yüzey derinliğindeki artış, poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartiküllerin yüzeyi kapladığını kanıtlamaktadır. Ayrıca derinlik değerleri SEM ve TEM ile elde edilen poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartikül boyutları ile uyumludur. Elde edilen görüntülere göre, nanopartiküllerin modifiye yüzeye homojen ve tek tabakaya yakın bir şekilde kaplandığı görülmektedir.



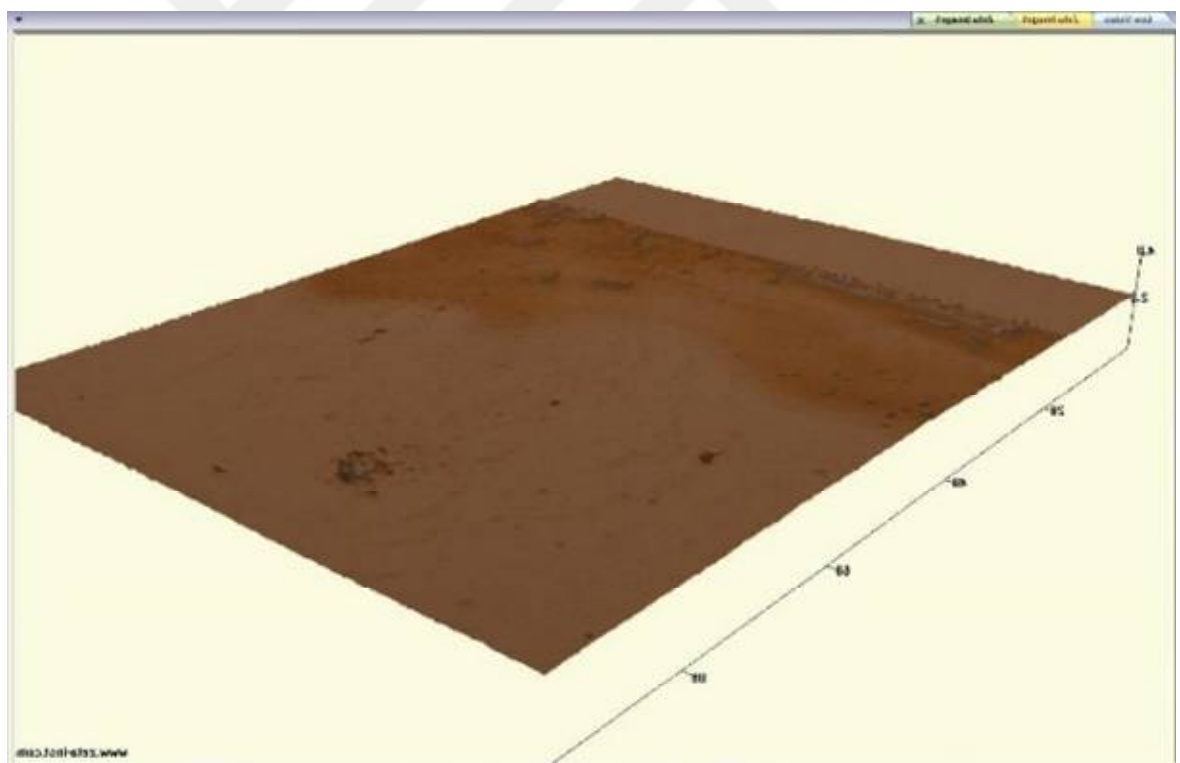
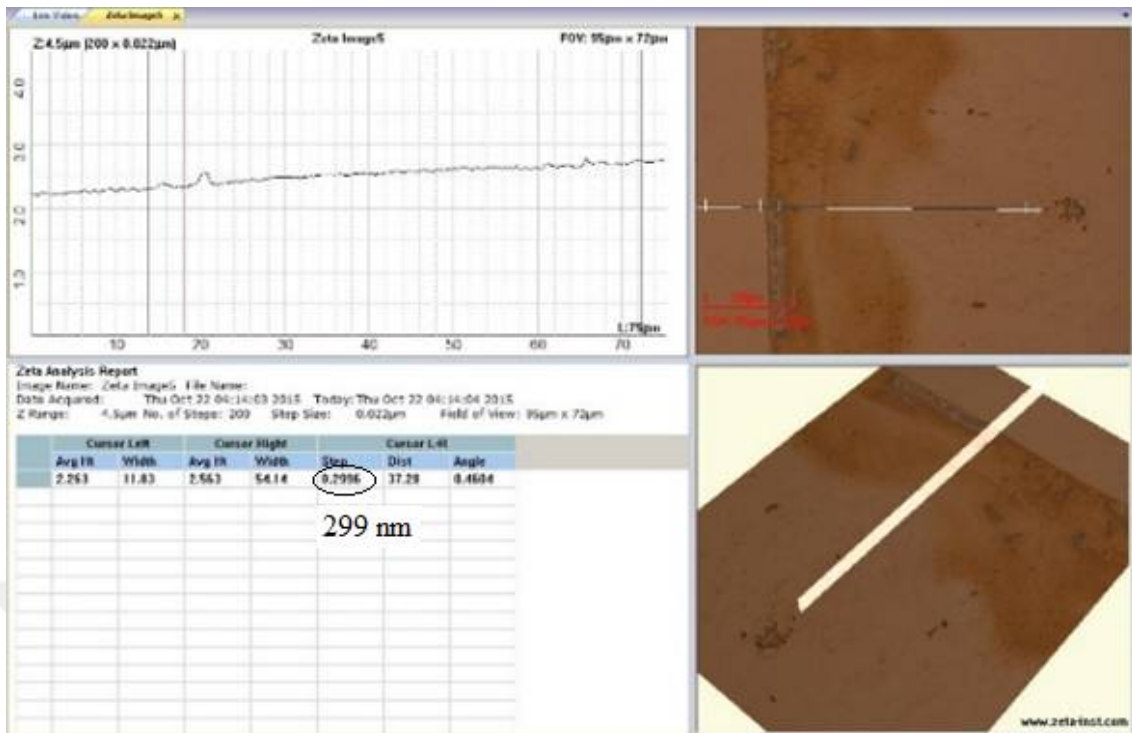
**Şekil 4.4.2.1.** (a) Allil merkaptan ile modifiye edilmiş altın çip yüzeyinin ve (b) UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartikül kaplı altın çip yüzeyinin AFM görüntüleri.

#### 4.4.3. Optik profilometre ile poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartikül kaplama kalınlığının ölçümü

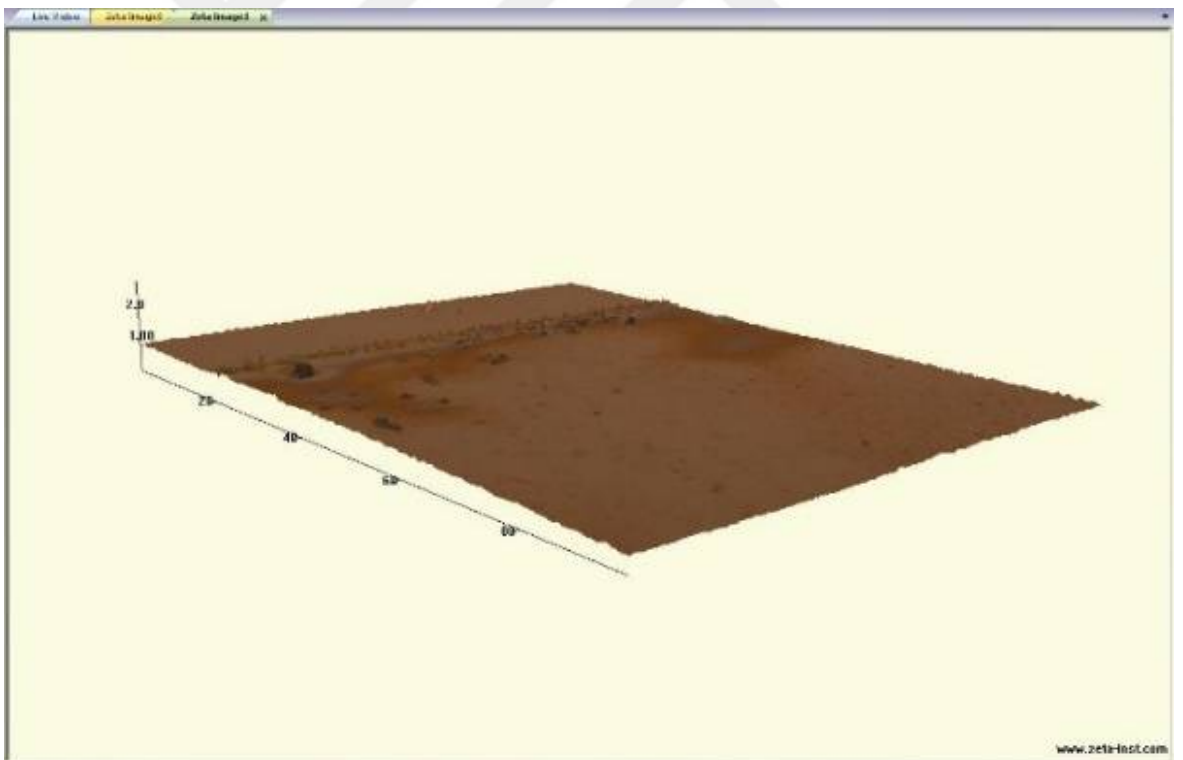
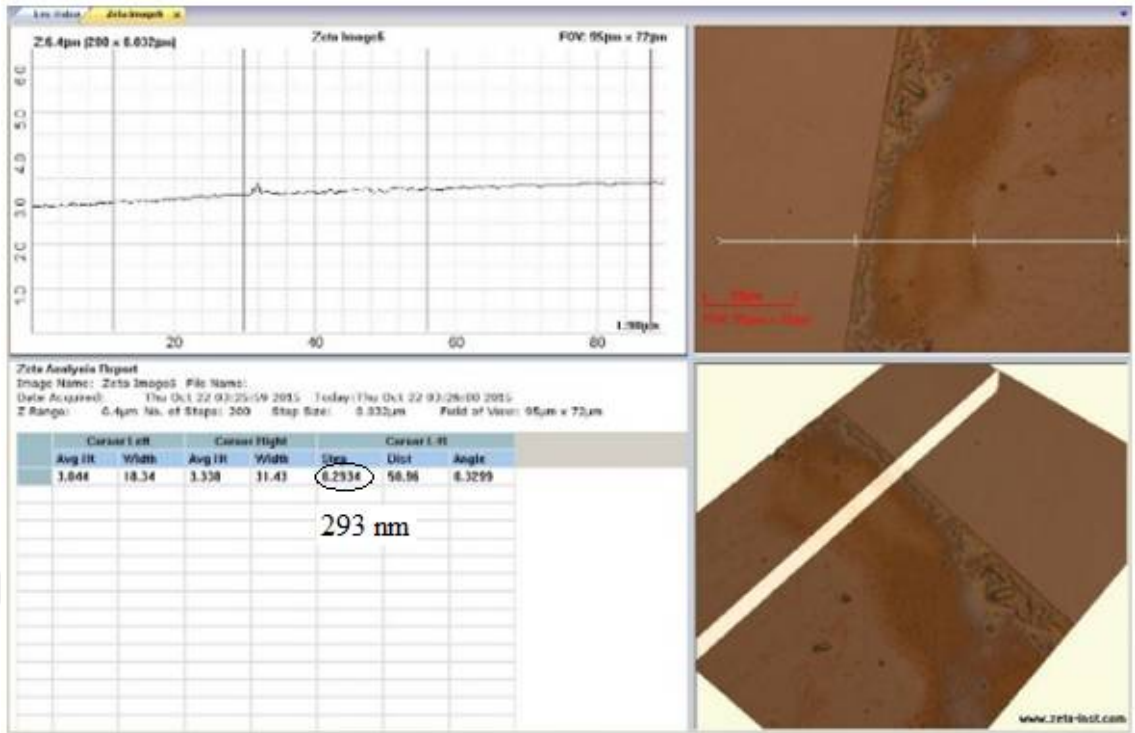
SPR altın çip yüzeyindeki UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartikül kaplama kalınlığı Zeta Instruments optik profilometre cihazı ile ölçüldü. 100 kat büyütme optik lens kullanılarak yüzey görüntüleri alındı. Cihazla birlikte verilen yazılım kullanılarak kaplama kalınlığı belirlendi.



(a)

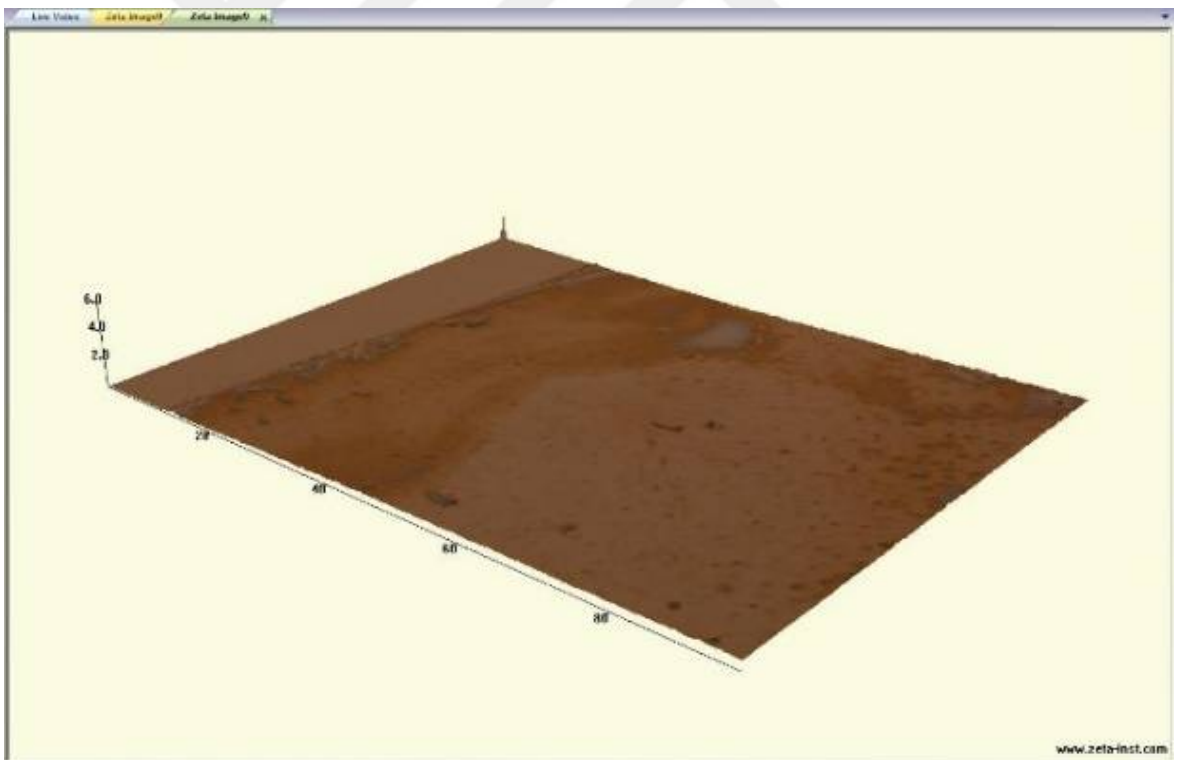
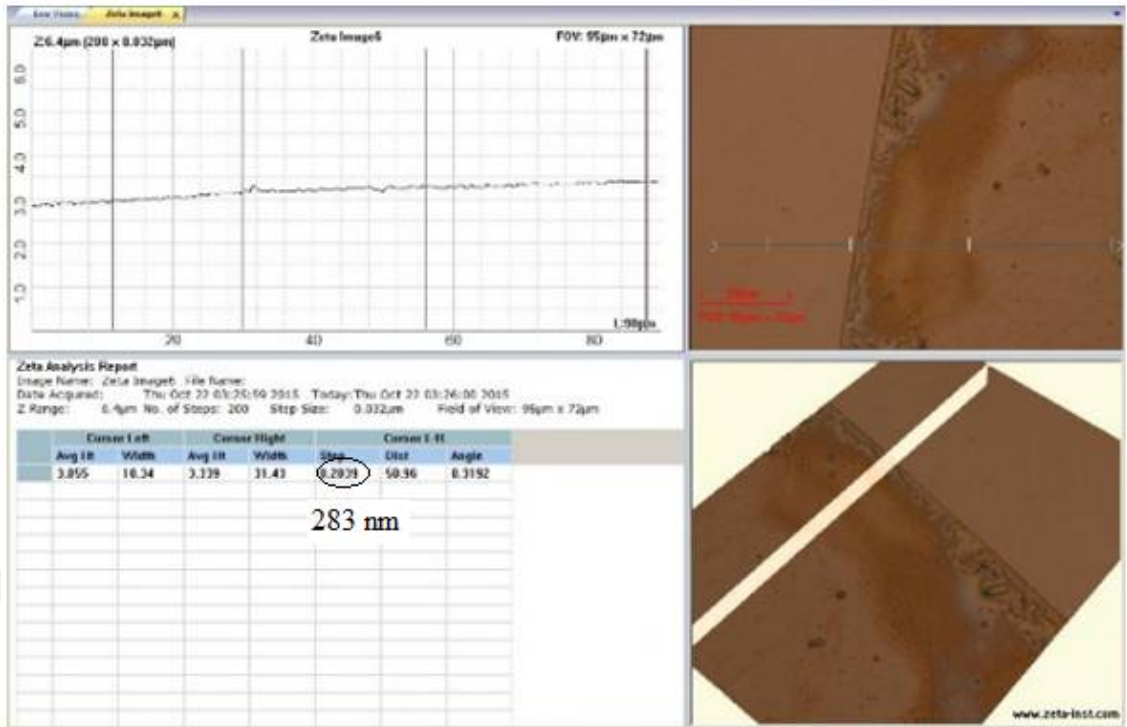


(b)

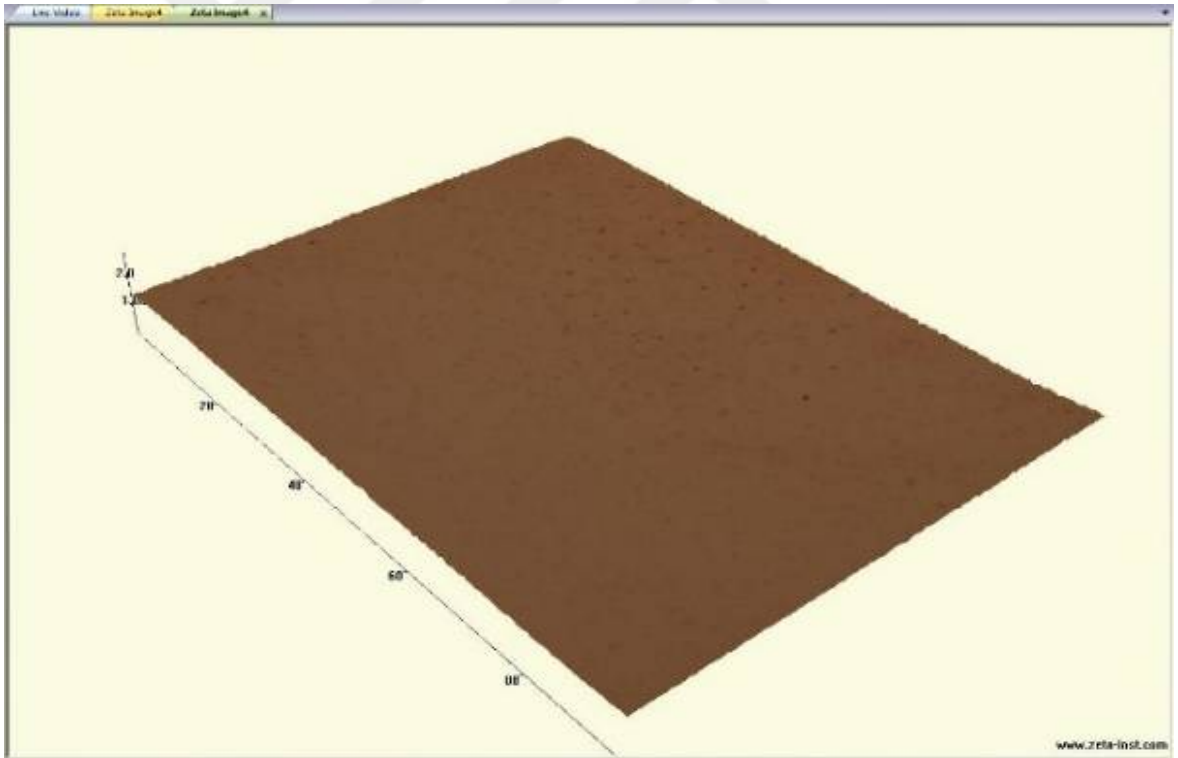
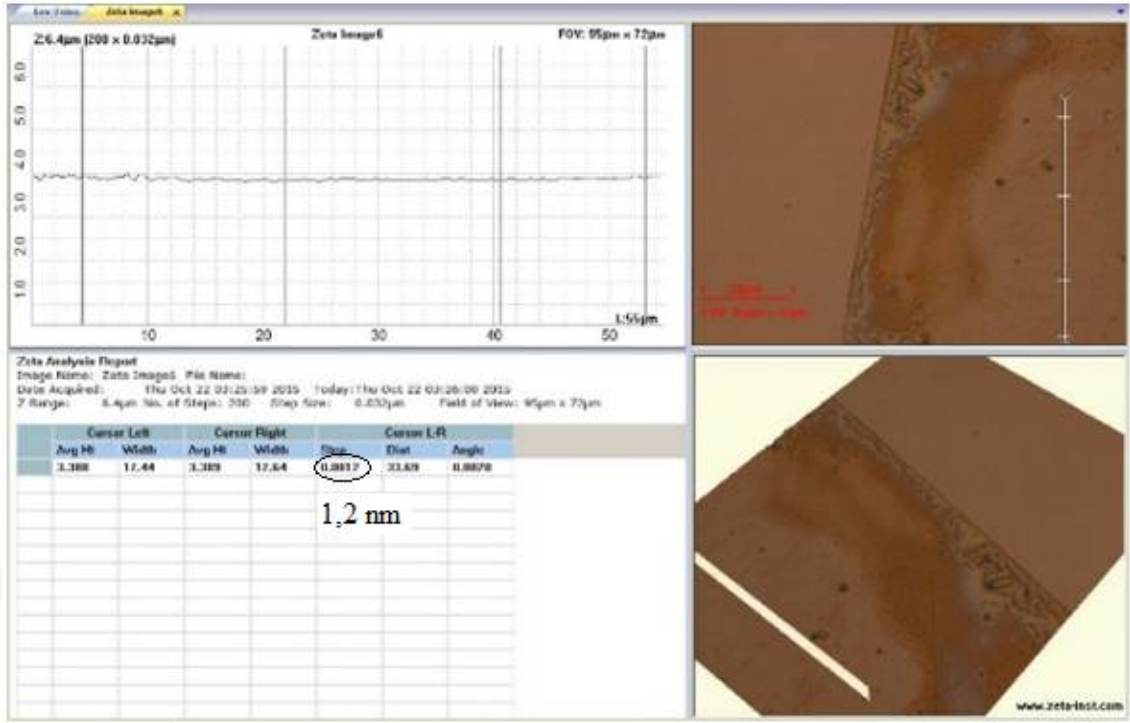


(c)





(d)



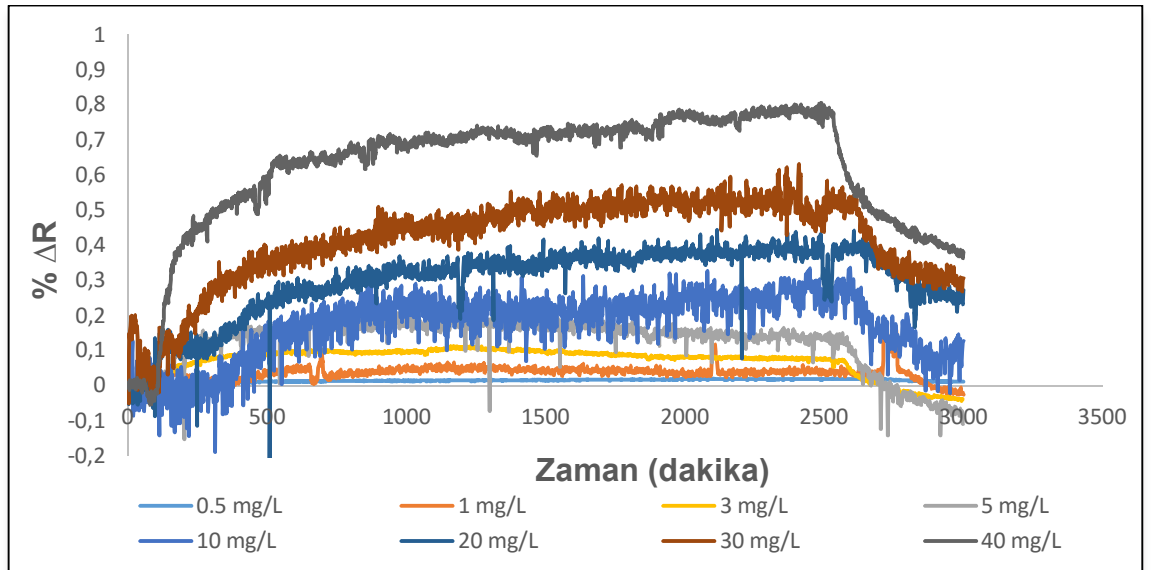
(e)

Şekil 4.4.4.1. (a-d) UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR altın çipin 4 farklı bölgesinde kaplama kalınlığı ölçümü ve (e) UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR altın çipin yüzey görüntüsü.

UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartikül kaplı SPR altın çipin 4 farklı bölgesinde kalınlık ölçümü yapılmış (Şekil 4.4.4.1 (a-d)) ve ortalama kaplama kalınlığı 293,7 ± 7,1 nm olarak bulunmuştur. SPR sensör sistemlerinde *p*-polarize ışığın rezonansa girebilmesi için gerekli penetrasyon derinliği 300 nm'dir. Hazırlanan UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> sensör yüzeyindeki kaplama kalınlığının 300 nm'nin altında olması sensör yüzeyindeki etkileşim (bağlanma) olayının hassas bir şekilde belirlenebilmesi için önemlidir. Kaplama kalınlığı, TEM, SEM ve AFM sonuçları ile de uyumaktadır. Şekil 4.4.4.1 (e)'de ise UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartiküllerin SPR altın çip yüzeyine homojen bir şekilde kaplandığı görülmektedir.

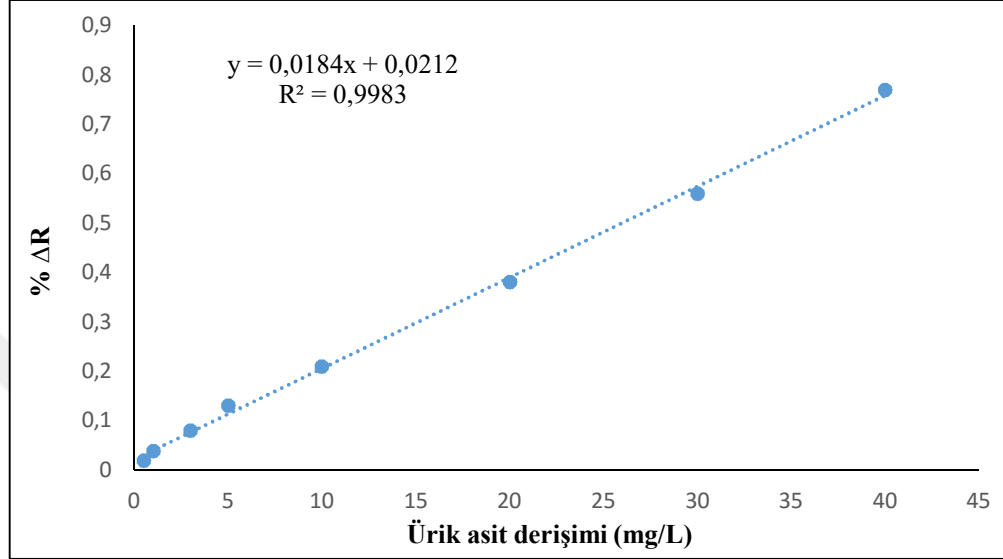
#### 4.5. UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensör ile kinetik analizler

UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensörün etkinliğinin araştırılması için ilk olarak UA derişimi ile SPR sinyali arasındaki ilişki incelendi. Farklı derişimlerde (0,5-40 mg/L) UA çözeltileri peristaltik pompa aracılığıyla UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartikül kaplı SPR sensörle etkileştirilerek sensorgramlar alındı. Derişim aralığı (0,5-40 mg/L) UA'in çözünürlüğüne göre belirlendi. UA'in sudaki çözünürlüğünün düşük olmasından dolayı (Kelley ve Weiner 1978) hazırlanabilen en derişik UA çözeltileri 40 mg/L'dir. Şekil 4.5.1'de UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> sensörün farklı derişimlerde UA çözeltileri ile etkileşimden elde edilen sensorgramlar görülmektedir.



**Şekil 4.5.1.** UA çözeltileri ile UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensörün etkileşimine ait sensorgramlar.

Şekil 4.5.1’de verilen sensorgramdan görüldüğü gibi yüzeye UA çözeltileri gönderildiğinde %  $\Delta R$  değeri artmaktadır. Standart bir ölçümde; sistemden ilk önce pH: 8 çözeltisi, daha sonra sistem yeniden dengeye ulaşana kadar UA çözeltisi (pH: 8, 0,5-40 mg/L) geçirildi. Son basamakta tekrar pH: 8 çözeltisi kullanıldı. Bütün ölçümlerde analiz 15 dakikada gerçekleşti.



Şekil 4.5.2. 0,5-40 mg/L aralığında UA derişimi ile %  $\Delta R$  arasındaki ilişki.

Şekil 4.5.2’de 0,5-40 mg/L derişim aralığındaki UA çözeltileri ve %  $\Delta R$  arasındaki ilişki verilmiştir. Verilerin daha duyarlı değerlendirilebilmesi için yaygın olarak anlık % kırılma değeri ile başlangıç % kırılma değeri arasındaki farkı gösteren  $\Delta R$  değeri kullanılmaktadır (Osman ve ark. 2013). UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensör, 0,5-40 mg/L derişim aralığında derişim-sinyal doğrusallığı göstermektedir. Bu aralıktaki veriler değerlendirildiğinde elde edilen doğrunun denklemi  $y = 0,0184x + 0,0212$  ve  $R^2 = 0,9983$ ’tür. Buna göre; kalibrasyon grafiğine ait yukarıdaki denklemde m (eğim) değeri ve 0,5 mg/L derişimindeki UA çözeltisine ait s (standart sapma) değeri kullanılarak tayin sınırı (LOD) 0,247 mg/L olarak hesaplandı. Tayin sınırının hesaplanması için  $3s/m$  eşitliğinden yararlanıldı. Tayin limitinin (LOQ) hesaplanması için  $10s/m$  eşitliğinden yararlanıldı ve 0,825 mg/L olarak belirlendi.

Zen ve Chen (1997) tarafından geliştirilen voltametrik sensörde ürik asit ve dopamin eş zamanlı ölçülmüştür. Tayin limitleri ürik asit ve dopamin için sırasıyla 0,2  $\mu M$  (0,0336 mg/L) ve 2,7 nM (0,413 mg/L) olarak bulunmuştur.

Poli(*o*-aminofenol)-modifiye bienzim (ürrikaz ve horseradish peroksidaz) karbon pasta elektrodu ile alınan ölçümler sonucu ürik asit için tayin limiti  $3 \times 10^{-6}$  M (0,504 mg/L) olarak bulunmuştur. Fakat enzimatik ölçüme dayanan bu sensör sistemi oda koşulları altında en fazla 2 gün kararlı kalabilmektedir. Bu da büyük bir dezavantajdır. Ayrıca askorbik asidin girişim etkisi nedeniyle ürik asit için alınan sinyal % 2-15 arası artmaktadır. Bu da sapmalara neden olmaktadır (Miland ve ark. 1996).

Ürik asit tayini için sistematik voltametrik-amperometrik ölçümlerin alındığı sensör sisteminde yüzey modifiye screen-printed elektrotlar kullanılmıştır. Askorbik asidin girişim etkisini elimine edebilmek için yüzey Nafion ya da L-askorbik ait oksidaz enzimi ile modifiye edilmiştir. Ürik asit için tayin limiti  $2,54 \times 10^{-6}$  mol/L (0,426 mg/L) olarak bulunmuştur. Fakat enzim adsorbe edilen elektrodta 0,53 mmol/L askorbik asit derişimine kadar askorbik aside herhangi bir cevap vermezken bu değerin üzerine çıkıldığında askorbik asidin girişim etkisi gösterdiği bildirilmiştir (Gilmartin ve ark. 1992).

Wang ve arkadaşları (2000) tarafından glukoz, ürik asit, askorbik asit ve asetaminofenin eş zamanlı tayini için mikro boyutta kapiler elektroforez çipleri geliştirilmiştir. Glukoz için tayin limiti  $6 \times 10^{-6}$  M, askorbik asit ve ürik asitin her ikisi için  $5 \times 10^{-6}$  M (0,84 mg/L) olarak bulunmuştur. Fakat ayırma kanalında gerçekleşen enzimatik reaksiyon nedeniyle ürünler belli bir süre sonunda akış kanalını tıkayabilmektedir. Bu nedenle çoklu analitlerin eş zamanlı ölçümlerinde çok kanallı ayırma çiplerine ihtiyaç duyulmaktadır (Wang ve ark. 2000).

Bu çalışmada elde edilen LOD ve LOQ değerleri literatürdeki diğer çalışmalar ile elde edilen değerler ile karşılaştırılabilecek kadar düşüktür. Ayrıca moleküler baskılanmış polimer kullanılması ile UA'in seçici olarak tayini mümkün olmaktadır. Hazırlanan sensör diğer sensörlerde problem olarak karşımıza çıkan girişimci moleküllerin etkisini de ortadan kaldırabilecek özelliktedir.

Çizelge 4.5.1'de diğer UA baskılanmış polimerlerin kullanıldığı diğer analitik sistemler için elde edilen tayin limitleri verilmiştir.

**Çizelge 4.5.1.** UA baskılanmış polimerlerin kullanıldığı analitik sistemlerde tayin limitleri.

Kullanılan UA baskılanmış polimer	Kullanılan Yöntem	Tayin limiti	Referans
UA baskılanmış poli(melamin-co-kloranil)-modifiye- civa damla elektrod	Voltametre	0,0008 mg/L	Prasad ve ark. 2007
UA baskılanmış modifiye- civa damla elektrod	Voltametre	0,024 mg/L	Prasad ve ark. 2007
UA baskılanmış poli(N,N-bis(4-aminofenil)-N',N'-difenil-1,4-fenilendiamin)-(3,3',4,4'-benzofenonetetra karboksilik dianhidrit)	Amperometre	2,4x10 <sup>-3</sup> mM (0,403 mg/L)	Chen ve Ho 2007
UA baskılanmış poli-metakrilik asit	Amperometre	22 µM (3,7 mg/L)	Chen ve ark. 2009
UA baskılanmış poli(N,N-bis(4-aminofenil)-N',N'-difenil-1,4-fenilendiamin)-(3,3',4,4'-benzofenonetetra karboksilik dianhidrit)	Amperometre	0,3 µM (0,05 mg/L)	Chen ve ark. 2010
UA baskılanmış poli-o-fenilendiamin	Doğrusal süpürme voltametresi	8 x 10 <sup>-8</sup> mol/L (8 x 10 <sup>-5</sup> mg/L)	Peng 2013
UA baskılanmış poli(akrilik asit- etilen glikol dimetakrilat)	Voltametre	0,1 µM (0,0168 mg/L)	Motghare ve ark. 2015
UA baskılanmış titania (tityum dioksit)	Spektrofotometre	10 µmol (1,68 mg/L)	Mujahid ve ark. 2015

#### 4.6. Denge ve Bağlanma Kinetik Analizleri

SPR biyosensörlerde, rezonans sinyalindeki değişimler % kırınma, % ΔR, rezonans birimi (RU) gibi farklı şekillerde ifade edilebilir. Bu değişimler zamanın fonksiyonu olarak izlenir ve sensorgramlar ile gösterilir. Bu verilerden, sensör ile analit arasındaki bağlanma kinetik sabitleri hesaplanabilir. Analit (A) ve SPR sensör (B) arasında akış hücresinde oluşan AB kompleksinin oluşumu basit olarak şu şekilde gösterilebilir,



Burada;  $k_m$  analitin yüzeye ve yüzeyden kütle aktarım hız sabiti (her iki yönde de aynıdır);  $k_a$  ve  $k_d$  kompleks oluşum hız sabitleridir.

İdeal koşullar altında, ne analitin sensör yüzeyine aktarımı ne de yüzeyden çözeltiye aktarımı bağlanma kinetiğini etkilememektedir. Bu durum, aktarımın bağlanmaya göre daha hızlı gerçekleştiği durumlarda gerçekleşmektedir. Böylelikle analit derişimi çözeltide sabit kalmakta, ve ayrıca başlangıç derişimi ( $[B]_0$ ) etkilenmemektedir (Glaser 1993). Bu koşullar altında kompleks oluşum hızı şu şekilde tanımlanır:

$$d[AB]/dt = k_a[A]([B]_0 - [AB]) - k_d[AB] \quad (4.6.2)$$

Burada;  $[AB]$  bağlanan analit miktarı;  $[A]$ , serbest analit miktarı;  $[B]_0$ , sensörün toplam ligand yoğunluğudur. Bu durumda bağlanma ileri ve geri yöndeki hız sabitleri ve bağlanma sabitleri aşağıda anlatılan iki yaklaşım kullanılarak hesaplanmaktadır.

#### - Denge Analizi

Toplam ligand miktarı ( $[B]_0$ ), yüzeyin maksimum analit bağlama kapasitesi olarak tanımlanırsa; diğer tüm derişim değerleri SPR sinyali olarak ifade edilebilir. Böylelikle kütlemin derişime dönüştürülme işleminin yapılmasına gerek kalmayacaktır. Serbest analit derişiminin akış hücresinde sabit kaldığı yalancı-birinci derece koşulları altında bağlanma şu şekilde ifade edilir:

$$d\Delta R / dt = k_a C(\Delta R_{maks} - \Delta R) - k_d \Delta R \quad (4.6.3)$$

Burada;  $d\Delta R / dt$ , SPR sinyalinin değişim hızı;  $R$  ve  $R_{maks}$ , bağlanma ile ölçülen ve maksimum sinyal;  $C$ , analit derişimi (mg/L),  $k_a$ , bağlanma hız sabiti (L/mg.s) ve  $k_d$ , ayrılma hız sabiti (1/s)'dir. Bağlanma sabiti  $K_A$  (L/mg),  $k_a$  ve  $k_d$  sabitlerinin oranından hesaplanır ( $K_A = k_a / k_d$ ). Denge durumunda,  $d\Delta R / dt = 0$  alınarak eşitlik basitleştirilir:

$$\Delta R_{denge} / C = K_A \Delta R_{maks} - K_A \Delta R_{denge} \quad (4.6.4)$$

Bundan dolayı, bağlanma sabiti  $K_A$ ,  $\Delta R_{denge} / C$  'ye karşı  $\Delta R_{denge}$  grafiğinden hesaplanır. Ayrılma sabiti  $K_D$  ise;  $1/K_A$  eşitliği ile hesaplanabilir.

### -Bağlanma Kinetik Analizi

Eşitlik 4.6.3 tekrar düzenlendiğinde;

$$d\Delta R / dt = k_a C \Delta R_{maks} - (k_a C + k_d) \Delta R \quad (4.6.5)$$

eşitliği elde edilir. Buradan, etkileşim kontrollü kinetikler için çizilen  $d\Delta R / dt$  'ye karşı  $\Delta R$  grafiğinin, eğimi  $-(k_a C + k_d)$  olan bir doğru verdiği görülmektedir. Başlangıç bağlanma hızı analit derişimiyle doğrusal bir ilişki içerisinde ve kantitatif olarak derişim belirlenmesinde kullanılır. Eğer  $R_{maks}$  değeri biliniyorsa, tek bir sensorgram kullanılarak  $k_a$  ve  $k_d$  değerleri hesaplanabilir. Yüzeyi tamamen doyunluğa erіştirmek için çok yüksek analit derişimleri gerekli olduğu için  $R_{maks}$  'un deneysel olarak belirlenmesi zordur. Tercih edilen yaklaşım, birçok farklı analit derişimlerinde bağlanma sensorgramlarının alınmasıdır. İleri ve geri yöndeki hızların analizi için çizilen  $d\Delta R / dt$  'ye karşı  $\Delta R$  grafikleri, ileri ve geri yöndeki hız sabitleri ile ilişkili bir eğim değeri ( $S$ ) vermektedir:

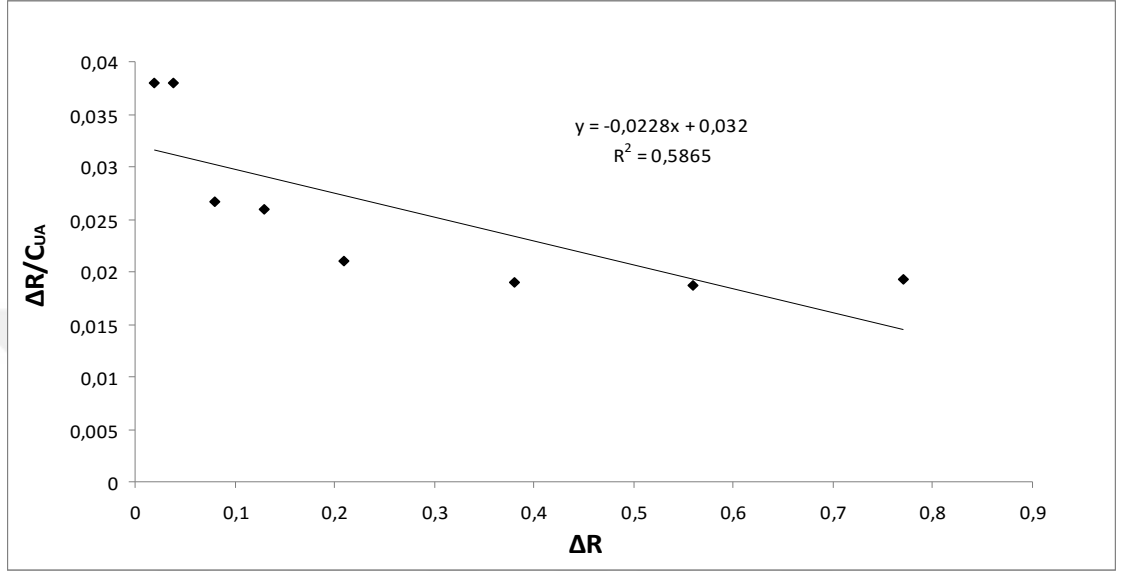
$$S = k_a C + k_d \quad (4.6.6)$$

$S$  'ye karşı  $C$  grafiği, eğimi  $k_a$  olan bir doğru vermektedir. Teorik olarak kesim noktası  $k_d$  değerini vermektedir. Fakat,  $k_a C \gg k_d$  olduğu durumlarda  $k_d$  hesaplaması için bu yöntem çok güvenilir değildir. Daha güvenilir yöntem, ayrılma kinetiğinin incelenmesidir.

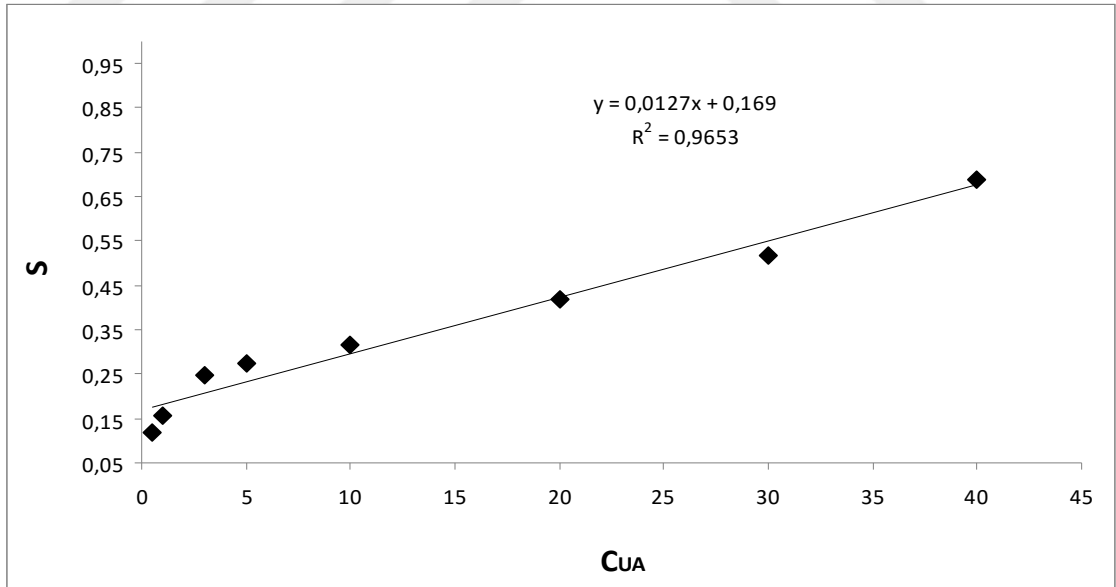
$$\ln(\Delta R_0 / \Delta R_t) = k_d (t - t_0) \quad (4.6.7)$$



Burada;  $\Delta R_0$  ve  $\Delta R_t$ , ayrılma eğrisindeki  $t_0$  ve  $t$  anlarındaki SPR sinyal değerleridir (Lin ve ark. 2005). Şekil 4.6.1’de denge analizi ve bağlanma kinetik analizi için çizilen doğrular verilmiştir. Bu doğrulara ait denklemlerden hesaplanan  $\Delta R_{maks}$ ,  $k_a$ ,  $k_d$ ,  $K_A$  ve  $K_D$  değerleri Çizelge 4.6.1’de özetlenmiştir.



(a)



(b)

**Şekil 4.6.1.** Kinetik hız sabitlerinin belirlenmesi. (a) Denge analiz yaklaşımı ve (b) bağlanma kinetik yaklaşımı.

**Çizelge 4.6.1.** Kinetik hız sabitleri.

<i>Denge Analiz (Scatchard)</i>		<i>Bağlanma Kinetik Analizi</i>	
$\Delta R_{maks}$	<b>0,713</b>	$k_a$ , mg/L.s	<b>0,0127</b>
$K_A$ , mg/L	<b>0,0228</b>	$k_d$ , 1/s	<b>0,169</b>
$K_D$ , L/mg	<b>43,85</b>	$R^2$	<b>0,9653</b>
$R^2$	<b>0,5865</b>		

#### 4.7. Denge izoterm modelleri

UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensör ile UA arasındaki etkileşim modelini belirlemek amacıyla üç farklı izoterm modeli uygulanmıştır: Langmuir; Freundlich ve Langmuir-Freundlich (LF) (Sips) modelleri.

Langmuir 
$$\Delta R = \{\Delta R_{maks} [C] / K_D + [C]\}$$

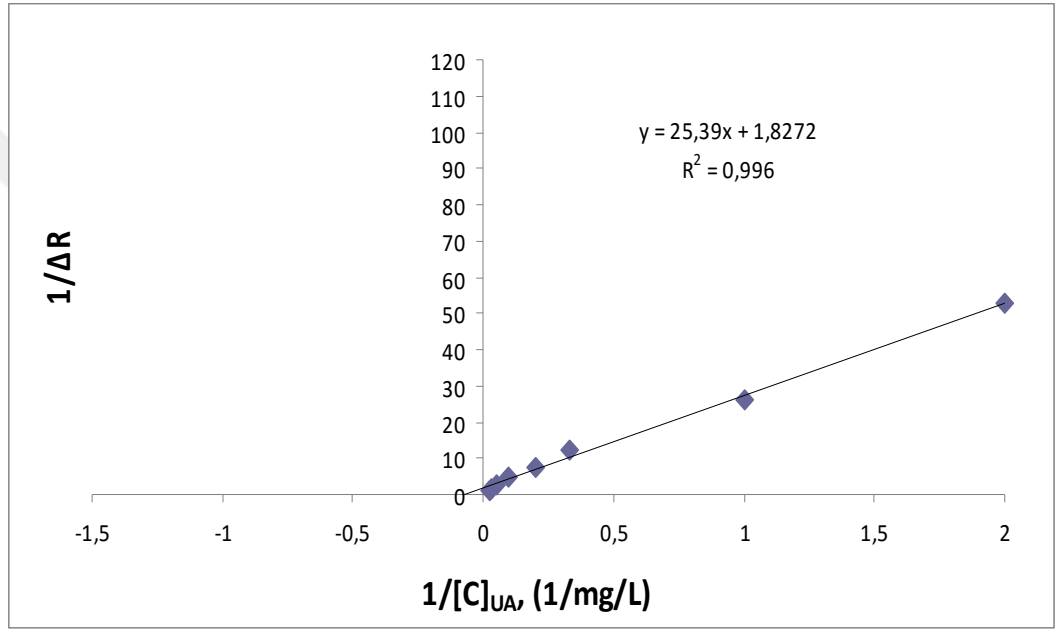
Freundlich 
$$\Delta R = \Delta R_{maks} [C]^{1/n}$$

Langmuir-Freundlich 
$$\Delta R = \{\Delta R_{maks} [C]^{1/n} / K_D + [C]^{1/n}\}$$

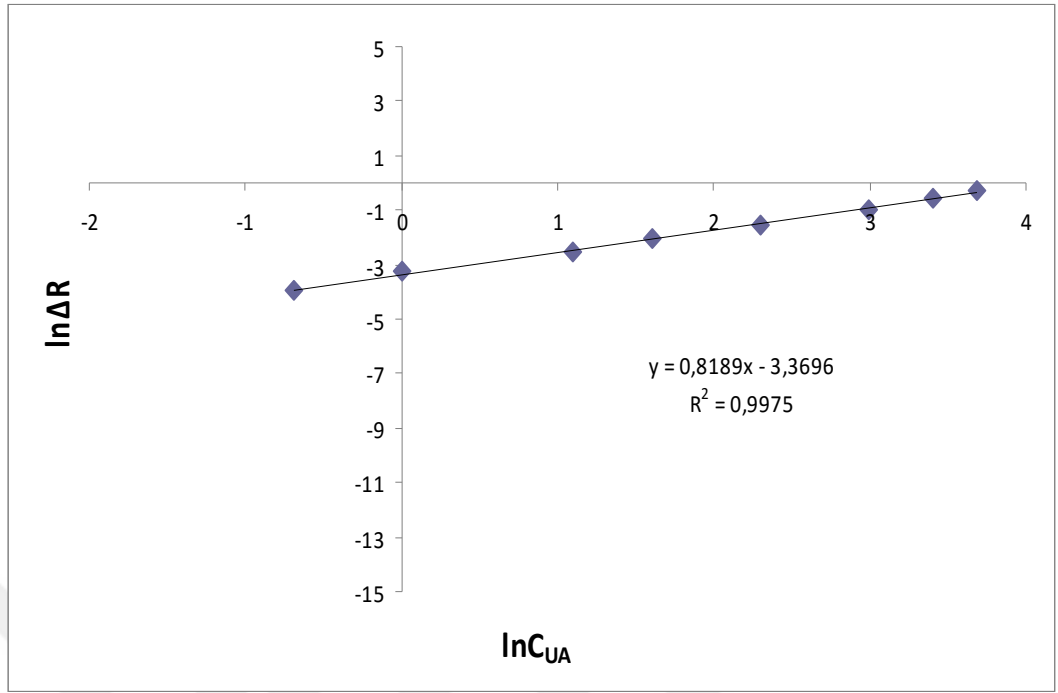
Burada;  $\Delta R_{maks}$ , maksimum SPR sinyal kayması;  $\Delta R$ , denge halindeki SPR sinyal kayması;  $[C]$ , analit derişimi (mg/L);  $K_A$  (mg/L), bağlanma denge sabiti;  $K_D$  (L/mg), ayrılma denge sabiti;  $1/n$ , Freundlich yüzey heterojenite indeksidir.

Homojen bağlanma bölgeleri modeli olan Langmuir modeli moleküler baskılanmış polimerlerin kullanıldığı bağlanma izotermelerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Li ve Husson 2006). Fakat, son dönemlerde yapılan çalışmalara göre MIP'lerin bir miktar heterojen bağlanma bölgelerine de sahip olduğu rapor edilmiştir (Umpleby ve ark. 2001,

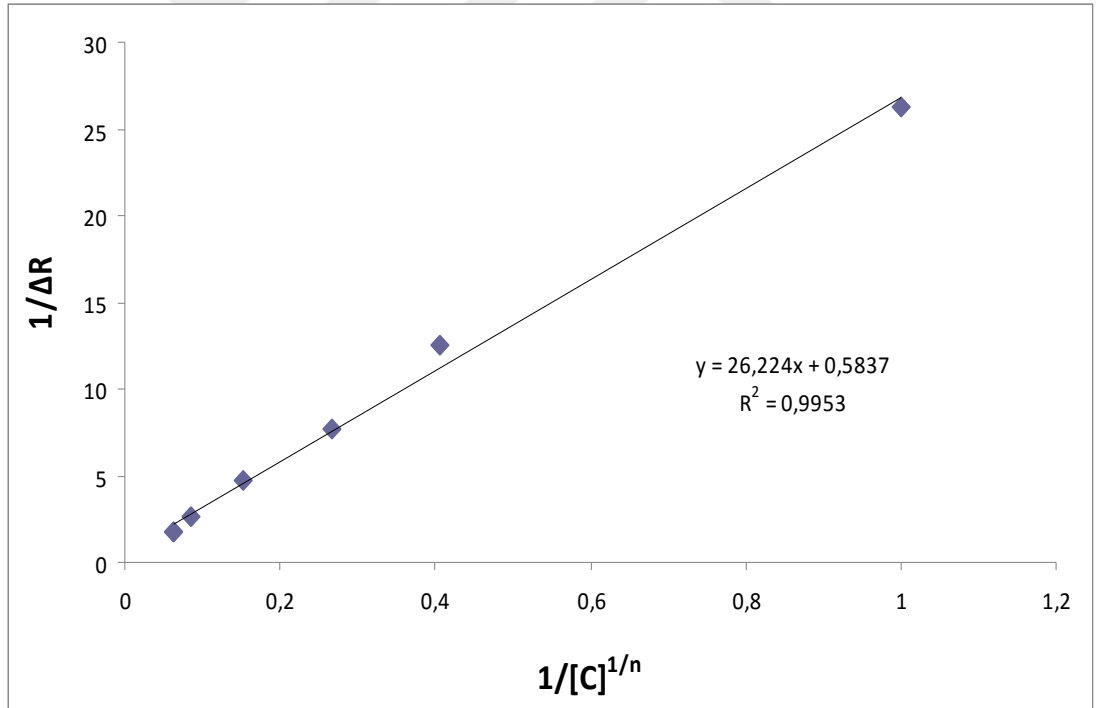
Wei ve ark. 2005). Freundlich modeli heterojen bir modeldir (Umpleby ve ark. 2001). Langmuir-Freundlich modeli (LF), doyunluğa kadar geniş derişim aralığında heterojenite ile bilgi sağlamakta ve adsorpsiyon davranışı daha tutarlı tanımlamaktadır. Şekil 4.7.1’de Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich modellerine ait grafikler verilmiştir. Bu grafiklerin çizilmesinde daha önce belirtildiği gibi kütle-derişim dönüşümlerini önlemek amacıyla bazı parametre değışimleri yapılmıştır ( $Q_{maks} = \Delta R_{maks}$ ,  $Q = \Delta R$ ).



(a)



(b)



(c)

Şekil 4.7.1. (a) Langmuir; (b) Freundlich; (c) Langmuir-Freundlich adsorpsiyon modelleri.

**Çizelge 4.7.1.** Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich parametreleri.

<b>Langmuir</b>		<b>Freundlich</b>		<b>Langmuir-Freundlich</b>	
$\Delta R_{maks}$ , mg/L	<b>0,547</b>	$\Delta R_{maks}$ , mg/L	<b>29,04</b>	$\Delta R_{maks}$ , mg/L	<b>1,715</b>
$K_D$ , L/mg	<b>13,88</b>	$1/n$	<b>0,8189</b>	$1/n$	<b>0,8189</b>
$K_A$ , mg/L	<b>0,072</b>	$R^2$	<b>0,9975</b>	$K_D$ , L/mg	<b>44,97</b>
$R^2$	<b>0,996</b>			$K_A$ , mg/L	<b>0,022</b>
				$R^2$	<b>0,9953</b>

UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensör için Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich izoterm modelleri için elde edilen parametreler Çizelge 4.7.1’de verilmiştir. Korelasyon katsayıları karşılaştırıldığında sonuçların hem Langmuir ( $R^2 = 0,996$ ) hem de Freundlich ( $R^2 = 0,9975$ ) izoterm modellerine uyduğu görülmektedir. Ayrıca Langmuir-Freundlich izoterm modeline ait korelasyon katsayısı da yüksektir ( $R^2 = 0,9953$ ). Korelasyon katsayılarına bakıldığında 0,5-40 mg/L UA derişim aralığında bağlanmanın hangi adsorpsiyon izoterm modeline uyduğunu net olarak söylemek mümkün değildir. Freundlich izoterm eşitliği empirik bir eşitliktir ve her farklı tür bağlanma bölgesinin ayrı ayrı Langmuir eşitliğine uyduğu varsayılarak türetilebilir. Freundlich eşitliğine göre adsorpsiyon miktarı derişimdeki artışla doğrusal bir şekilde artar. Bu nedenle Freundlich eşitliği düşük derişimlerde adsorpsiyonun doğasını açıklamak için uygundur. Ürik asidin çözünürlüğünün düşük olması nedeniyle (maksimum 40 mg/L) Freundlich izoterm modeli Langmuir izoterm modeline benzer şekilde deneysel verilerle yüksek korelasyon katsayıları ile uyum sağlamıştır. Daha geniş derişim aralıklarında bağlanma bölgelerinin heterojenitesi ile ilgili bilgi veren Langmuir-Freundlich izotermi de deneysel veriler ile uyumludur. Tüm modeller için hesaplanan parametre değerleri Çizelge 4.7.1’de verilmiştir.

#### 4.8. Yarışmalı Kinetik Analizler

Askorbik asit (AA), üre (U) ve teofilin (Teo) için UA moleküllerine göre dağılma ve seçicilik katsayıları aşağıdaki eşitliğe göre belirlenmiştir:

$$K_d = [(C_i - C_f) / C_f] \times V / m \quad 4.8.1$$

Eşitlikte  $K_d$ , dağılma katsayısını (L/mg);  $C_i$  ve  $C_f$ , biyomoleküllerin başlangıç ve sonuç derişimlerini (mg/L);  $V$ , kullanılan çözelti hacmini (L) ve  $m$ , polimerin ağırlığını (mg) ifade etmektedir. SPR sensör uygulamalarında, derişim ve kütle parametrelerinin dönüştürülmesi gerçekleştirilmektedir (Lin ve ark. 2005). Bu yaklaşımdaki temel sebepler; başlangıç ve son derişimleri arasında önemli bir fark gözlenememesi; polimerin kütlesinin kesin olarak belirlenememesi ve derişimin  $\Delta R$  ile doğrusal ilişkide olmasıdır. Bu durumda; seçicilik katsayısı  $k$ ,

$$k = \Delta R_{\text{kalıp}} / \Delta R_{\text{girişimci}} \quad 4.8.2$$

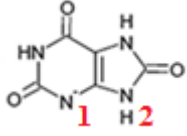
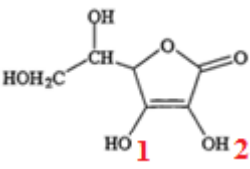
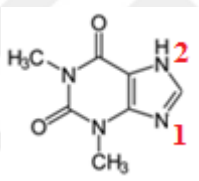
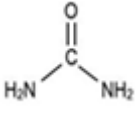
şeklinde kullanılabilir. Baskılama seçiciliğinin belirlenmesi için ise;

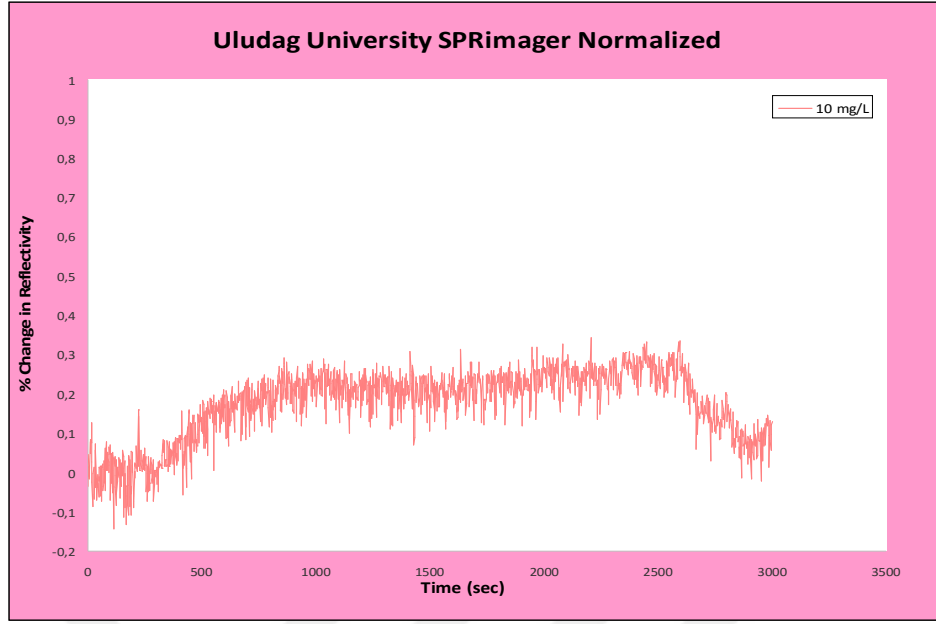
$$k' = k_{\text{baskılanmış}} / k_{\text{kontrol}} \quad 4.8.3$$

şeklinde ifade edilebilir. Hazırlanan UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensörün ürik asite karşı seçiciliği ürik asit (10 mg/L), askorbik asit (10 mg/L), üre (100 mg/L) ve teofilin (10 mg/L) çözeltileri ve 10 mg/L derişimindeki ürik asit, askorbik asit, teofilin ve üre çözeltilerinin kullanılmasıyla oluşturulan karışımlar (ikili, üçlü, dörtlü) kullanılarak araştırılmıştır. Hazırlanan sensörün karışımlara verdiği cevap, Şekil 4.8.1'de %  $\Delta R$ /zaman ilişkilerine ait sensorgramlarda görülmektedir. Şekil 4.8.2'de ise ürik asit, askorbik asit, teofilin ve üre kullanılmasıyla hazırlanan çözeltiler ile UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensör arasındaki etkileşim ile elde edilen sensör cevapları karşılaştırılmıştır. Teofilin moleküler yapı olarak ürik asite benzerliğinden dolayı seçilmiştir. Askorbik asit biyolojik sıvılarda bulunan bir moleküldür. Daha önce UA için hazırlanan elektrokimyasal sensörlerde askorbik asit ve ürik asitin yakın yükseltgenme potansiyeline sahip olmalarından dolayı ürik asitin girişim yaptığı, dolayısıyla ürik asitin hassas bir şekilde tayin edilemediği rapor edilmiştir (Goyal ve ark. 2005). Bu nedenle

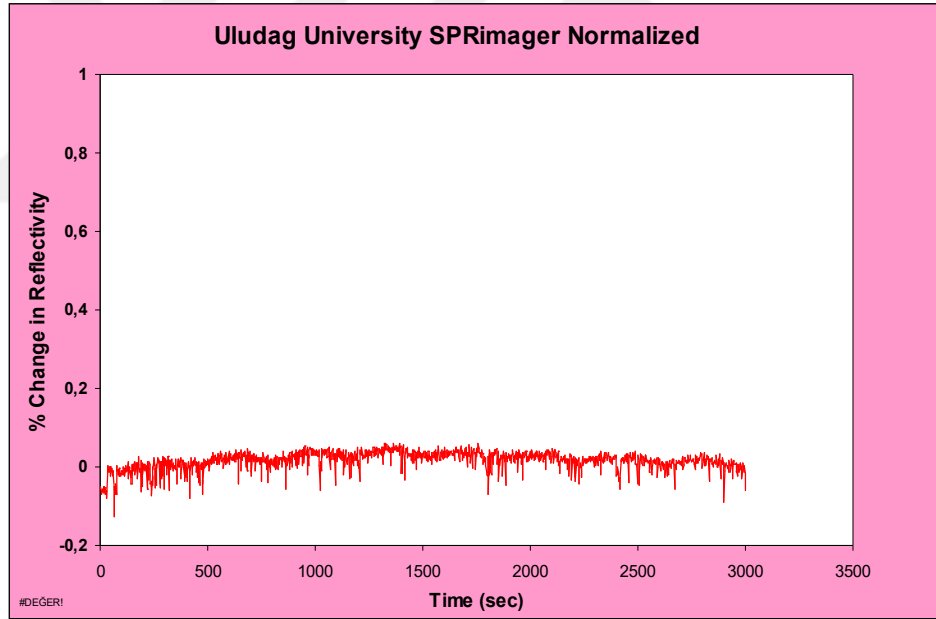
askorbik asit varlığında ürik asitin seçici bir şekilde tayini oldukça önemlidir. Üre ise ürik asit tayininde sıklıkla kullanılan idrarda bulunmasından dolayı tercih edilmiştir. Yarışmalı kinetik analizlerde kullanılan biyomoleküller ve özellikleri Çizelge 4.8.1 de özetlenmiştir.

**Çizelge 4.8.1.** Kalıp ve yarışmacı biyomoleküllerin molekül formülleri ve asitlik/bazlık sabitleri.

Biyomolekül	Molekül Formülü	Asitlik Sabiti
Ürik asit		pKa(1): 5,4 pKa(2): 10,3
Askorbik asit		pKa(1): 4,17 pKa(2): 11,57
Teofilin		pKa(1): 1,0 pKa(2): 9,0
Üre		pKa: 13,82

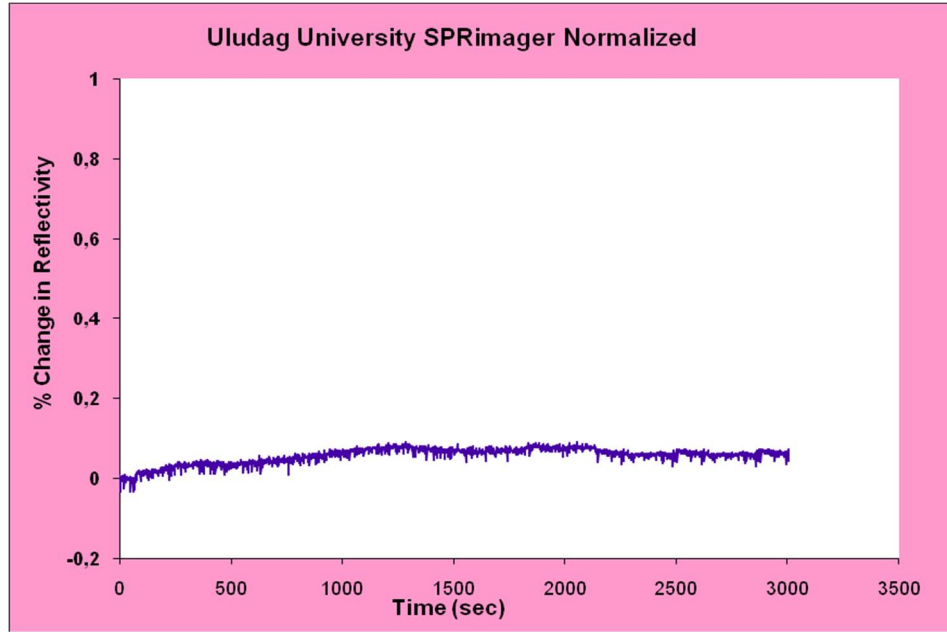


(a) Ürik asit (10 mg/L),

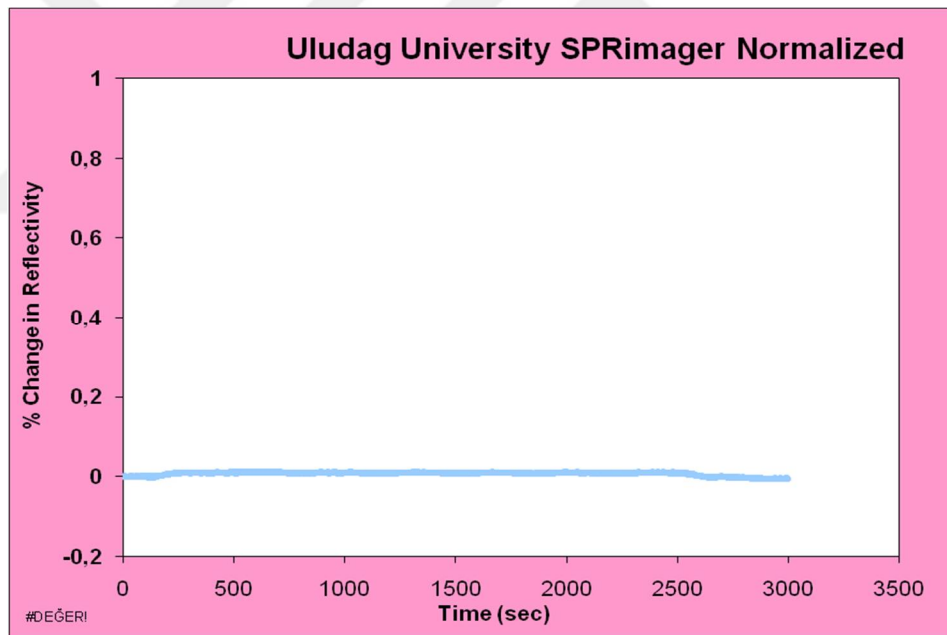


(b) Askorbik asit (10 mg/L),

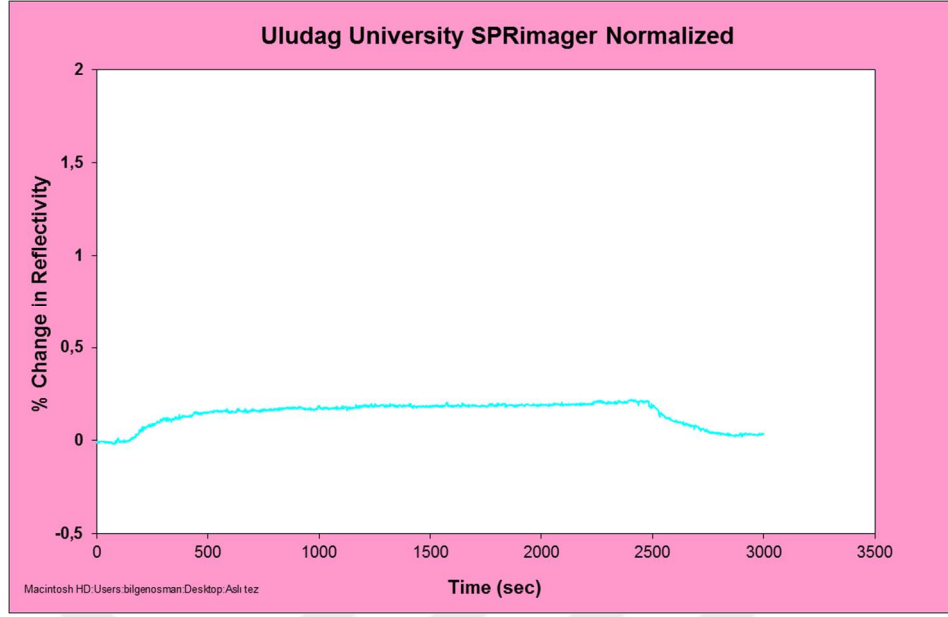




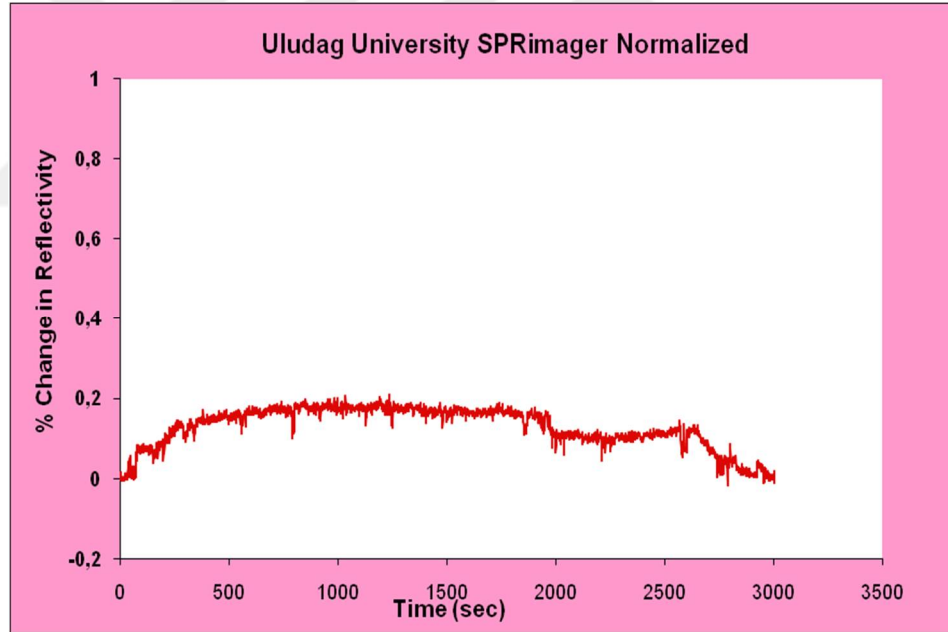
(c) Teofilin (10 mg/L),



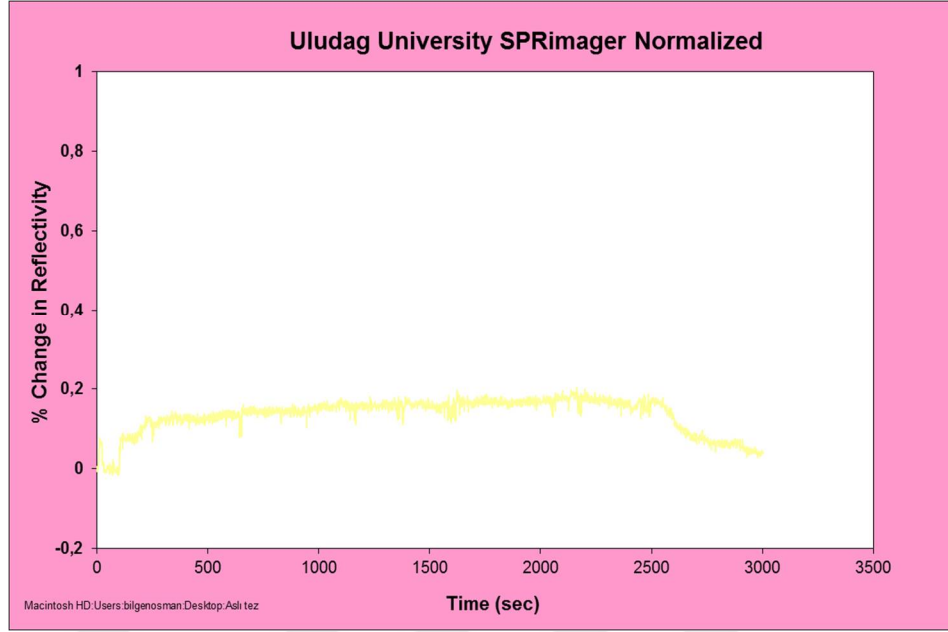
(d) Üre (100 mg/L),



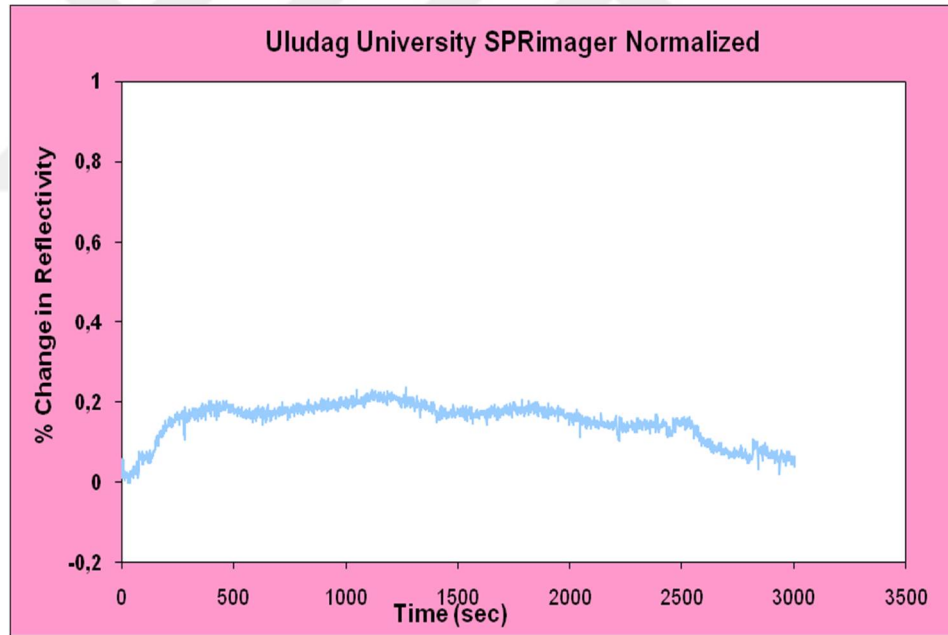
(e) Ürik asit-Askorbik asit,



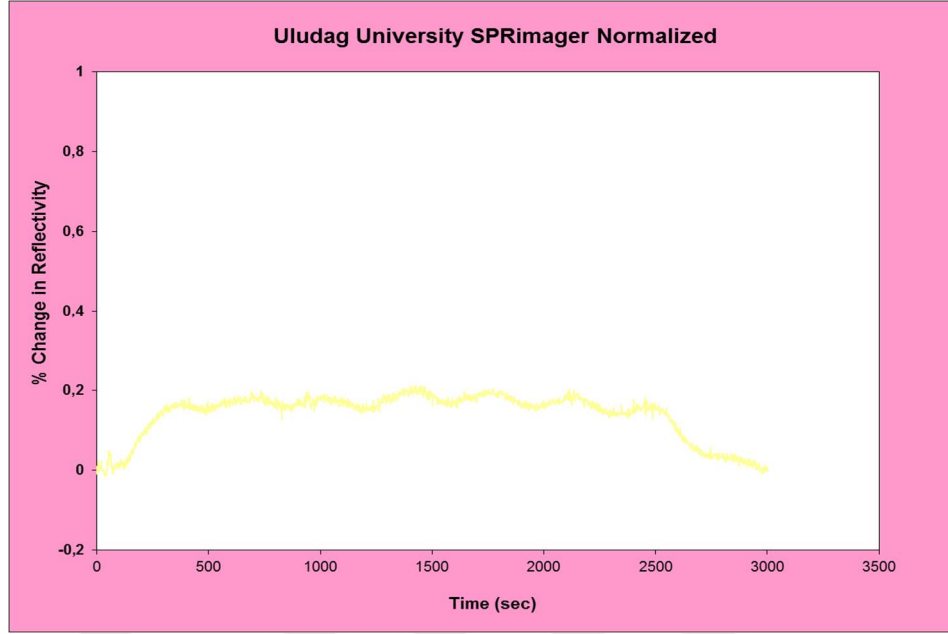
(f) Ürik asit-Teofilin,



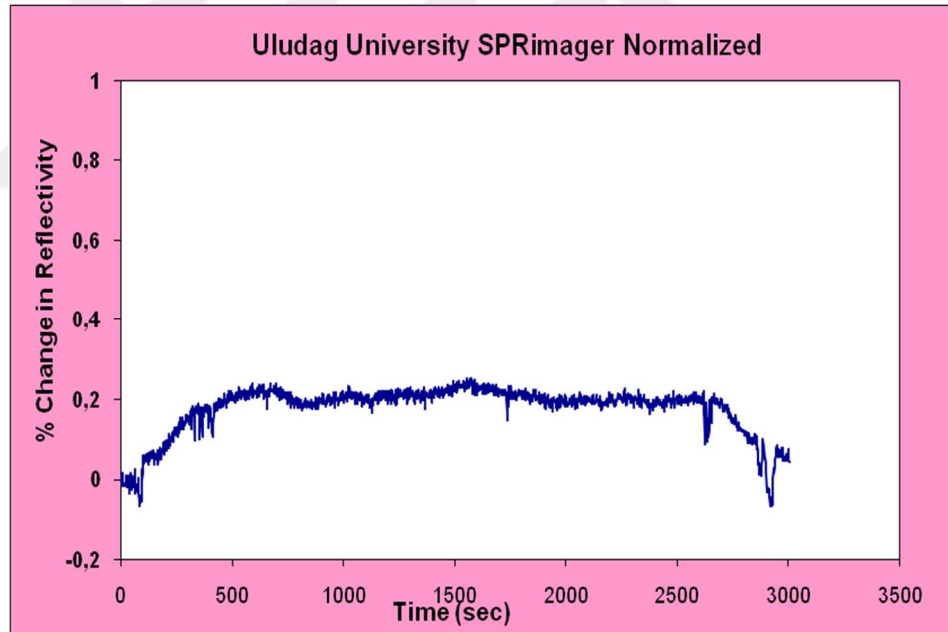
(g) Ürik asit-Üre,



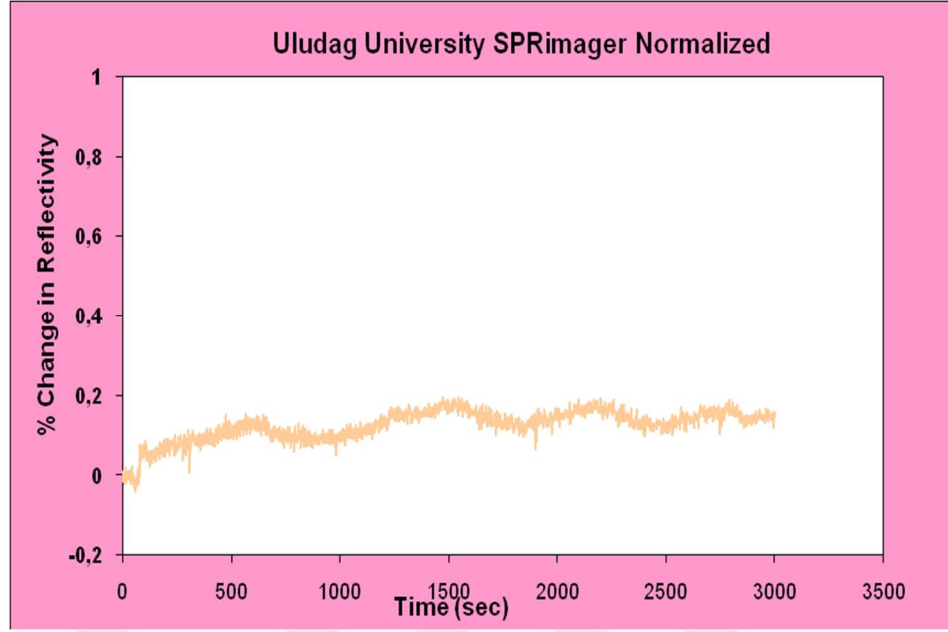
(h) Ürik asit-Askorbik asit-Teofilin,



(i) Ürik asit-Askorbik asit-Üre,

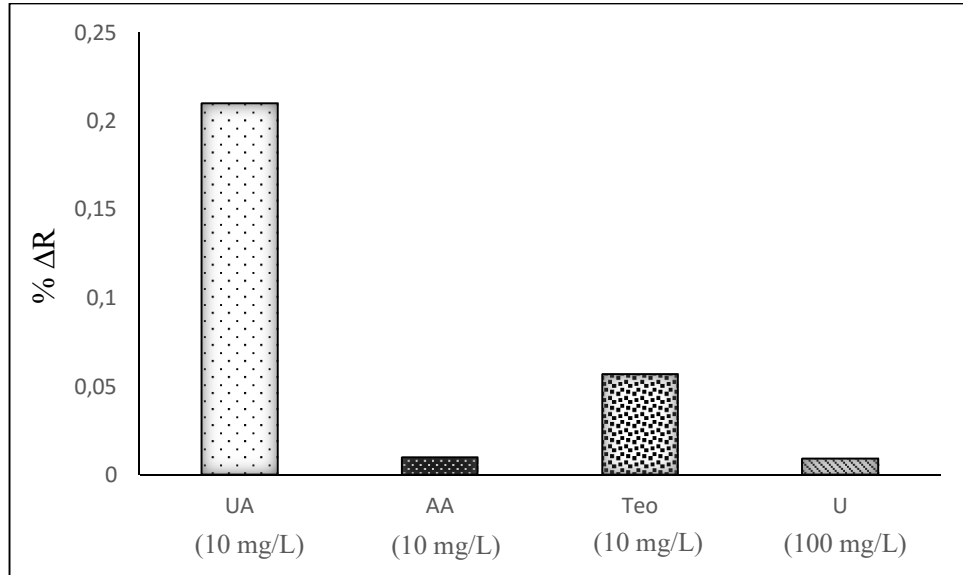


(i) Ürik asit-Teofilin-Üre,

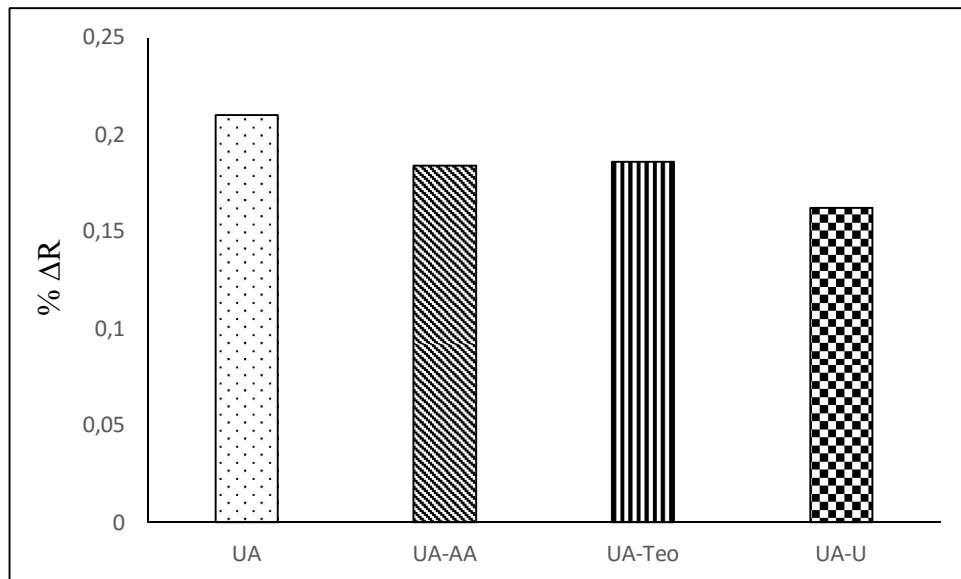


(j) Ürik asit- Askorbik asit-Teofilin-Üre

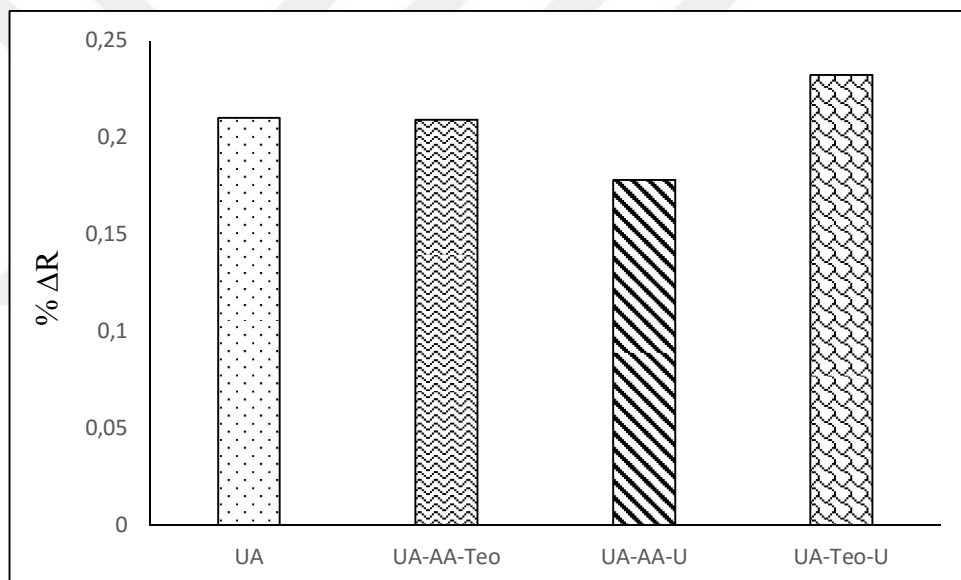
**Şekil 4.8.1** Ürik asit, askorbik asit, teofilin ve üre kullanılmasıyla oluşturulan çözeltiler ile UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar: **(a)** Ürik asit (10 mg/L), **(b)** Askorbik asit (10 mg/L), **(c)** Teofilin (10 mg/L), **(d)** Üre (100 mg/L), **(e)** Ürik asit-Askorbik asit, **(f)** Ürik asit-Teofilin, **(g)** Ürik asit-Üre, **(h)** Ürik asit-Askorbik asit-Teofilin, **(i)** Ürik asit-Askorbik asit-Üre, **(j)** Ürik asit-Teofilin-Üre.



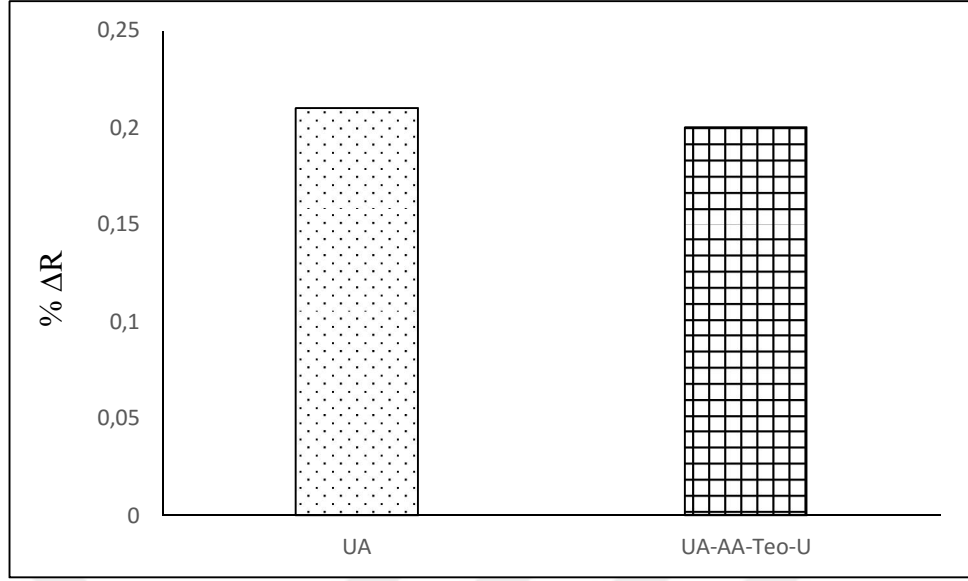
(a)



(b)



(c)

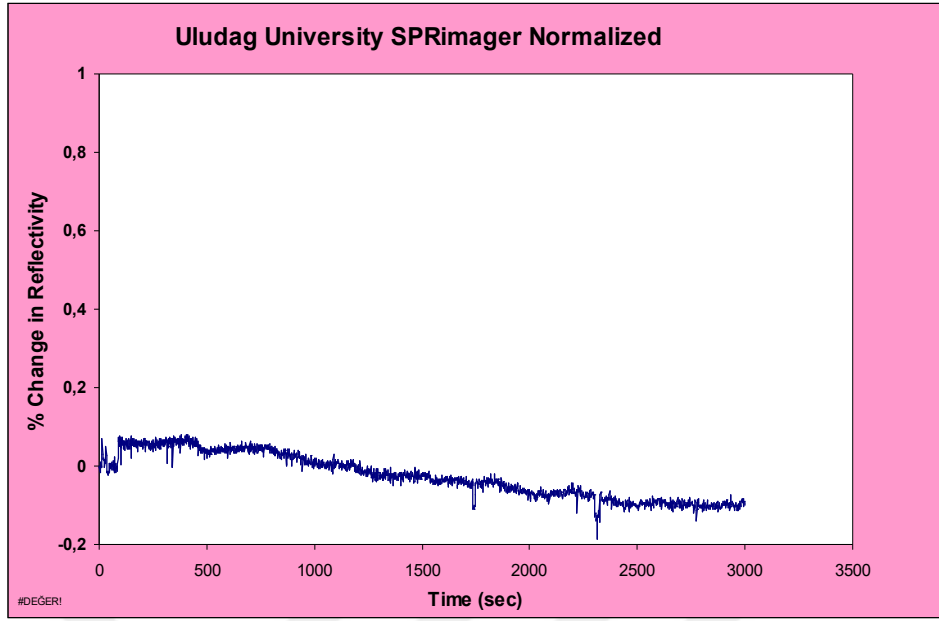


(d)

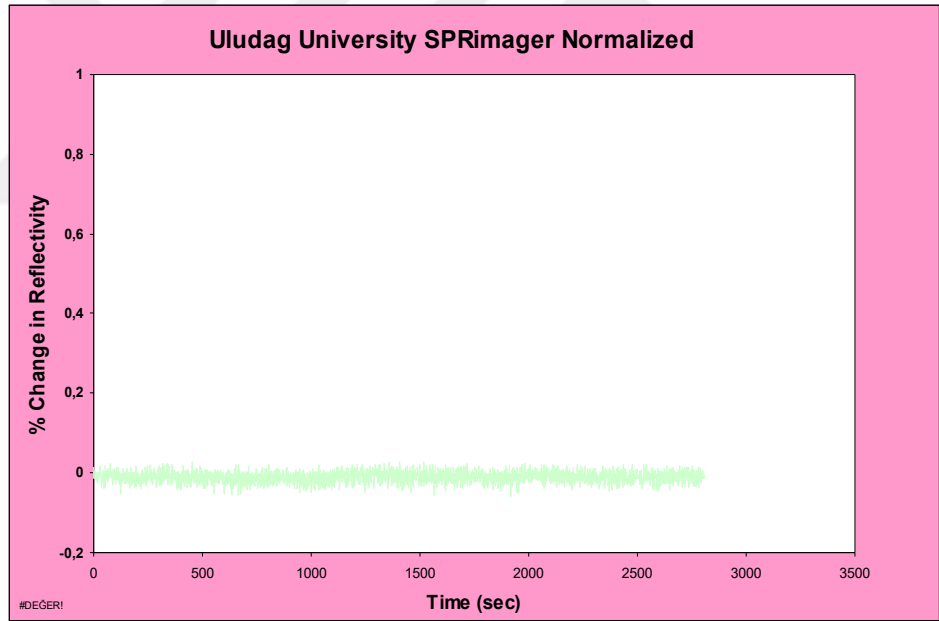
**Şekil 4.8.2** Ürik asit, askorbik asit, teofilin ve üre kullanılmasıyla hazırlanan çözeltiler ile UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensör arasındaki etkileşimler ile elde edilen sensör cevabı (a) tekli, (b) ikili, (c) üçlü ve (d) dördü karışımlar.

#### 4.9. SPR sensörün baskılama seçiciliğinin belirlenmesi

UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensörün seçiciliğini göstermek için ürik asit baskılanmamış (NIP) poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensör hazırlandı. Ürik asit (10 mg/L), askorbik asit (10 mg/L), üre (10 mg/L) ve teofilin (10 mg/L) çözeltileri ve 10 mg/L derişimindeki ürik asit, askorbik asit, teofilin ve üre çözeltilerinin kullanılmasıyla oluşturulan karışımlar (ikili, üçlü, dördü) SPR sensör sistemine gönderilerek sensorgramlar alındı ve sensörün baskılama seçiciliği belirlendi. Baskılanmamış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensörün bu karışımlar için oluşturduğu sensör cevabı, Şekil 4.9.1'de % ΔR/zaman fonksiyonu olarak verilmiştir.

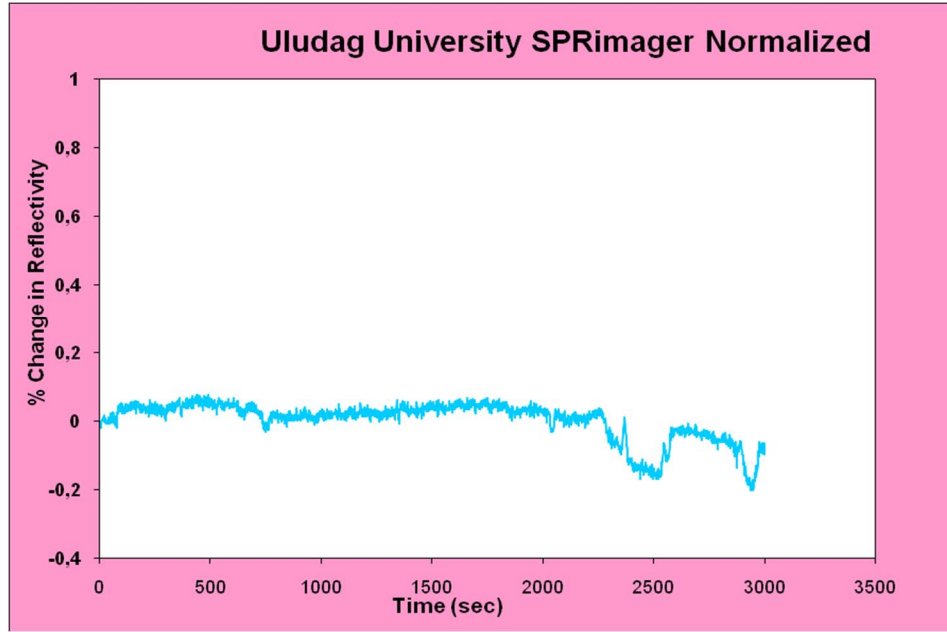


(a) Ürik asit (10 mg/L),

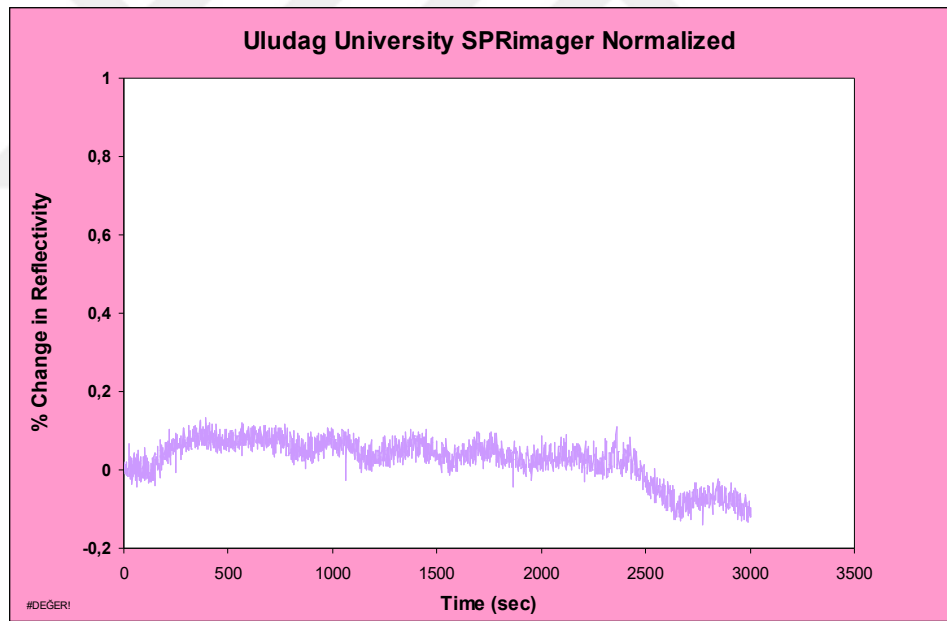


(b) Askorbik asit (10 mg/L),

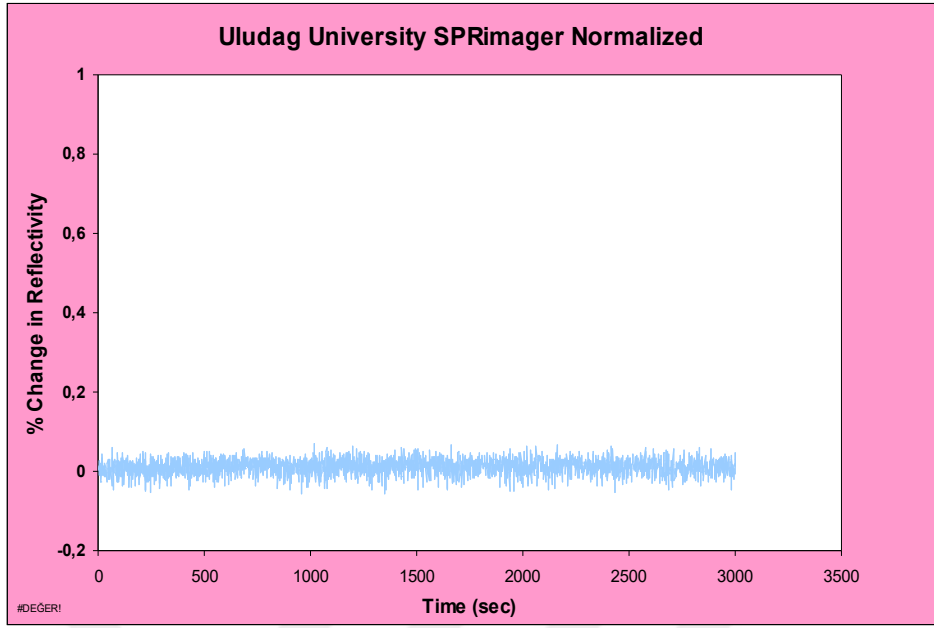




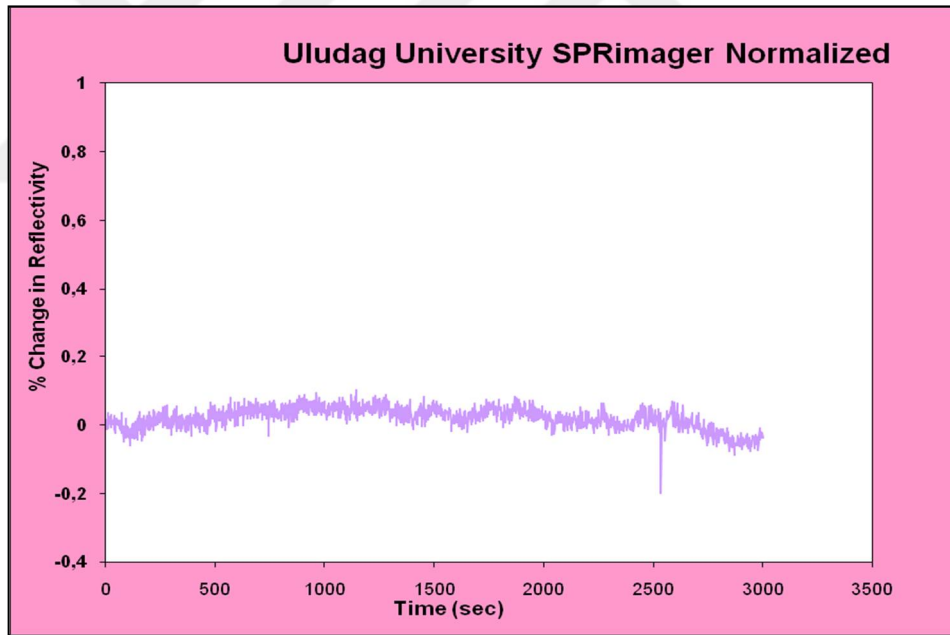
(c) Teofilin (10 mg/L),



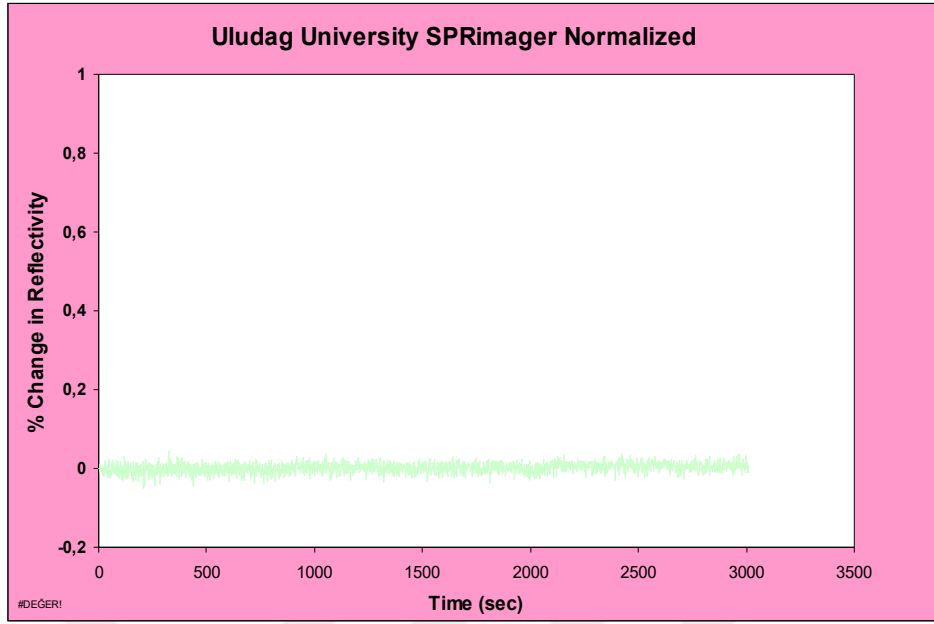
(d) Üre (10 mg/L),



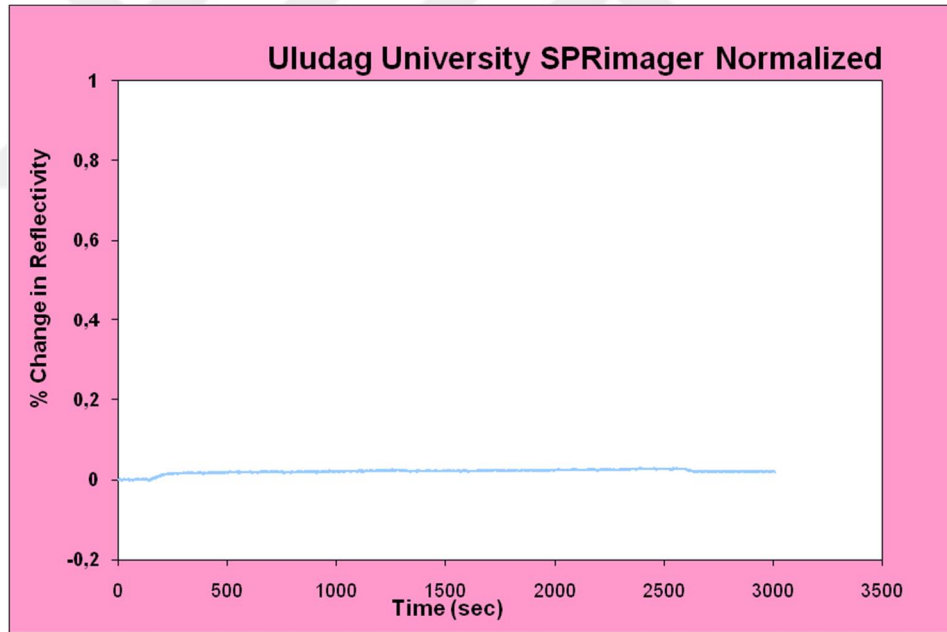
(e) Ürik asit-Askorbik asit,



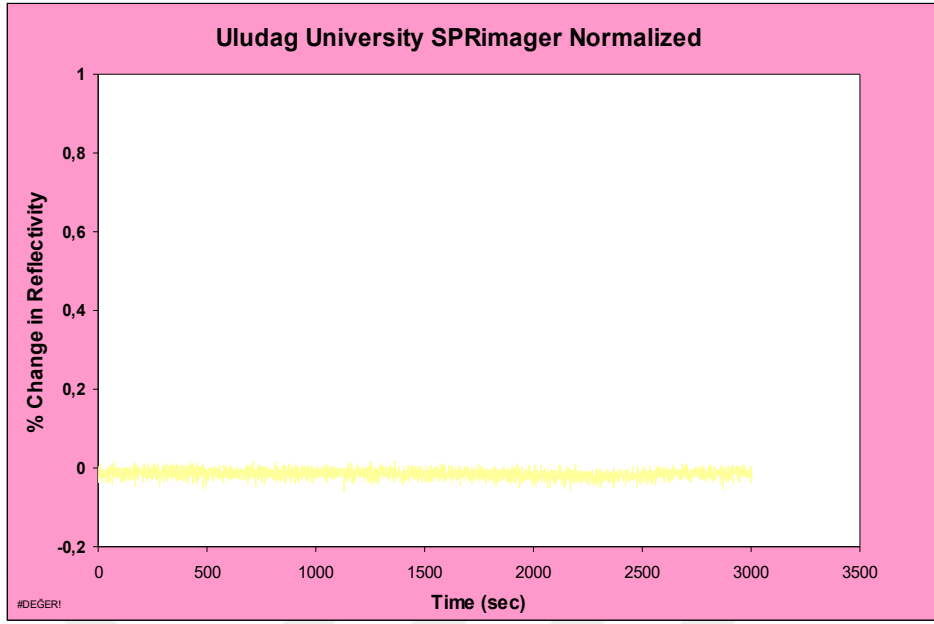
(f) Ürik asit-Teofilin,



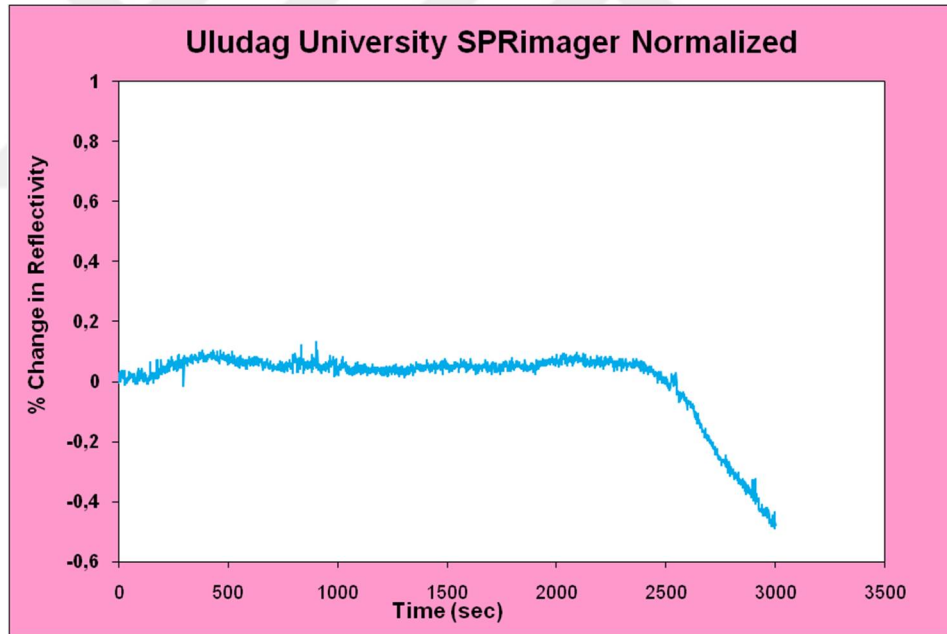
(g) Ürik asit-Üre,



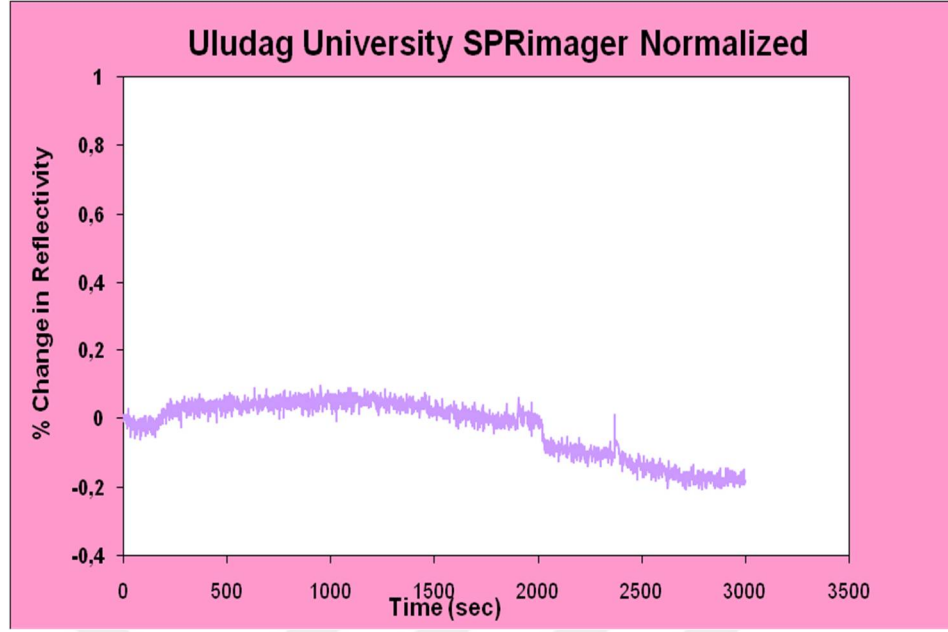
(h) Ürik asit-Askorbik asit-Teofilin,



(i) Ürik asit-Askorbik asit-Üre,

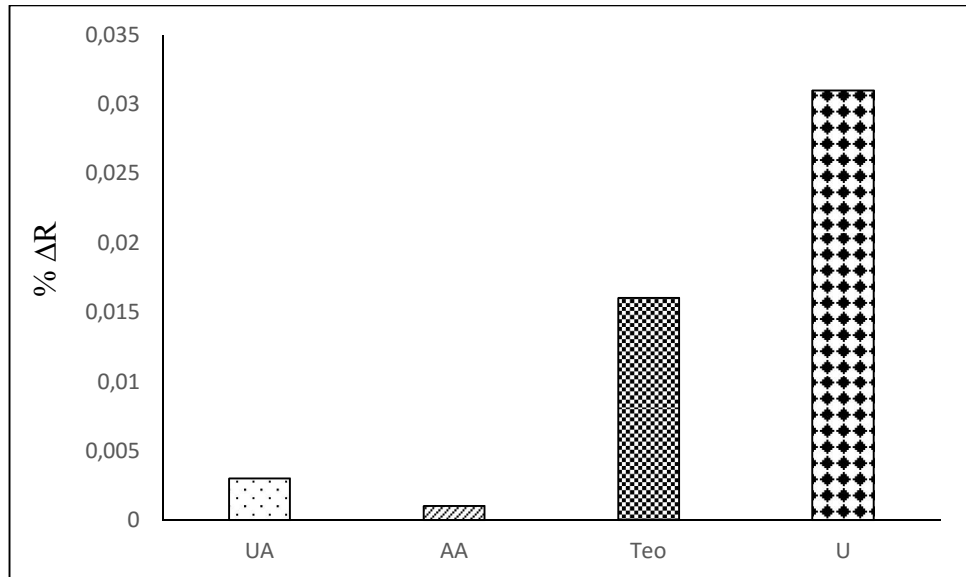


(i) Ürik asit-Teofilin-Üre,

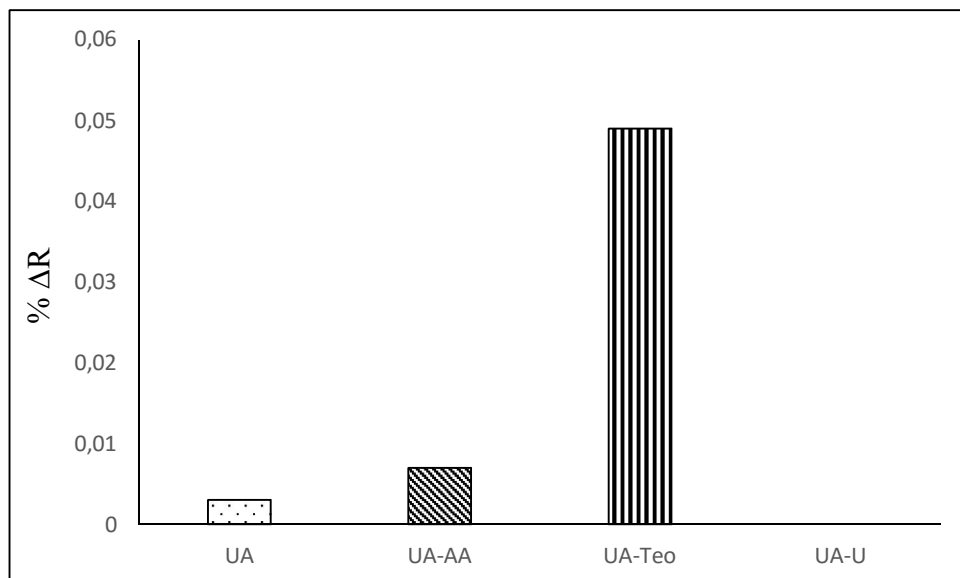


(j) Ürik asit–Askorbik asit–Teofilin–Üre.

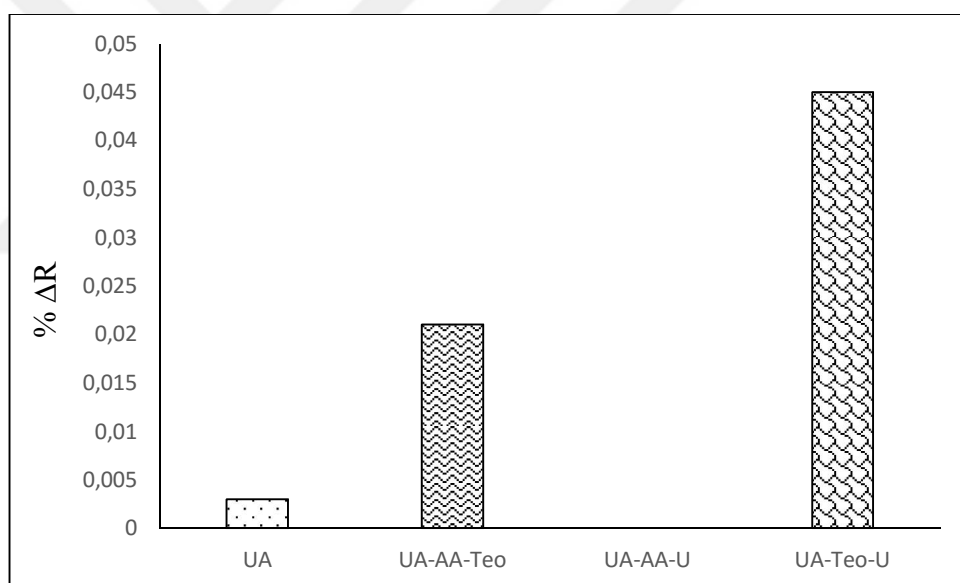
**Şekil 4.9.1** Ürik asit, askorbik asit, teofilin ve üre kullanılmasıyla oluşturulan çözeltiler ile baskılanmamış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartikül kaplı SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar: **(a)** Ürik asit (10 mg/L), **(b)** Askorbik asit (10 mg/L), **(c)** Teofilin (10 mg/L), **(d)** Üre (10 mg/L), **(e)** Ürik asit–Askorbik asit, **(f)** Ürik asit–Teofilin, **(g)** Ürik asit–Üre, **(h)** Ürik asit–Askorbik asit–Teofilin, **(i)** Ürik asit–Askorbik asit–Üre, **(j)** Ürik asit–Teofilin–Üre.



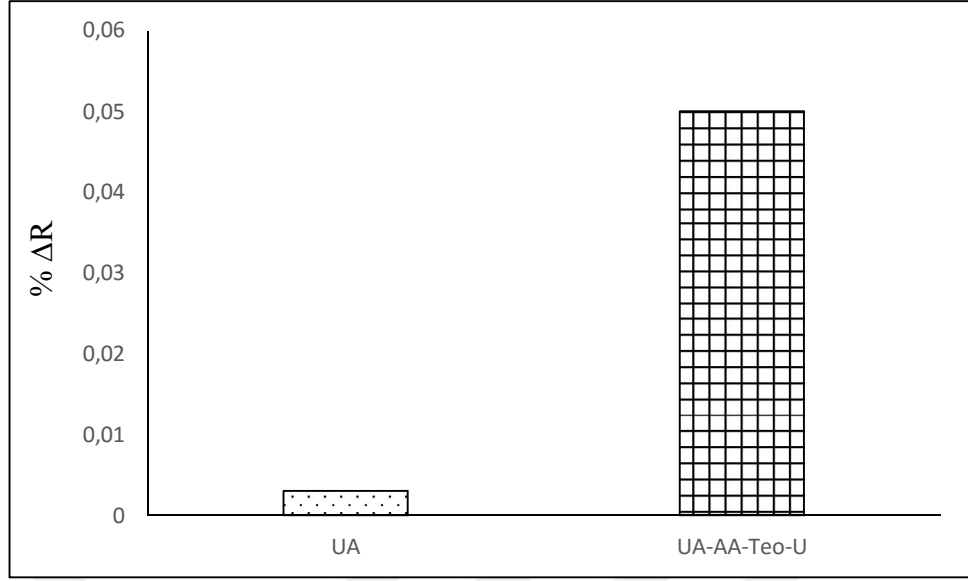
(a)



(b)



(c)



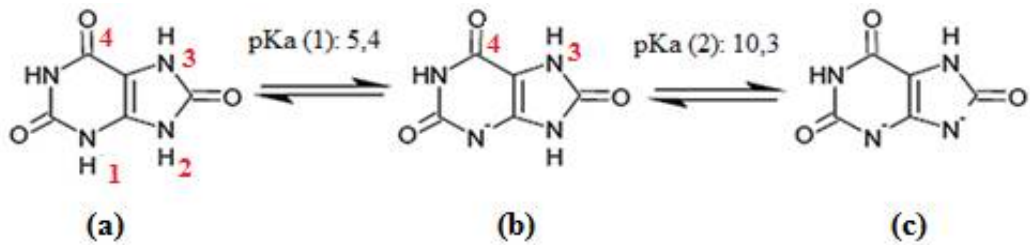
(d)

**Şekil 4.9.2** Ürik asit, askorbik asit, teofilin ve üre kullanılmasıyla oluşturulan çözeltiler ile UA baskılanmamış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait (a) tekli, (b) ikili, (c) üçlü ve (d) dördü grafikler.

Şekil 4.9.1 ve Şekil 4.9.2 incelendiğinde; UA baskılanmamış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensörün askorbik asit ( $\Delta R_{AA} = 0,001$ ) ve teofilin ( $\Delta R_{Teo} = 0,016$ ) ile herhangi bir etkileşime girmediği ve anlamlı bir sinyal vermediği belirlenmiştir. Üre (10 mg/L) için alınan sinyal değerlerinin ( $\Delta R_{üre} = 0,031$ ) ise ürik asit için alınan sinyal değerlerinden ( $\Delta R_{UA} = 0,003$ ) yüksek olduğu belirlenmiştir. İkili ve üçlü karışımlarda da yine tekli karışımlarda olduğu gibi herhangi bir sinyal duyarlılığı gözlenmemiştir. Eşitlik 4.8.2 ve 4.8.3 kullanılarak hesaplanan seçicilik katsayıları Çizelge 4.9.1’de özetlenmiştir. UA baskılanmış ve baskılanmamış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensörler karşılaştırıldığında; baskılanmamış sensörde ürik asit sinyal duyarlılığının düştüğü görülmektedir ( $\Delta R_{MIP} = 0,201$ ;  $\Delta R_{NIP} = 0,03$ ). Bu durum hazırlanan sensörün ürik aside özgü bağlanma bölgeleri içerdiğini kanıtlamaktadır. UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensör seçicilik katsayıları askorbik asit, teofilin ve üre için sırasıyla 21,0; 3,68 ve 23,33 olarak belirlenmiştir. Baskılama seçiciliğini gösteren bağıl seçicilik katsayısı ise 6,288 (ürik asit/askorbik asit), 20,44 (ürik asit/teofilin) ve 243,02 (ürik asit/üre) olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar UA baskılanmış SPR sensör için, ürik asiti askorbik asite göre 6,288 kat, teofiline göre 20,44 kat ve üreye göre 243,02 kat seçicilikle tanıdığını göstermektedir. Bağıl seçicilik katsayısı, 1’in ne kadar üzerinde ise baskılama işleminin

o kadar etkin olduğu bilinmektedir (Zhang ve ark. 2002). Yarışmacı moleküllerin seçiminde kimyasal yapı, boyut, girişim etkisi ve analiz edilecek gerçek örnekteki bulunma miktarı gibi özellikler büyük önem taşımaktadır. Kimyasal yapı benzerliğinden dolayı seçilen teofilin için elde edilen 20,44 kat seçicilik moleküler baskılama işleminin etkin bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. Bağlanma bölgeleri kimyasal bilgi ve üç boyutlu yapı olarak ürik aside özgüdür. İdrar, serum ve tükürük gibi insan sıvılarında ürik asit ve askorbik asit birlikte bulunmakta ve ürik asit derişiminin belirlenmesinde girişime neden olmaktadır. Bu nedenle ürik asit derişiminin askorbik asit varlığında seçici bir şekilde belirlenmesi oldukça önemlidir. Elde edilen sonuçlara göre UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensörün ürik asite olan seçiciliği askorbik asite göre 6,28 kat daha fazladır. Bu durumda hazırlanan sensörle UA derişimini doğru bir şekilde belirlemek mümkündür. UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensörün ürik asite olan seçiciliği üreye göre 243,02 kat gibi yüksek bir değerdedir. İdrarda üre miktarı oldukça fazladır (9,3 g/L). Sensörün üre için düşük bir sinyal değerine sahip olması idrarda ürik asit tayininin yapılabilmesi açısından büyük bir avantajdır. Elde edilen sonuçlar hazırlanan UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensörün seçiciliğinin oldukça iyi olduğunu göstermektedir.

Hazırlanan sensörün seçiciliği fonksiyonel monomer MAC, Fe<sup>3+</sup> ve UA arasındaki metal-şelat etkileşiminden kaynaklanmaktadır. Ayrıca komonomer HEMA varlığı spesifik olmayan bağlanma bölgelerinin oluşumunu engelleyerek seçiciliğe katkı sağlamaktadır. Bağlanma bölgelerinin oluşumunda Fe<sup>3+</sup> iyonu fonksiyonel monomer MAC ve kalıp molekül UA ile koordinasyon bağı oluşturmaktadır.

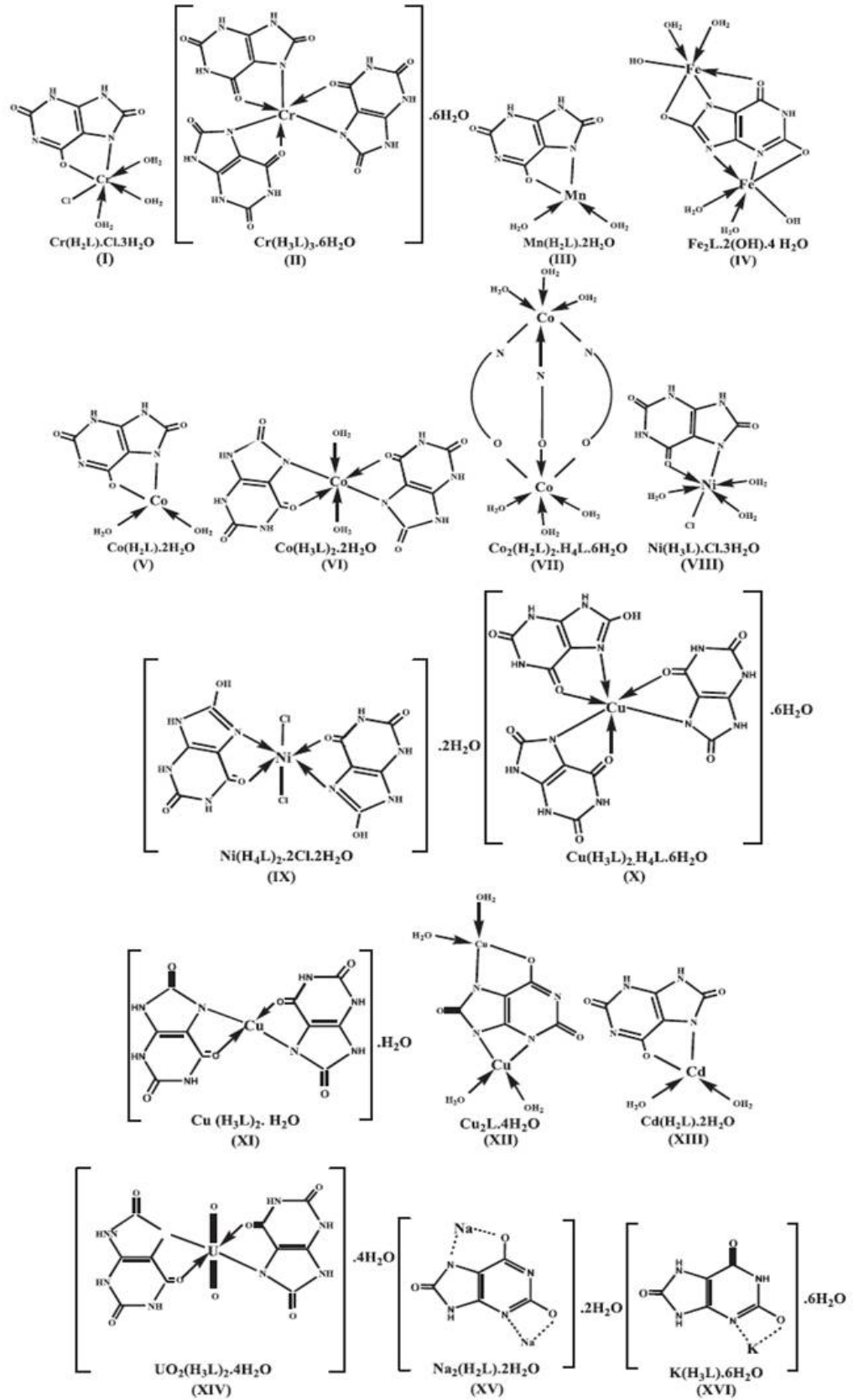


**Şekil 4.9.3.** Ürik asidin iyonlaşma reaksiyonu.

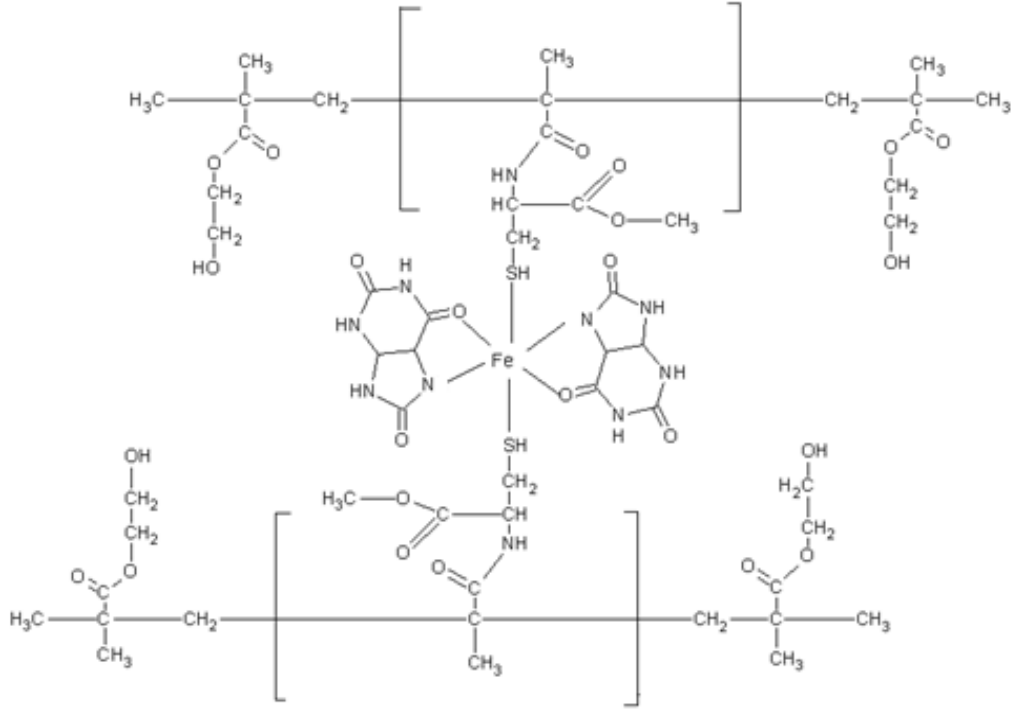
pH 4’de ürik asidin iyonlaşma reaksiyonunda (a) ile gösterilen UA yapısında (1) ve (2) numaralı N atomlarındaki H’ler sulu çözeltiliye verilmez. Ancak pH 8’de (1) ile gösterilen



N atomuna bağlı  $H^+$  ayrılır. (2) numaralı  $H^+$  halen sulu çözeltiliye salınmamıştır. pH 8 civarında reaksiyonda b formunda (3) ile gösterilen N atomu üzerindeki  $H^+$  (4) ile gösterilen C atomu ve (3) ile gösterilen N atomunun  $Fe^{3+}$  iyonuna iki dişli ligant olarak bağlanabilmesi için ayrılır. Bu sayede  $Fe^{3+}$  iyonu ve UA arasında kararlı bir kompleks oluştuğu düşünölmektedir. Masoud ve arkadaşları tarafından 2012 yılında yapılan bir çalışmada bazı metallerin (Cr, Mn; Fe, Co, Ni, Cu, Cd,  $UO_2$ , Na ve K) UA ile oluşturduğu kompleksler incelenmiş ve UA'in (4) numaralı karbonil ve (3) numaralı N ucu ile iki dişli ligand olarak metal iyonlarına bağlandığı rapor edilmiştir (Şekil 4.9.4). Yapıların önerilmesinde kompleks bileşiklerin UV spektrumları, manyetik moment değerleri ve infrared spektrumları kullanılmıştır. Literatürden elde edilen bulgular ve yapılan deneylerin ışığında nanopartiköl yapısında UA,  $Fe^{3+}$  ve MAC arasındaki etkileşimin aşağıda gösterildiği gibi olduğu düşünölmektedir (Şekil 4.9.5).

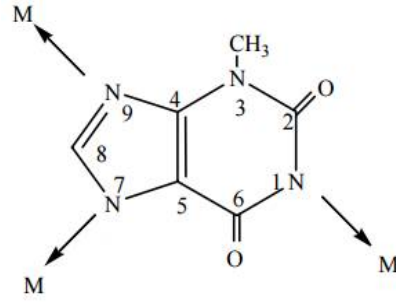


Şekil 4.9.4. Sentezlenen komplekslerin yapıları.



**Şekil 4.9.5.** MAC, Fe<sup>3+</sup> ve UA arasındaki etkileşim.

Poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartikül yüzeyinde hazırlanan bağlanma bölgeleri UA molekülüne özgüdür. Bu nedenle askorbik asit ya da üre molekülünün UA kadar spesifik bir etkileşime girmesi mümkün değildir. Üre genellikle tek dişli ligand olarak oksijen atomu üzerinden C=O ... M şeklinde koordinasyon bağı yapmaktadır. Nadiren de N, O uçları ile çift dişli ligand olarak davranabilmektedir. Ancak tüm metal-şelat etkileşimlerinde olduğu gibi ortamın pH'ı sıcaklığı, metal/şelat oranı ve metalin özellikleri büyük önem taşımaktadır (O'Shea ve Mancy 1978). Bu moleküller bağlanma bölgelerine ancak zayıf moleküller arası etkileşimler ile bağlanabilir. Teofilin ise kimyasal yapı olarak UA'e benzerlik göstermektedir. Yalnızca metil gruplarının varlığı ve beş üyeli heterohalkada karbonil grubunun olmayışı ile ürik asitten farklılaşmaktadır. Shaker ve Farina (2009) ve Barzami ve arkadaşları (2000) tarafından yapılan çalışmalarda teofilin metal-şelat (Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Cd(II), Ca(II), Mg(II) ve Mn(II)) etkileşimlerinin N<sub>9</sub>, N<sub>1</sub> ya da N<sub>7</sub>'deki azot atomu üzerinden gerçekleştiği rapor edilmiştir. Şekil 4.9.6'da teofilin metal ile olası etkileşimi gösterilmiştir.



**Şekil 4.9.6.** Teofilinin metal ile olası etkileşimi

Hem UA baskılanmış hem de baskılanmamış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensör ile elde edilen seçicilik değerlerine bakıldığında ( $\Delta R_{MIP} = 0,057$ ;  $\Delta R_{NIP} = 0,016$ ) önemli derecede bir sensör cevabının oluşmadığı görülmektedir. Hazırlanan sensör ürik aside 20,44 kat daha seçicidir. Bu durum bağlanma bölgelerinde kimyasal bilgi yanında, üç boyutlu yapının da önemli olduğunu göstermektedir.

**Çizelge 4.9.1.** Yarışmacı biyomoleküller için seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları.

Biyomolekül	MIP		NIP		k'
	$\Delta R$	k	$\Delta R$	k	
Ürik asit	0,210	-	0,003	-	
Askorbik asit	0,010	21,0	0,001	3	6,288
Teofilin	0,057	3,68	0,016	0,18	20,44
Üre	0,009	23,33	0,031	0,096	243,02

Bu çalışmada elde edilen seçicilik katsayıları daha önceki çalışmalarda elde edilen değerlere göre oldukça yüksektir. Bu sonuç, metal-şelat etkileşimi ile çok daha seçici tanıma bölgelerinin oluşturulabileceğini göstermektedir.

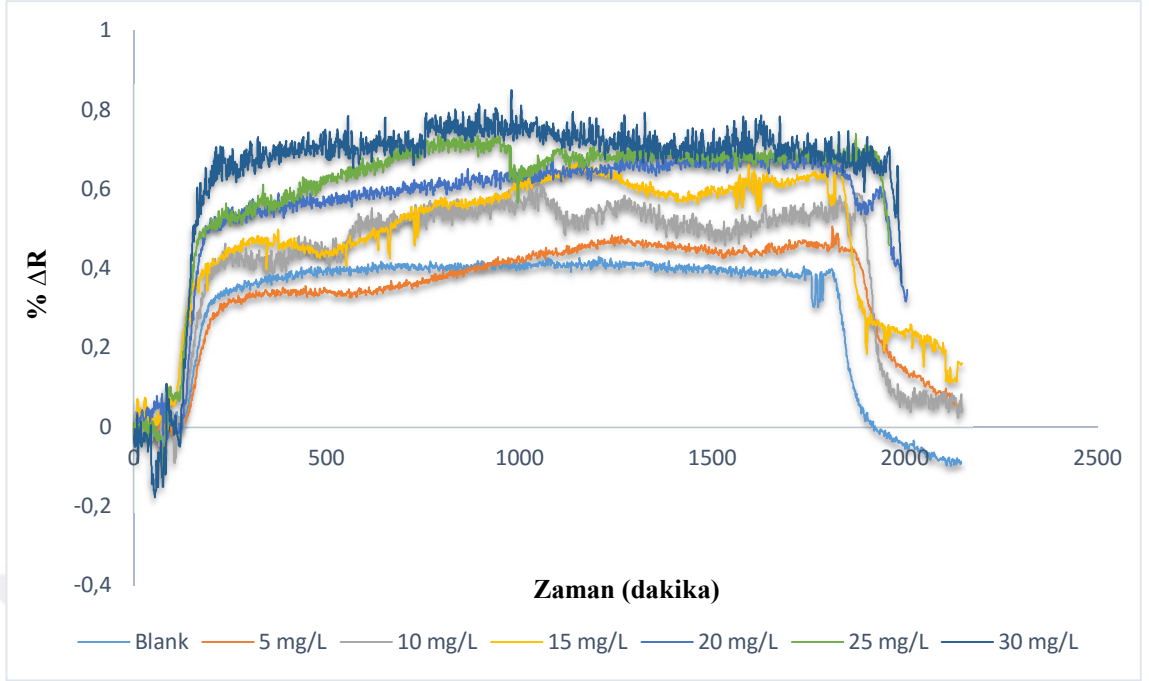
Ürik asit baskılanmış poli(N,N-bis(4-aminofenil)-N',N'-difenil-1,4-fenilendiamin 3,3',4,4'-benzo-fenontetra karboksilik dianhidrit) [poli(PD-BC)] sentezlenerek ürik asit tayini için sensör denemeleri yapılmıştır. Ürik asit baskılanmış polimerin 0,04 mM askorbik asit varlığında 0,4 mM ürik asit için gösterdiği seçicilik 28,76 olarak bulunurken baskılanmamış polimerin seçiciliği verilmemiştir (Chen ve ark. 2010).

Chen ve arkadaşları (2010) tarafından yapılan bir başka çalışmada ürik asit baskılanmış poli(metakrilik asit) [poli(PMAA)] polimerizasyonu sonucu sentezlenen çok-duvarlı karbon nanotüpler (MWCNTs) sensör sisteminde kullanılmıştır. Baskılanmış ve baskılanmamış poli(PMAA) kıyaslandığı zaman baskılama seçiciliğinin 4,41 olduğu bulunmuştur. Seçicilik çalışmaları için 0,04 mM askorbik asit kullanılmıştır. Askorbik asit ile aynı ortamda bulunan ürik asit oksidasyon potansiyellerinin birbirine yakın olması sebebiyle ürik asit tayininde problemler ile karşılaşmıştır.

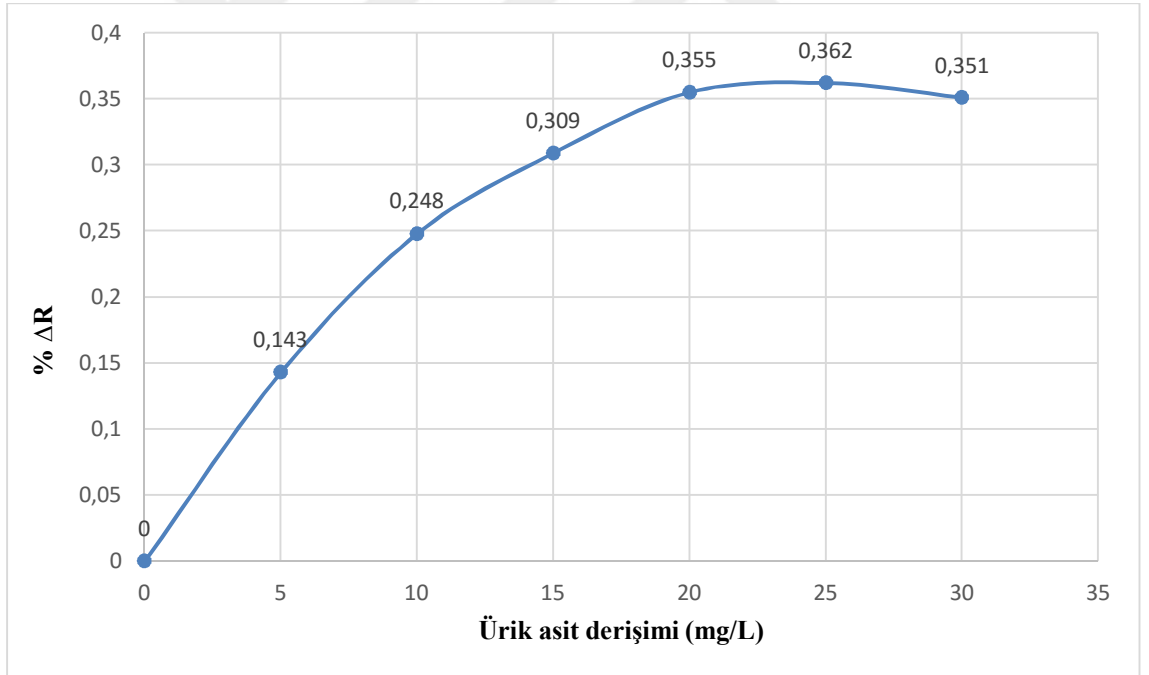
İnsan kan ve idrarında ürik asit tayini için geliştirilen elektrokimyasal sensörde ürik asit baskılanmış poli(melamin-ko-kloranil) sentezlenmiş ve sol-jel kaplı grafit elektrodta kullanılmıştır. Sol-jel modifiye edilmiş baskılanmış polimer kaplı grafit elektrodun seçiciliğinin belirlenmesi için askorbik asit, teofilin ve üre molekülleri kullanılmıştır. 41,66 µg/mL ürik asit + 41,66 µg/mL askorbik asit için sensör cevabı  $41,93 \pm 0,95$  µg/mL, 45,45 µg/mL ürik asit + 454,54 µg/mL askorbik asit için sensör cevabı  $44,20 \pm 0,09$  µg/mL olarak bulunmuştur. 41,66 µg/mL ürik asit + 41,66 µg/mL teofilin için sensör cevabı  $41,72 \pm 1,44$  olarak bulunurken, 45,45 µg/mL ürik asit + 454,5 µg/mL teofilin için sensör cevabı  $45,36 \pm 1,84$  olarak bulunmuştur. Aynı deneme üre için de yapılmış ve 41,66 µg/mL ürik asit + 41,66 µg/mL<sup>1</sup> üre için sensör cevabı  $41,22 \pm 0,53$  olarak bulunurken, 45,45 µg/mL ürik asit + 454,54 µg/mL üre için sensör cevabı  $45,22 \pm 0,561$  olarak bulunmuştur (Patel ve ark. 2009).

#### 4.10. İdrar örneği ile kinetik analizler

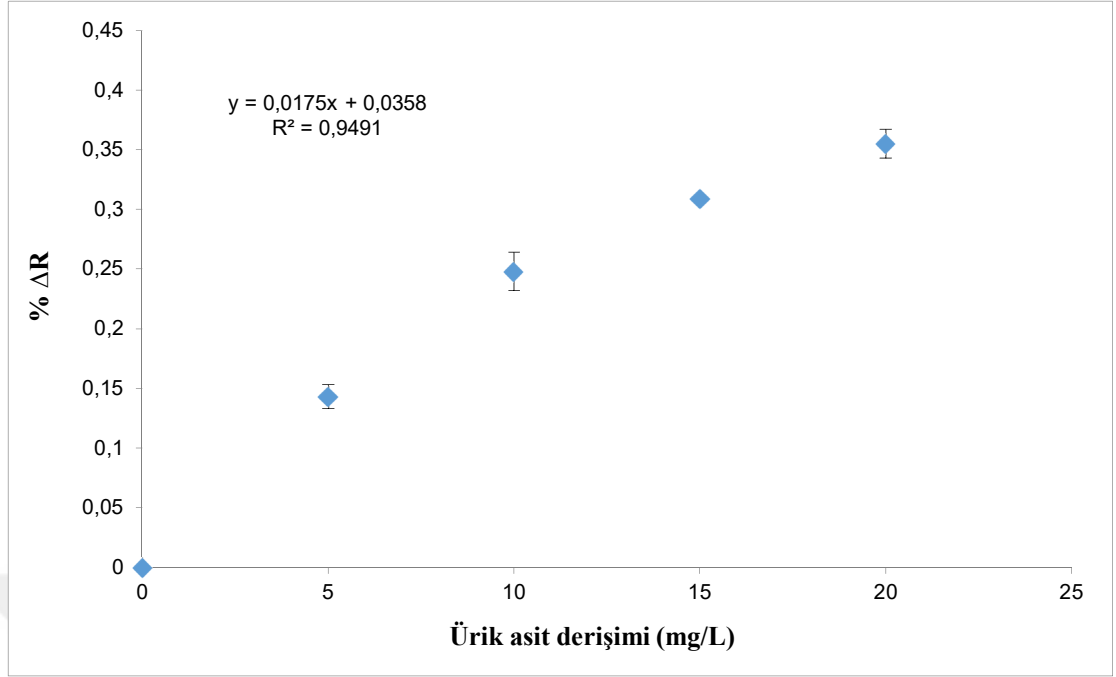
Hazırlanan UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensörün idrarda ürik asit tayinindeki etkinliği araştırıldı. İdrar örneğindeki toplam seyrelme miktarı 1:20 olacak şekilde önce kör örnek, ardından da aynı seyrelme oranında, UA derişimi 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 mg/L olan çözeltiler hazırlandı (pH 8). Hazırlanan bu çözeltiler UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> sensör yüzeyine gönderilerek %  $\Delta R$ /zaman değişiminden oluşan sensorgramlar alındı (Şekil 4.10.1 (a)). Elde edilen sensorgram, ürik asit derişimi arttıkça %  $\Delta R$  değişiminin de arttığı açıkça göstermektedir. Analiz 15 dakikada gerçekleşmektedir.



(a)



(b)



(c)

**Şekil 4.10.1.** (a) Kör örnek ve 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 mg/L derişiminde UA spike edilmiş ve 1/20 oranında seyreltilmiş idrar örneklerinin UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensör ile etkileştirilmesi ile elde edilen sensorgram, (b) Farklı derişimlerde UA spike edilen idrar örneği için elde edilen derişim-sinyal grafiği, (c) Farklı derişimlerde UA spike edilen idrar örneği için elde edilen kalibrasyon grafiği.

Şekil 4.10.1 (a) ve (b)'de UA derişimi ile % ΔR değerleri arasındaki ilişki gösterilmiştir. Görüldüğü gibi UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensör 1/20 oranında seyreltilmiş idrar örneğine 5-20 mg/L derişim aralığında UA spike edildiğinde derişim-sinyal doğrusallığı gösterirken, 20-30 mg/L arasında doyunluğa ulaşmaktadır (Şekil 4.10.1 (b)). Doğrusal aralıktaki veriler değerlendirildiğinde  $y = 0,0175x + 0,0358$  doğru denklemi elde edildi. Korelasyon katsayısı 0,9491 olarak hesaplandı (Şekil 4.10.1 (c)). Bu verilerden yararlanarak 1/20 oranında seyreltilmiş idrar örneğinde UA derişimi 2,04 mg/L, seyreltme yapılmamış başlangıç idrar örneğindeki UA derişimi ise 40,91 mg/L olarak belirlendi. Sensör cevabına neden olan en düşük derişim olan 5 mg/L için elde edilen % ΔR değerlerine ait olan standart sapma değeri ( $s = 0,00290$ ) kullanılarak LOD değeri 0,498 mg/L, LOQ değeri ise 1,66 mg/L olarak hesaplanmıştır. Aynı idrar örneği için, örnekteki UA derişimi enzimatik yöntem (COBAS INTEGRA Uric Acid ver.2 (UA2), Rotkreuz, İsviçre) ile tayin edildi ve UA derişimi 40 mg/L olarak belirlendi. Elde

edilen sonuçlara göre hazırlanan UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensör idrar örneği içerisindeki UA derişimini enzimatik yöntem ile karşılaştırıldığında % 97,73 doğrulukla tayin edebilmektedir. Elde edilen sonuçlar poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensörün hem sulu çözeltide hem de idrar gibi gerçek örnekte UA tayininde başarılı bir şekilde kullanılabilirdiğini göstermiştir.

Sağlıklı bir insanın 24 saatlik idrarında ortalama 250-750 mg (1,48-4,43 mmol) ürik asit bulunmaktadır (Tietz 1995). İdrarda bulunan ürik asit miktarı normal değerin altında ya da üstünde olması durumunda gut, Lesch-Nyhan sendromu, hiperürisemi, hipertansiyon gibi hastalıklara neden olur. Bu tür hastalıkların teşhisinde hastalardan genellikle 24 saatlik idrar (ortalama 1,5 L) ya da sabah ilk idrarı toplanarak miktar belirlenir. Bu duruma göre 24 saatlik idrarda 13-67 mg/dL (130-670 mg/L) (Krieg ve ark 1986), sabah ilk idrarda ise 37-92 mg/dL (370-920 mg/L) (Colombo 1994) aralığında olmalıdır. Bu durumun üstüne çıkılması hastalık belirtisi olarak kabul edilir. Bu çalışmada hazırlanan SPR sensörün LOD (0,498 mg/L) ve LOQ (1,66 mg/L) değerleri hastalık durumunda idrarda UA tayinini mümkün kılmaktadır.

Patel ve arkadaşları (2009) tarafından yapılan çalışmada ürik asit baskılanmış sol-jel ince film grafit elektrod için 14,56-177,42 mg/L ürik asit derişim aralığındaki sulu çözeltide LOD değeri 4,10 mg/L olarak bulunmuştur. İdrar örneğinde bulunan 7,81-148,42 mg/L derişim aralığındaki UA için LOD değeri 3,71 mg/L olarak bulunmuştur.

Ürik asit baskılanmış karboksil ile fonksiyonlandırılmış çok duvarlı karbon nanotüpler (MWCNTs), insan idrar örneklerinde ürik asit derişiminin tayininde kullanılmıştır. 200 kat seyreltilmiş (pH 7,0 PBS) ve 1,0 µmol/L ürik asit spike edilmiş üç farklı idrar örneği için ürik asit tayini yapılmıştır. 0,86 µmol/L ürik asit belirlenen birinci örneğe ürik asit spike edildikten sonra bulunan miktar 1,80 µmol/L (0,302 mg/L), 1,12 µmol/L ürik asit belirlenen ikinci örneğe ürik asit spike edildikten sonra bulunan miktar 2,16 µmol/L (0,362 mg/L) ve 1,48 µmol/L ürik asit belirlenen üçüncü örneğe ürik asit spike edildikten sonra bulunan miktar 2,53 µmol/L (0,425 mg/L) olarak hesaplanmıştır (Peng 2013). Bu çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar literatürde az sayıda olan ürik asit sensör çalışmalarında elde edilen tayin limitleri ile karşılaştırılabilecek düzeydedir.

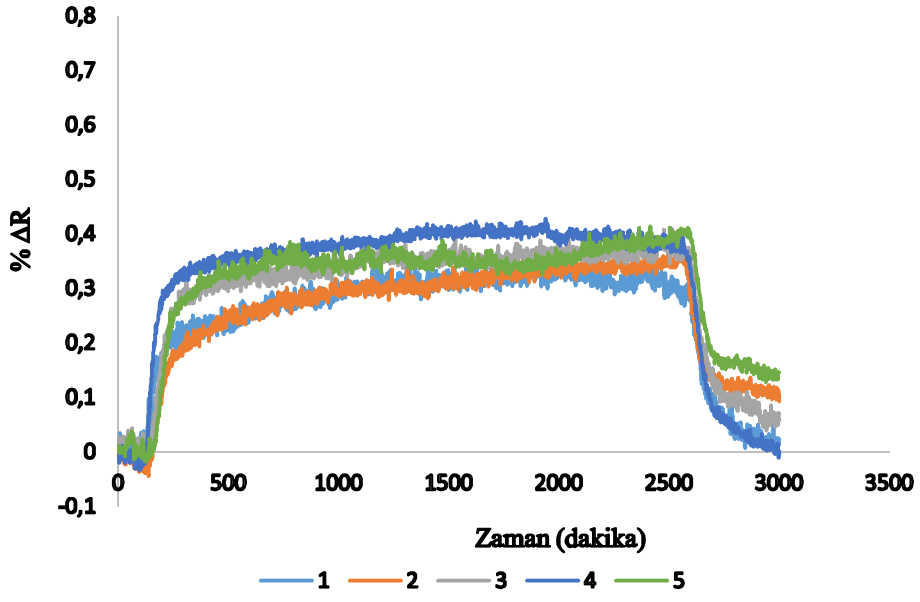


**Çizelge 4.10.1.** İdrarda UA tayini için kullanılan bazı yöntemler ve tayin sınırları.

<b>Kullanılan yöntem</b>	<b>Tayin sınırı</b>	<b>Referans</b>
Anodik voltametrik biyosensör	$3 \times 10^{-6}$ mol/L (0,504 mg/L)	Strochkova ve ark. 1997
Ters faz-HPLC	0,21 $\mu$ g/mL (0,21 mg/L)	Yue-dong 1998
Mikroçip kapiler elektroforez- amperometrik biyosensör	35,6 mM (5984 mg/L)	Fanguy ve Henry 2002
Ürat oksidaz-peroksidaz enzim sistemli amperometrik biyosensör	0,1 $\mu$ M (0,017 mg/L)	Akyılmaz ve ark 2003
HPLC	0,11 $\mu$ g/mL (0,11 mg/L)	George ve ark. 2006
Kapiler bölge (zone) elektroforezi	3,8 mg/L	<u>Muñoz</u> ve ark. 2010

#### 4.11. Tekrar kullanım

UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensörün tekrar kullanılabilirliği UA spike edilmiş idrar örneği kullanılarak araştırıldı. İdrar örneğindeki toplam seyrelme miktarı 1:20 olacak şekilde önce kör örnek ve aynı seyrelme oranında 35 mg/L UA spike edilmiş idrar örneği hazırlandı. SPR sistemi kör örnek ile dengeye getirildikten sonra ilk önce denge tamponu, daha sonra 35 mg/L UA içeren idrar çözeltisi, ardından denge tamponu geçirildi ve daha sonra desorpsiyon işlemi gerçekleştirildi. Desorpsiyon işlemi için pH: 4 çözeltisi kullanıldı. Bu işlem ard arda 5 defa tekrarlandı ve %  $\Delta R$ /zaman değişiminden oluşan sensorgramlar alındı (Şekil 4.11.1). Rejenerasyon işlemi sonunda poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensör bağlanma bölgelerinde herhangi bir bozulma olmaksızın tekrar tekrar kullanılabilir. 35 mg/L UA spike edilmiş idrar örneği için elde edilen %  $\Delta R$  değeri 0,365'dir. Standart sapma değeri  $\pm 0,017$  olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.11.1. 35 mg/L UA spike edilen idrar örneği ile UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensörün tekrar kullanımına ait sensorgram.

## 5. SONUÇ

Bu çalışmada, moleküler baskılama tekniği kullanılarak ürik asit (UA) tanıma bölgelerine sahip poli(EGDMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartiküller sentezlenmiştir. Moleküler baskılamanın ön kompleksleşme aşamasında metal-şelat yaklaşımı kullanılmıştır. Çalışmada fonksiyonel monomer olarak MAC, metal iyonu olarak Fe<sup>3+</sup> iyonları kullanılmıştır. UA baskılanmış poli(EGDMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartiküller SPR altın çip yüzeyine kaplanarak ürik asit sensörü hazırlanmış ve SPR sensörün ürik asit tayinindeki etkinliği araştırılmıştır. Çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- İlk olarak fonksiyonel monomer metakriloil-amido-sistein metil ester (MAC), L-sistein metil esterin metakriloil klorür ile reaksiyonu sonucu elde edildi. Elde edilen MAC monomeri NMR ve FTIR çalışmaları ile karakterize edildi.
- Ön-kompleksin hazırlanmasında MAC/Fe<sup>3+</sup>/UA mol oranı 2/1/2 olarak kullanıldı. Hazırlanan MAC-Fe<sup>3+</sup>-UA ön-kompleksinin karakterizasyonu için FTIR tekniği kullanıldı. İlk olarak MAC-Fe<sup>3+</sup> kompleksi hazırlanarak FTIR spektrumu alındı. MAC-Fe<sup>3+</sup> kompleksinde Fe-S bağının oluşmasıyla 2562 cm<sup>-1</sup> ve 956 cm<sup>-1</sup>'de gözlenen S-H eğilme ve bükülme absorpsiyon bandlarının kaybolması fonksiyonel monomer MAC'ın Fe<sup>3+</sup> iyonları ile etkileştiğine dair bir kanıt olarak kabul edildi. Ardından MAC, UA ve MAC-Fe<sup>3+</sup>-UA kompleksinin FTIR spektrumları karşılaştırıldı. MAC-Fe<sup>3+</sup>-UA kompleksinin FTIR spektrumunda MAC monomerinin yapısına ait ester karbonil grubuna ait (C=O) absorpsiyon bandının varlığı, S-H titreşim ve eğilmesine ait absorpsiyon bandlarının bulunmaması, ayrıca UA FTIR spektrumunda 3000-2600 cm<sup>-1</sup> civarında gözlenen spesifik dört absorpsiyon bandının varlığı MAC-Fe<sup>3+</sup>-UA ön kompleks oluşumunu destekledi.
- MAC-Fe<sup>3+</sup>-UA ön-kompleksi kullanılarak UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartiküller emülsiyon polimerizasyonu tekniği ile sentezlendi. Karakterizasyon için ilk olarak FTIR tekniğinden yararlanıldı. Ardından hazırlanan poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartiküllerin elementel analizi yapıldı. Nanopartiküllerin % 46,7242 C, % 1,415 N, % 0,0637 S içerdiği belirlendi. Poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartikül yapısında N ve S atomlarının varlığı fonksiyonel monomer MAC 'ın başarıyla nanopartikül yapısına dahil edildiğine

dair bir kanıt oldu. Aynı zamanda nanopartiküllerin element kompozisyonu EDS ile analiz edildi. Poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartiküllerin elementel bileşimde Fe varlığı Fe<sup>3+</sup> iyonlarında poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> yapısına başarıyla dahil edildiğini gösterdi.

- Poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartikülleri yüksek çözünürlüklü taramalı elektron mikroskobu (FE-SEM) ve yüksek çözünürlüklü kontrastlı geçirimli elektron mikroskobu (CTEM) kullanılarak görüntülendi. Elde edilen görüntülere göre nanopartiküllerin küresel formda, oldukça küçük olduğu belirlendi. Poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartiküllerin çapları 50 nm ile 100 nm aralığındadır.
- UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartiküllerin sulu çözeltideki boyut dağılımını belirlemek için zeta boyut dağılımı analizi yapıldı ve ortalama nanopartikül çapı 117,8 nm, polidispersite indeksi ise 0,223 olarak belirlendi. Polidispersite indeksinin 0,25'in altında olması, partikül boyutunun monodisperse yakın dar bir aralıkta dağılım gösterdiğini kanıtladı.
- Sentezlenen ve karakterize edilen UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartiküller SPR altın çip yüzeyine damlatma metodu ile kaplanarak UA baskılanmış SPR sensör hazırlandı. Hazırlanan SPR sensörün karakterizasyonu için temas açısı, AFM ve optik profilometre tekniklerinden yararlanıldı. Temas açısı analizleri SPR altın çip, allil merkaptan ile modifiye edilmiş altın çip ve UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensör yüzeyi için gerçekleştirildi. UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartiküllerin SPR sensör yüzeyine kaplanmasıyla yüzeyin su ile yaptığı temas açısının düştüğü gözlemlendi. Ayrıca her bir yüzey için yüzey serbest enerjisi (SFE) hesaplanarak yüzeyin poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartiküller ile kaplandığı kanıtlandı.
- SPR altın çip yüzeyinin UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> nanopartiküller ile kaplandığını göstermek için allil merkaptan ile modifiye edilmiş altın çip ve UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR altın çip yüzeyi atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ile karakterize edildi. Her iki yüzeyin AFM ile analizi sonucu belirlenen derinlik değerleri ve yüzey görüntüleri incelendiğinde nanopartiküllerin modifiye yüzeye homojen ve tek tabakaya yakın bir şekilde kaplandığı görüldü. UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensör

yüzeyindeki kaplama kalınlığını belirlemek için optik profilometre cihazı ile yüzey görüntüleri alındı ve ortalama kaplama kalınlığı  $293,7 \pm 7,1$  nm olarak belirlendi. Bu kalınlık değeri SPR sensör ile bağlanma olayının sensorgram ile izlenmesi için uygundur.

- UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensörün etkinliğinin araştırılması için UA derişimi ile SPR sinyali arasındaki ilişki incelendi. UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensör, 0,5-40 mg/L derişim aralığında derişim-sinyal doğrusallığı gösterdi. Hazırlanan sensörün sulu çözeltideki tayin sınırı (LOD) 0,247 mg/L, tayin limiti (LOQ) ise 0,825 mg/L olarak belirlendi. UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensör ile UA arasındaki etkileşimi belirlemek amacıyla elde edilen SPR sensör cevaplarının Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich izoterm modellerine uygunluğu araştırıldı.
- Hazırlanan UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensörün ürik aside olan seçiciliğinin belirlenmesi için yarışmalı adsorpsiyon deneyleri yapıldı. Yarışmacı molekül olarak askorbik asit, teofilin ve üre kullanıldı. UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensörün baskılama seçiciliğini göstermek için ürik asit baskılanmamış (NIP) poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensör hazırlandı ve aynı kinetik analizler yapıldı.
- UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensör için seçicilik katsayıları askorbik asit, teofilin ve üre için sırasıyla 21,0; 3,68 ve 23,33 olarak belirlendi. Baskılama seçiciliğini gösteren bağıl seçicilik katsayısı ise 6,288 (ürik asit/askorbik asit), 20,44 (ürik asit/teofilin) ve 243,02 (ürik asit/üre) olarak hesaplandı. Elde edilen seçicilik değerleri daha önce yapılan çalışmalara göre oldukça yüksektir.
- Son olarak UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensörün idrarda ürik asit tayinindeki etkinliği araştırıldı. 1/20 oranında seyreltilmiş idrar örneğinde UA derişimi 2,04 mg/L, seyreltme yapılmamış başlangıç idrar örneğindeki UA derişimi ise 40,91 mg/L olarak belirlendi. Aynı idrar örneği için, örnekteki UA derişimi enzimatik yöntem ile tayin edildi ve UA derişimi 40 mg/L olarak belirlendi. Hazırlanan SPR sensörün idrardaki ürik asidi % 97,73 doğrulukla tayin edebildiği belirlendi. İdrar örneği için SPR sensörün LOD değeri 0,498 mg/L, LOQ değeri ise 1,66 mg/L olarak hesaplandı.

- UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensörün tekrar kullanılabilirliği araştırıldı. Rejenerasyon, pH 4.0 'te gerçekleştirildi. Hazırlanan sensör yüzeyinin kolayca rejenere edilebildiği ve 5 kez rejenerasyon sonrasında idrar örneği için tekrar edilebilen %  $\Delta R$  değerinin elde edildiği tespit edildi.

Sonuç olarak, ürik asit tayini için moleküler baskılanma tekniği kullanılarak nanopartikül temelli SPR sensör başarıyla hazırlanmıştır. Seçiciliğin artırılmasında metal-şelat yaklaşımı kullanılmıştır. Hazırlanan UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensör, hem sulu çözeltide hem de idrarda UA derişimini yüksek bir doğrulukla tayin edebilmektedir. Analiz süresi 15 dakikadır. Ayrıca hazırlanan UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)-Fe<sup>3+</sup> SPR sensör yüzeyi kolayca rejenere edilerek tekrar tekrar kullanılabilir.

## KAYNAKLAR

**Abhilash, M. 2010.** Potential applications of nanoparticles. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 1(1):1-12.

**Adams, R.N., 1976.** Probing brain chemistry with electroanalytical techniques. *Anal. Chem.*, 48(14):1126A-1138A.

**Akyılmaz, E., Sezgintürk, M.K., Dinçkaya, E. 2003.** A biosensor based on urate oxidase–peroxidase coupled enzyme system for uric acid determination in urine . *Talanta*, 61(2):73-79.

**Alcock, S.J. and Turner, A.P.F. 1994.** Continuous analyte monitoring to aid clinical practice. *IEEE Engineering in Medicine and Biology*, 319-325.

**Alderman, M., Aiyer, K.J., 2004.** Uric acid: role in cardiovascular disease and effects of losartan. *Curr Med Res Opin.* 20(3):369-79.

**Andersson, L.I., 1996.** Development of aqueous buffer and organic solvent based radioligand binding assays for (S)-propranolol, *Analytical Chemistry*, 68:111–117.

**Andersson, L.I., Miyabayashi, A., O'Shannessy, D.J., Mosbach, K., 1990.** Enantiomeric resolution of amino acid derivatives on molecularly imprinted polymers as monitored by potentiometric measurements, *Journal of Chromatography*, 516:323-331.

**Andersson, L.I., Müller, R., Vlatakis, G., Mosbach, K., 1995.** Mimics of the binding sites of opioid receptors obtained by molecular imprinting of enkephalin and morphine, *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, 92:4788–4792.

**Andersson, L.I., O'Shannessy, D.J., Mosbach, K., 1990.** Molecular recognition in synthetic polymers. Preparation of chiral stationary phases by molecular imprinting of amino acid amides, *Journal of Chromatography*, 516:167–179.

**Ansell, R.J., Kriz, D., Mosbach, K., 1996.** Molecularly imprinted polymers for bioanalysis: chromatography, binding assays and biomimetic sensors, *Current Opinion in Biotechnology*, 7:89-94.

**Arnold, F. ve Haymore, B.L., 1991.** Engineered metal-binding proteins: Purification to protein folding. *Science*, 252:1796-1797.

**Arora, K., Sumana, G., Saxena, V., Gupta, R.K., Gupta, S.K., Yakhmi, J.V., Pandey, M.K., Chand, S., Malhotra, B.D., 2007.** Improved performance of polyaniline-uricase biosensor. *Anal. Chim. Acta.* 594:17–23.

**Arshady, R., Mosbach, K. 1981.** Synthesis of substrate-selective polymers by host-guest polymerization. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 182(2):687–692.

**Arya, S.K., Solanki, P.R., Singh, S.P, Kaneto, K., Pandey, M.K., Datta, M., Malhotra, B.D., 2007.** Poly-(3-hexylthiophene) self-assembled monolayer based cholesterol biosensor using surface plasmon resonance technique. *Biosensors and Bioelectronics*, 22:2516-2524.

**Athikomrattanukul, U., Katterle, M., Gajovic-Eichelmann, N., Scheller, F.W., 2009.** Development of molecularly imprinted polymers for the binding of nitrofurantoin, *Biosensors and Bioelectronics*, 25:82–87.

**Attention Theory Note 4**, Surface free energy-theory and calculations, Attention TN 4, 1-3, Derleme.

**Ayhan, A. 2004.** Yeni bir teknolojik çağın kapısı aralanırken: Nanoteknoloji. *İpek Yolu Dergisi*, Konya Ticaret Odası.

**Banerji, S., Peng, W., Kim, Y.C., Booksh, K.S. 2006.** In *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.* Boston, MA., 6380.

**Barzami, B., Shamloo, D.S., Farsam, H., Naderimanesh, H., Nafisi, S., 2000.** Elucidation of metal binding sites for Ca(II), Mg(II) and Mn(II) in nucleic acid bases using a novel spectrophotometric method, *Metal Ions in Biology and Medicine*, 6, 367-369.

**Basozabal, I., Guerreiro, A., Gomez-Caballero, A., Aranzazu Goicolea, M., Barrio. R.J., 2014.** Direct potentiometric quantification of histamine using solid-phase imprinted nanoparticles as recognition elements. *Biosens. Bioelectron.*, 58C:138–144.

**Beach, J.V. and Shea, K.J., 1994.** Designed catalysts. A synthetic network polymer that catalyzes the dehydrofluorination of 4-fluoro-4-(p-nitrophenyl) butan-2-one, *Journal of American Chemical Society*, 116:379–380.

**Biju, V.M., Gladis, J.M., Rao, T.P., 2003.** Effect of  $\gamma$ -irradiation of ion imprinted polymer (IIP) particles for the preconcentrative separation of dysprosium from other selected lanthanides. *Talanta*, 60:747–754.

**Blomgren, A., Berggren, C., Holmberg, A., Larsson, F., Sellergren, B., Ensing, K., 2002.** Extraction of clenbuterol from calf urine using a molecularly imprinted polymer followed by quantitation by high-performance liquid chromatography with UV detection, *Journal of Chromatography A*, 975:157–164.

**Borm, P.J.A., Kreyling, W. 2004.** Toxicological hazards of inhaled nanoparticles-potential implications for drug delivery. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 4(6):1-11.

**Byström, S.E., Börje, A., Åkermark, B., 1993.** Selective reduction of steroid 3- and 17-ketones using LiAlH<sub>4</sub> activated template polymers, *Journal of American Chemical Society*, 115:2081–2083.



**Cantin, S., Bouteau, M., Benhabib, F., Perrot, F. 2006.** Surface free energy evaluation of wellordered Langmuir Blodgett surfaces comparison of different approaches. *Colloid Surface A*, 276 (1-3):107-115.

**Carrara, S., Bhalla, V., Stagni, C., Benini, L., Ferretti, A., Valle, F., Gallotta, A., Ricco, B., Samori, B. 2009.** Label-free cancer markers detection by capacitance biochip. *Sensors and Actuators B:Chemical*, 136:163–172.

**Chang, L.M., Ding, Y., Li, X., 2013.** Surface molecular imprinting onto silver microspheres for surface enhanced Raman scattering applications. *Biosens. Bioelectron.*, 50:106–110.

**Chen, C.-Y. and Karube, I., 1992.** Biosensors and flow injection analysis, *Current Opinion in Biotechnology*, 3:31.

**Chen, G., Guan, Z., Chen, C.T., Fu, L., Sundaresan, V., Arnold, F.H., 1997.** Glucose sensing polymers, *Nature Biotechnology*, 15:354-557.

**Chen, P., Vittal, R., Nien, P.C., Liou, G.S., Ho, K.C. 2010.** A novel molecularly imprinted polymer thin film as biosensor for uric acid, *Talanta*, 80(3):1145-1151.

**Chen, P.Y., Ho, K.C. 2007.** Fabrication of molecularly imprinted uric acid biosensors based on a novel amine-imide type conducting polymer. *NSTI-Nanotech.* 2:477-480.

**Chen, P.Y., Nien, P.C., Hu, C.W., Ho, K.C. 2010.** Detection of uric acid based on multi-walled carbon nanotubes polymerized with a layer of molecularly imprinted PMAA. *Sensors and Actuators B*, 146: 466–471.

**Chen, P.Y., Vittal, R., Nien, P.C., Liou, G.S., Ho, K.C., 2010.** A novel molecularly imprinted polymer thin film as biosensor for uric acid, *Talanta*, 80 (3):1145–1151.

**Cheong, S.H., Rachkov, A., Park, J.K., Yano, K., Karube, I., 1998.** Synthesis and binding properties of a noncovalent molecularly imprinted testosterone-specific polymer, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 36:1725-1732.

**Chowdhury, S.R. and Yanful, E.K. 2010.** Arsenic and chromium removal by mixed magnetite-maghemite nanoparticles and the effect of phosphate on removal. *Journal of Environmental Management*, 91:2238-2247.

**Chuekachang, S., Janmanee, R., Baba, A., Phanichphant, S., Sriwichai, S., Shinbo, K., Kato, K., Kaneko, F., Fukunda, N., Ushijima, H., 2013.** Fabrication of thin film from conducting polymer/single wall carbon nanotube composites for the detection of uric acid. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 1:1-6.

**Clark, L.C., Lyons, C. 1962.** Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 102:29-45.

**Cristallini, C., Ciardelli, G., Barbani, N., Giusti, P. 2004.** Acrylonitrile-acrylic acid copolymer membrane imprinted with uric acid for clinical uses. *Macromolecular Bioscience*, 4:31–38.

**Çorman, M.E. 2010.** Moleküler baskılanmış nanopartiküllerin hazırlanması, karakterizasyonu ve lizozim saflaştırılmasında kullanılması. *Yüksek Lisans Tezi*, Adnan MÜ Kimya Anabilim Dalı, Aydın.

**D. Kriz, L.I. Andersson, M. Khayyami, B. Danielsson, P.-O. Larsson, K. Mosbach, 1995.** Preparation and characterization of composite polymers exhibiting both selective molecular recognition and electrical conductivity, *Biomimetics*, 3(2):81-90.

**Daghestani, H.N., Day, B.W. 2010.** Review; Theory and applications of surface plasmon resonance, resonant mirror, resonant waveguide grating, and dual polarization interferometry biosensors. *Sensors* 10:9630-9646.

**Damar Hüner, İ. ve Güleç, H.A. 2016.** Gıda endüstrisinde kullanılan polimerik yapıda ultrafiltrasyon membranlarının serbest yüzey enerjisi analizinde farklı yaklaşımların karşılaştırılması, *GIDA*, 41 (2):1-8.

**Daniel, S., Gladis, J.M., Rao, T.P., 2003.** Synthesis of imprinted polymer material with palladium ion nanopores and its analytical application. *Anal. Chim. Act.*, 488:173 182.

**Darain, F., Park, S.U., Shim, Y.B. 2003.** Disposable amperometric immunosensor system for rabbit IgG using a conducting polymer modified screen-printed electrode. *Biosens. Bioelectron.* 18:773-780.

**de Oliveira, E.P., Burini, R.C. 2012.** High plasma uric acid concentration: causes and consequences, *Diabetol. Metab. Syndr.* 4(12): 1-7.

**Della Volpe, C. ve Siboni, S. 2000.** Acid–base surface free energies of solids and the definition of scales in the Good–vanOss–Chaudhury theory. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 14 (2):235-272.

**DePorter, S.M., Lui, I., McNaughton, B.R., 2012.** Engineered bacteriophage as nanocarriers of exogenous imaging proteins and enzymes to human prostate cancer cells, *Soft Matter*, 8:10403.

**Devanathan, S., Salamon, Z., Nagar, A., Narang, S., Schleich, D., Darman, P., Hruby, V., Tollin, G., 2005.** Subpicomolar sensing of delta-opioid receptor ligands by molecular-imprinted polymers usin. *Anal. Chem.*, 77:2569-2574.

**Dhal, P.K. and Arnold, F.H., 1991.** Template-mediated synthesis of metalcomplexing polymers for molecular recognition, *Journal of American Chemical Society*, 113:7417–7418.

**Dhal, P.K. and Arnold, F.H., 1992.** Metal-coordination interactions in the template-mediated synthesis of substrate-selective polymers: Recognition of Bis(imidazole) substrates by Copper(II) iminodiacetate containing polymers, *Macromolecules*, 25:7051–7059.

**Dhal, P.K., Vidyasankar, S., Arnold, F.H., 1995.** Surface grafting of functional polymers to macroporous poly(trimethylolpropane trimethacrylate), *Chemistry of Materials*, 7:154–162.

**Dickert, F. L.; Aigner, S.; Jungbauer, C. 2012.** Blood typing with synthetic receptors - development of a flow system for continuous measurement. *Tech. Mess.*, 79 (11):509–515.

**Dickert, F.L., Besenboeck, H., Tortschanoff, M., 1998.** Molecular imprinting through van der Waals interactions: fluorescence detection of pahs in water, *Advanced Materials*, 10(2):149-151.

**Dickert, F.L., Forth, P., Lieberzeit, P., Tortschanoff, M., 1998.** Molecular imprinting in chemical sensing – Detection of aromatic and halogenated hydrocarbons as well as polar solvent vapors, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 360:759-762.

**Dickert, F.L., Thierer, S., 1996.** Molecularly imprinted polymers for optochemical sensors, *Advanced Materials*, 8(12):987–989.

**Dickert, F.L., Tortschanoff, M., Bulst, W.E., Fischerauer, G., 1999.** Molecularly imprinted sensor layers for the detection of polycyclic aromatic hydrocarbons in water, *Analytical Chemistry*, 71(20):4559–4563.

**Dorman, F.L., Overton, E.B., Whiting, J.J., Cochran, J.W., Gaedea-Torresdey, J., 2008.** Gas chromatography, *Anal. Chem.*, 80:4487-4497.

**D'Souza, S.M., Alexander, C., Carr, S.W., Waller, A.M., Whitcombe, M.J., Vulfson, E.N., 1999.** Directed nucleation of calcite at a crystal-imprinted polymer surface. *Nature*, 398:312-316.

**Egan, T.J., Rodgers, A.L., Siele, T., 2004.** Nucleation of calcium oxalate crystals on an imprinted polymer surface from pure aqueous solution and urine. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 9:195-202.

**Ertürk, G. 2010.** Yüzey plazmon rezonans temelli immunoglobulin G sensörünün hazırlanması. *Yüksek Lisans Tezi*, HÜ Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

**Eswara Dutt, V.V.S. ve Mottola, H.A., 1974.** Determination of uric acid at the microgram level by a kinetic procedure based on a pseudo-induction period. *Anal. Chem.*, 46:1777-1781.

**Fang, G.Z. Fan, C. Liu, H.L. Pan, M.F. Zhu, H.D. Wang, S.A. 2014.** Novel molecularly imprinted polymer on CdSe/ZnS quantum dots for highly selective optosensing of mycotoxin zearalenone in cereal samples. *RSC Adv.*, 4:2764–2771.

**Fanguy, J.C., Henry, C.S. 2002.** The analysis of uric acid in urine using microchip capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Electrophoresis*, 23:767-773.

**Fano, U. 1941.** The theory of anomalous diffraction gratings and of quasi-stationary waves on metallic surfaces (Sommerfeld's waves). *JOSA*, 31:213-222.

**Fox H.W. ve Zisman, W.A. 1950.** The spreading of liquids on low energy surfaces. I. Polytetrafluoroethylene, *Journal of Colloid Science*, 5 (6):514–531.

**Fujii, Y., Matsutani, K., Kikuchi, K., 1985.** Formation of a specific co-ordination cavity for a chiral amino acid by template synthesis of a polymer schiff base cobalt(III) complex. *J. Chem. Soc.-Chem. Commun.*, 7:415-417.

**Galban, Y., Andreu, M.J., de Marcos Almenara, S., Castillo, J.R., 2001.** Direct determination of uric acid in serum by a fluorometric-enzymatic method based on uricase. *Talanta*, 54(5):847-854.

**Geisinger, K.R., Batsakis, J.G., Bauer, R.C., 1979.** Serum uric acid. *Am. J. Clin. Pathol.*, 72:330-336.

**George, S.K., Dipu, M.T., Mehra, U.R., Singh, P., Verma, A.K., Ramgaokar, J.S. 2006.** Improved HPLC method for the simultaneous determination of allantoin, uric acid and creatinine in cattle urine. *Journal of Chromatography B*, 832(1):134-137.

**Gilmartin, M.A. ve Hart, J.P., 1994.** Novel, reagentless, amperometric biosensor for uric acid based on a chemically modified screen-printed carbon electrode coated with cellulose acetate and uricase. *Analyst*, 119:833-840.

**Gilmartin, M.A.T., Hart, J.P., Birch, B. 1992.** Voltammetric and amperometric behaviour of uric acid at bare and surface-modified screen-printed electrodes: studies towards a disposable uric acid sensor, *Analyst*, 117:1299-1303.

**Glad, M., Norrlov, O., Sellergren, B., Siegbahn, N., Mosbach, K.J., 1985.** Use of silane monomers for molecular imprinting and enzyme entrapment in polysiloxane-coated porous silica, *Chromatography*, 347:11–23.

**Glad, M., Reinholdsson, P., Mosbach, K., 1995.** Molecularly imprinted composite polymers based on trimethylolpropane trimethacrylate for efficient enantiomeric separations, *Reactive Polymers*, 25:47–54.

**Glaser, R.W. 1993.** Antigen-antibody binding and mass transport by convection and diffusion to a surface: a two-dimensional computer model of binding and dissociation kinetics. *Analytical Biochemistry*, 40:180-183.

**Gokel G.W., ve Trafton, J.E., 1990.** Cation binding by macrocycles, Marcel Dekker, New York, 253.

**Goyal, R.N., Gupta, V.K., Sangal, A., Bachheti, N. 2005.** Voltammetric determination of uric acid at a fullerene-c60-modified glassy carbon electrode. *Electroanalysis*, 17 (24), 2217 – 2223.

**Graham, A.L., Carlson, C.A., Edmiston, P.L., 2002.** Development and characterization of molecularly imprinted Sol-Gel materials for the selective detection of DDT, *Analytical Chemistry*, 74(2):458–467.

**Grene, N.T. and Shimizu, K.D., 2005.** Colorimetric molecularly imprinted polymer sensor array using dye displacement, *Journal of American Chemical Society*, 127:5695-5700.

**Gurtova, O. Ye, L. Chmilenko. F., 2013. 2013.** Potentiometric propranolol-selective sensor based on molecularly imprinted polymer. *Anal. Bioanal. Chem.*, 405:287–295.

**Gürmen, S., Ebin, B. 2008.** Nanopartiküller ve üretim yöntemleri. *TMMOB Metalurji Mühendisleri Odası*, 31-38.

**Hadi, M., ve Rouhollahi, A. 2012.** Simultaneous electrochemical sensing of ascorbic acid, dopamine and uric acid at anodized nanocrystalline graphite-like pyrolytic carbon film electrode. *Anal. Chim. Acta*, 721:55–60.

**Hansen, F.K. 2004.** The measurement of surface energy of polymers by means of contact angles of liquids on solid surfaces, A short overview of frequently used methods. *Surf Energ Polym*, 1-11.

**Harris, R.D., Wilkinson, J.S. 1995.** Waveguide surface plasmon resonance sensors. *Sensors and Actuators B*: 29:261-267.

**Hart, B.R., ve Shea, K.J., 2002.** Molecular imprinting for the recognition of N -terminal histidine peptides in aqueous solution. *Macromolecules*, 35:6192-6201.

**Haupt, K., 2012.** Molecular imprinting, *Topics in Current Chemistry*, 325:1-28.

**Haupt, K., Linares, A.V., Bompert, M., Bui, B.T.S. 2012.** Molecularly imprinted polymers. *Top Curr Chem.*, 325:1–28.

**Hedborg, E., Winquist, F., Lundstroëm, I., Andersson, L.I., Mosbach, K., 1993.** Some studies of molecularly-imprinted polymer membranes in combination with field-effect devices, *Sensors and Actuators A*, 37-38:796-801.

**Hedborg, E., Winquist, F., Lundström, I., Andersson, L., Mosbach, K., 1993.** Some studies of molecularly imprinted polymer membranes in combination with field-effect devices, *Sensors and Actuators A-Physical*, 796–799.

**Heineman, W.R., Halsall, H.B. 1985.** Strategies for electrochemical immunoassay. *Anal. Chem.*, 57:1321A.

**Hisatome, I., Tsuboi, M., Shigemasa, C., 1996.** Renal hypouricemia. *Nippon Rinsho*, 54: 3337.

**Homola, J. 1999.** Surface plasmon resonance sensors: review. *Sensors and Actuators B*, 54:3-15.

**Homola, J. 2003.** Present and future of surface plasmon resonance biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377:528–539.

**Homola, J. 2006.** Surface plasmon resonance (SPR) biosensors and their application in food safety and security. *Frontiers in Planar Lightwave Circuit Technology*, 101–118.

**Homola, J., Piliarik, M., Dostálek, J. 2006(a).** Surface plasmon resonance based sensors. *Springer Berlin Heidelberg*.

**Homola, J., Piliarik, M., Horváth, R. 2006(b).** Springer series on chemical sensors and biosensors methods and applications. *Series Ed.: Wolfbeis, O.S*, 1612-7617.

**Hosoya, K., Yoshizako, K., Tanaka, N., Kimata, K., Araki, T., Haginaka, J., 1994.** Uniform-size macroporous polymer-based stationary phase for HPLC prepared through molecular imprinting technique, *Chemistry Letters*, 1437–1438.

<http://fbt.cz/en/skripta/ix-travici-soustava/7-vitaminy-a-vyziva/>

**Huang, S.H., Shih, Y.C., Wu, C.Y., Yuan, C.J., Yang, Y.S., Li, Y.K., Wu, T.K., 2004.** Detection of serum uric acid using the optical polymeric enzyme biochip system. *Biosens. Bioelectron.*, 19:1627-1633.

**Ibrahim, O.B., 2012.** Complexes of urea with Mn(II), Fe(III), Co(II), and Cu(II) metal ions, *Advances in Applied Science Research*, 3 (6), 3522-3539.

**Irie, K., ve Watanabe, K., 1980.** Aldal condensations with metal(II) complex catalysts. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 53:1366-1371.

**Ishimaru, A., Jaruwatanadilok, S., Kuga, Y. 2005.** Generalized surface plasmon resonance sensors using metamaterials and negative index materials. *Progress In Electromagnetics Research, PIER*. 51:139–152.

**Işık, P., Karakoç, V., Akgöl, S., Aksöz, E., Denizli, A. 2012.** Poly(hydroxyethyl methacrylate) based magnetic nanoparticles for plasmid DNA purification from *Escherichia coli* lysate. *Materials Science and Engineering C*, 32:1133–1140.

**Ivanova-Mitseva, P.K., Guerreiro, A., Piletska, E.V., Whitcombe, M.J., Zhou, Z., Mitsev, P.A., Davis, F., Piletsky, S.A., 2012.** Cubic molecularly imprinted polymer nanoparticles with a fluorescent core. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 51:5196–5199.

**Iverson B.L., ve Lemer, R.A., 1989.** Sequence-specific peptide cleavage catalyzed by an antibody. *Science*, 243:1184-1188.

**Jenkins, A.L., Uy, O.M., Murray, G.M., 1997.** Polymer based lanthanide luminescent sensors for the detection of nerve agents, *Analytical Communications*, 34:221-224.

**Jindal, K., Tomar, M., Gupta, V., 2012.** CuO thin film based uric acid biosensor with enhanced response characteristics, *Biosens. Bioelectron.* 38:11–18.

**Johnson, R.J., Kang, D.K., Feig, D., Kivlighn, S., Kanellis, J., Watanabe, S., Tuttle K.R., Rodriguez-Iturbe, B., Herrera-Acosta, J., Mazzali, M., 2003.** Is there a pathogenetic role for uric acid in hypertension and cardiovascular and renal disease? *Hypertension*, 41:1183-1190.

**Jung, L.S., Nelson, K.E., Stayton, P.S., Campbell, C.T. 2000.** Binding and dissociation kinetics of wild-type and mutant streptavidins on mixed biotin-containing alkylthiolate monolayers. *Langmuir*, 16:9421-9432.

**Kahn, K., Plaxco, K.W. 2010.** Principles of biomolecular recognition. In Zourob M (ed): Recognition receptors in biosensors. Springer, New York, 3-46.

**Kamali, K.Z., Pandikumar, A., Sivaraman, G., Lim, H.N., Wren, S.P., Sun, T., Huang, N.M., 2015.** Silver@graphene oxide nanocomposite-based optical sensor platform for biomolecules. *RSC Advances*. 5(23):17809-17816.

**Kan, J., Pan, X., Chen, C., 2004.** Polyaniline-uricase biosensor prepared with template process. *Biosens. Bioelectron.* 19:1635–1640.

**Kara, M., Uzun, L., Kolayli, S., Denizli, A., 2013.** Combining molecular imprinted nanoparticles with surface plasmon resonance nanosensor for chloramphenicol detection in honey. *J. Appl. Polym. Sci.*, 129:2273–2279.

**Karakoç, V. 2013.** Arsenik baskılanmış nanopartiküllerle çevre sularından arsenik uzaklaştırılması. *Bitirme Tezi*, HÜ Fen Fakültesi Kimya Bölümü, Ankara.

**Karlsson, R., Falt, A. 1997.** Experimental design for kinetic analysis of protein-protein interactions with surface plasmon resonance biosensors. *Journal of Immunological Methods*, 200:121-133.

**Karube, I., Nomura, Y., Arikawa, Y., 1995.** Biosensors for environmental control, *Trends in Analytical Chemistry*, 14:295-299.

**Katz, A., Davis, M.E., 2000.** Molecular imprinting of bulk, microporous silica, *Nature*, 403:286–289.

**Kavaz, D., 2011.** Nanopartiküller, Nanobülten, *Aylık Nanoteknoloji Ve Nanotıp Dergisi*, 13:12-19.

**Kelley, W.N. ve Weiner, I.M., 1978.** Uric acid (Chapter 14), Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.

**Kempe, M. and Mosbach, K., 1995.** Molecular imprinting used for chiral separations, *Journal of Chromatography A*, 694:3–13.

**Kempe, M., Glad, M., Mosbach, K., 1995.** An approach towards surface imprinting using the enzyme ribonuclease A, *Journal of Molecular Recognition*, 8:35–39.

**Kenan, S. 2014.** Au(III) tayini için polimer esaslı optik sensör geliştirilmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, MÜ Kimya Anabilim Dalı, Analitik Kimya Programı, İstanbul.

**Khasanah, M., Mudasir, Kuncaka A., Sugiharto, E. 2012.** Development of uric acid sensor based on molecularly imprinted polymethacrylic acid-modified hanging mercury drop electrode. *Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 6:209-214.

**Khasanah, M., Mudasir, Kuncaka, A., Sugiharto, E., Supriyanto, G., Wafiroh, S. 2010.** Enhancement of the sensitivity and selectivity of the voltammetric sensor for uric acid using molecularly imprinted polymer. *Indonesian Journal of Chemistry*, 10(3):295–300.

**Khoo, S.B. ve Chen, F., 2002.** Studies of sol–gel ceramic film incorporating methylene blue on glassy carbon: An electrocatalytic system for the simultaneous determination of ascorbic and uric acids. *Anal. Chem.*, 74: 5734–5741.

**Kim, K.M., Henderson, G.N., Ouyang, X., Frye, R.F., Sautin, Y.Y., Feig, D.I., Johnson, R.J. 2009.** A sensitive and specific liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of intracellular and extracellular uric acid. *Journal of Chromatography B*, 877: 2032–2038.

**Klemp, P., Stansfield, S.A., Castle, B., Robertson, M.C., 1997.** Gout is on the increase in New Zealand. *Ann. Rheum. Dis.*, 56:22-26.

**Kobayashi, T., Wang, H.Y., Fujii, N., 1995.** Molecular imprinting of theophylline in acrylonitrile-acrylic acid copolymer membrane, *Chemical Letters*, 10:927–928.

**Koç, F., Kocaman, S. 2004.** Kontrollü salınım sistemleri ve bu sistemlerde kullanılan polimerler, *Bitirme Tezi*, Osmangazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, Eskişehir.

**Koyun, A., Ahlatcıoğlu, E., Koca İpek, Y.** Biosensors and their principles. *Roadmap of Biomedical Engineers and Milestones*, 115-142.

**Kretschmann, E. 1971.** The determination of the optical constants of metals by excitation of surface plasmons. *Zeitschrift für Physik*, 241:313-324.



**Kriz, D. and Mosbach, K., 1995.** Competitive amperometric morphine sensor based on an agarose immobilised molecularly imprinted polymer, *Analytica Chimica Acta*, 300:71-75.

**Kriz, D., Berggren Kriz, C., Andersson, L., Mosbach, K., 1994.** Thin-layer chromatography based on the molecular imprinting technique, *Analytical Chemistry*, 66:2636–2639.

**Kriz, D., Ramström, O., Svensson, A., Mosbach, K., 1995.** Introducing biomimetic sensors based on molecularly imprinted polymers as recognition elements, *Analytical Chemistry*, 67:2142–2144.

**Kubo, H., Player, T.N., Shinoda, S., Tsukube, H., Nariai, H., Takeuchi, T., 2004.** Chiral recognition of octadentate Na<sup>+</sup> complex with tetra-armed cyclen by molecularly imprinted polymers, *Anal. Chim. Acta*, 504:137-140.

**Kugimiya, A., ve Takeuchi, T., 2001.** Surface plasmon resonance sensor using molecularly imprinted polymer for detection of sialic acid. *Biosens. Bioelectron.*, 16:1059-1062.

**Kumbhat, S., Shankaran, D.R., Kim, S.J., Gobi, K.V., Joshi, V., Miura, N., 2007.** Surface plasmon resonance biosensor for dopamine using D3 dopamine receptor as a biorecognition molecule. *Biosens Bioelectron.* 23(3):421-7

**Lahav, M., Katz, E., Willner, I., 2001.** Photochemical imprint of molecular recognition sites in two-dimensional monolayers assembled on au electrodes: Effects of the monolayer structures on the binding affinities and association kinetics to the imprinted interfaces, *Langmuir*, 17:7387–7395.

**Lai, E.P.C., Fafara, A., VanderNoot, V.A., Kono, M., Polsky, B., 1998.** Surface plasmon resonance sensors using molecularly imprinted polymers for sorbent assay of theophylline, caffeine and xanthin, *Canadian Journal of Chemistry*, 76(3):265-273.

**Lakshmi, D., Sharma, P.S., Prasad, B.B., 2006.** Development of uric acid sensor based on molecularly imprinted polymer-modified hanging mercury drop electrode. *Electroanalysis*, 18:918.

**Lavine, B.K., Westover, D.J., Kaval, N., Mirjankar, N., Oxenford, L., Mwangi, G.K., 2007.** Swellable molecularly imprinted polyN-(N-propyl)acrylamide particles for detection of emerging organic contaminants using surface plasmon resonance spectroscopy. *Talanta*, 72:1042-1048.

**Lele, B.S., Kulkarni, M.G., Mashelkar, R.A., 1999.** Molecularly imprinted polymer mimics of chymotrypsin 2. Functional monomers and hydrolytic activity, *Reactive & Functional Polymers*, 40:215–229.

**Leshchinskaya, A.P., Ezhova, N.M., Pisarev, O.A. 2015.** Synthesis and sorption properties of polymeric sorbents molecularly imprinted with uric acid. *Russian Journal of Applied Chemistry*, 88(5):820–825.

**Leshchinskaya, A.P., Polyakova, I.V., Groshikova, A.R., Pisarev, O.A., Panarin, E.F. 2013.** Selective sorption of uric acid by novel molecularly imprinted polymers. *Molecular Imprinting*, 1:17–26.

**Levi, R., McNiven, S., Piletsky, S.A., Rachkov, A., Cheong, S.H., Yano, K., Karube, I., 1997.** Optical detection of chloramphenicol using molecularly imprinted polymers, *Analytical Chemistry*, 69:2017-2021.

**Li, L., Cai, X., Ding, Y., Gu, S., Zhang, Q. 2013.** Synthesis of Mn-doped CdTe quantum dots and their application as a fluorescence probe for ascorbic acid determination. *Anal. Methods*, 5:6748-6754.

**Li, W. ve Li, S., 2007.** Molecular imprinting: A versatile tool for separation, sensors and catalysis, *Advances in Polymer Science*, 206:191–210.

**Li, X. and Husson, S.M. 2006.** Adsorption of dansylated amino acids on molecularly imprinted surfaces: a surface plasmon resonance study. *Biosensors and Bioelectronics*, 22:336-348.

**Li, X. X., Bai, L. H., Wang, H., Wang, J., Huang, Y. P., Liu, Z.S.J., 2012.** Preparation and characterization of enrofloxacin-imprinted monolith prepared with crowding agents, *Chromatography, A*, 1251:141–147.

**Li, Y., Ran, G., Yi, W.J., Luo, H.Q., Li, N.B., 2012.** A glassy carbon electrode modified with graphene and poly(acridine red) for sensing uric acid. *Microchim. Acta*, 178:115–121.

**Liberopoulos, E., Christides, D., Elisaf, M., 2002.** Comparative effects of losartan and irbesartan on serum uric acid in hypertensive patients with hyperuricemia and gout. *Journal of Hypertension*, 20(2):347.

**Lim, C.K., Pryde, D.E., Lawson, A.M., 1978.** Specific method for determining uric acid in serum using high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, 1978, 149:711.

**Lin, L.P., Huang, L.S., Lin, C.W., Lee, C.K., Chen, J.L., Hsu, S.M., Lin, S. 2005.** Determination of binding constant of DNA-binding drug to target DNA by surface plasmon resonance biosensor technology. *Current Drug Target*, 5:61-72.

**Liu, Y. 2006.** Nano-assembled nanoparticle/polymer based field-effect transistors and their biosensing applications. Doktora tezi.

**Lotierzo, M., Henry, O.Y.F., Piletsky, S., Tothill, I., Cullen, D., Kania, M., Hock, B., Turner, A.P.F., 2004.** Surface plasmon resonance sensor for domoic acid based on grafted imprinted polymer, *Biosensors and Bioelectronics*, 20:145–152.

**Lowe, R.S. 2007.** Overview of biosensor and bioarray technologies. Handbook of Biosensors and Biochips. Wiley, Weinheim 2007.

**Lulka, M.F., Chambers, J.P., Valdes, E.R., Thompson, R.G., Valdes, J.J., 1997.** Molecular imprinting of small molecules with organic silanes: Fluorescence detection, *Analytical Letters*, 30:2301.

**Luppa, P.B., Sokoll, L.J., Chan, D.W. 2001.** Immunosensors--principles and applications to clinical chemistry. *Clin. Chim. Acta*, 314(1-2):1-26.

**Ly, Y., Zhang, Z., Chen, F., 2002.** Chemiluminescence biosensorchip based on a microreactor using carrier air flow for determination of uric acid in human serum. *Analyst*, 127:1176–1179.

**Marazuela, M.D., Moreno-Bondi, M.C., 2002.** Fiber-optic biosensors—An overview. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 372:664-682.

**Masoud, M.S., Ali, A.E., Shaker, M.A., Elasala, G.S., 2012.** Synthesis, computational, spectroscopic, thermal and antimicrobial activity studies on some metal–urate complexes. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 90:93–108.

**Mathew, J. and Buchardt, O., 1995.** Molecular imprinting approach for the recognition of adenine in aqueous medium and hydrolysis of adenosine 58-triphosphate, *Bioconjugate Chemistry*, 6:524–528.

**Mathew-Krotz, J. and Shea, K.J., 1996.** Imprinted polymer membranes for the selective transport of targeted neutral molecules, *Journal of American Chemical Society*, 118:8154–8155.

**Matsui, J., Doblhoff-Dier, O., Takeuchi, T., 1995.** Atrazine-selective polymer prepared by molecular imprinting technique, *Chemical Letters*, 6:489.

**Matsui, J., Kato, T., Takeuchi, T., Suzuki, M., Yokoyama, K., Tamiya, E., Karube, I., 1993.** Molecular recognition in continuous polymer rods prepared by a molecular imprinting technique, *Analytical Chemistry*, 65:2223–2224.

**Matsui, J., Nicholls, I.A., Takeuchi, T., Mosbach, K., Karube, I., 1996.** Metal ion mediated recognition in molecularly imprinted polymers, *Analytica Chimica Acta* 335:71-77.

**Mayes, A.G. and Mosbach, K., 1996.** Molecularly imprinted polymer beads: Suspension polymerisation using a liquid perfluorocarbon as the dispersing phase, *Analytical Chemistry*, 68:3769–3774.

**Mayes, A.G., Andersson, L.I., Mosbach, K., 1994.** Sugar binding polymers showing high anomeric and epimeric discrimination by non-covalent molecular imprinting, *Analytical Biochemistry*, 222:483–488.

**McGlennen R.C. 2001.** Miniaturization technologies for molecular diagnostics. *Clin. Chem.*, 47:393-402.

**McNiven, S., Kato, M., Levi, R., Yano, K., Karube, I., 1998.** Chloramphenicol sensor based on an in situ imprinted polymer, *Analytica Chimica Acta*, 365:69.

**Menceloğlu, Y.Z. 2008.** Uluslararası rekabet stratejileri: Nanoteknoloji ve Türkiye. *Tüsiad Rekabet Stratejileri Dizisi*, 11.

**Miland, E., Miranda Ordieres, A.J., Tunon Blanco, P., Smyth, M.R., Fagain, C.O., 1996.** Poly(o -aminophenol)-modified bienzyme carbon paste electrode for the detection of uric acid, *Talanta*, 43, 785-796.

**Moczko, E., Poma, A., Guerreiro, A., Sansalvador, I.P.D., Caygill, S., Canfarotta, F., Whitcombe, M.J., Piletsky, S., 2013.** Surface-modified multifunctional MIP nanoparticles. *Nanoscale*, 5:3733–3741.

**Mohammadpour D.N., Eskandari, R., Avadi, M.R., Zolfagharian, H., Mir Mohammad S.A., Rezayat, M., 2012.** Preparation and in vitro characterization of chitosan nanoparticles containing Mesobuthus eupeus scorpion venom as an antigen delivery system. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, 18:44-52.

**Mohanraj, V.J., Chen, Y. 2006.** Research article; Nanoparticles – A review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5(1):561-573.

**Molinelli, A., O’Mahony, J., Nolan, K., Smyth, M.R., Jakusch, M., Mizaikoff, B., 2005.** Analyzing the mechanisms of selectivity in biomimetic self-assemblies *via* IR and NMR spectroscopy of prepolymerization solutions and molecular dynamics simulations, *Analytical Chemistry*, 77:5196–5204.

**Moon, S., Kim, D.J., Kim, K., Kim, D., Lee, H., Lee, K., Haam, S. 2010.** Surface-enhance plasmon resonance detection of nanoparticle-conjugated DNA hybridization. *Applied Optics*, 49:484-491.

**Morihara, K., Kurokawa, M., Kamata, Y., Shimada, T., 1992.** Enzyme-like enantioselective catalysis over chiral ‘molecular footprint’ cavities on a silica (alumina) gel surface, *Journal of Chemical Society Chemical Communications*, 358–360.

**Morrow, K.J. 2008.** Innovations mark biosensor development: advances improve quality of information for component interactions and screening. *Genetic and Engineering News*, 28(5).

**Mosbach, K., 1994.** Molecular imprinting. *Trends Biochem. Sci.* 19:9–14.

**Motghare, R.V., Tadi, K.K., Dhawale, P., Deotare, S., Kawadkar, A.K., Chillawar, R., Khan, S. 2015.** Voltammetric determination of uric acid based on molecularly imprinted polymer modified carbon paste electrode, *Electroanalysis*, 27(3):825-832.

**Muldoon, M. and Stanker, L., 1995.** Polymer synthesis and characterization of a molecularly imprinted sorbent assay for atrazine, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43:1424–1427.

**Mullett, W.M., Lai, E.P.C., Yeung, J.M. 2000.** Surface plasmon resonance-based immunoassays. *Methods*, 22:77–91.

**Mullett, W.M., Walles, M., Levsen, K., Borlak, J., Pawliszyn, J., 2004.** Multidimensional on-line sample preparation of verapamil and its metabolites by a molecularly imprinted polymer coupled to liquid chromatography–mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 801:297–306.

**Muñoz, J.A., López-Mesas, M., Valiente, M. 2010.** Development and validation of a simple determination of urine metabolites (oxalate, citrate, uric acid and creatinine) by capillary zone electrophoresis, *Talanta*, 81(1-2):392-397.

**Müller, R., Andersson, L.I., Mosbach, K., 1993.** Molecularly imprinted polymers facilitating a b-elimination reaction, *Makromolekulare Chemie Rapid Communications*, 14:637–641.

**Navarro-Villoslada, F.N., San Vicente, B., Moreno-Bondi, M., 2004.** Application of multivariate analysis to the screening of molecularly imprinted polymers for bisphenol A, *Analitical Chimica Acta*, 504:149–162.

**Nematollahzadeh, A., Sun, W., Aureliano, C.S.A., Lutkemeyer, D., Stute, J., Abdekhodaie, M.J., Shojaei, A., Sellergren, B., 2011.** High-capacity hierarchically imprinted polymer beads for protein recognition and capture, *Angewandte Chemie International Edition*, 50:495–498.

**Newman, J.D., Tigwell, L.J., Warner, P.J., Turner, A.P.F., 2001.** Biosensors: boldly going into the new millennium. *Sensor Review*, 21(4):268 – 271.

**Nicholls, I., Andersson, L., Mosbach, K., Ekberg, B., 1995.** Recognition and enantioselection of drugs and biochemicals using molecularly imprinted polymer technology, *Trends in Biotechnology*, 13:47–51.

**Nidhin, M., Indumathy, R., Sreeram, K. J., Nair, B.U., 2008.** Synthesis of iron oxide nanoparticles of narrow size distribution on polysaccharide templates, *Bull. Mater. Sci.*, 31:93-96.

**Nilsson, K., Lindell, J., Norrlöw, O., Sellergren, B., 1994.** Imprinted polymers as antibody mimics and new affinity gels for selective separations in capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, 680:57–61.

**Nishide, H., ve Tsuchida, E., 1976.** Selective adsorption of metal ions on poly (4-vinyl pyridine) resins in which the ligand chain is immobilized by crosslinking. *Makromol. Chem.* 177:2295–2310.

**Nishikawa, T., Fujita, S. 2015.** Nanoimprint sensors, the fusion of nanofabrication, nanophotonics and nanobiology, *Taylor&Francis Group, LLC*.

**Nomadics, Inc. Overview of Surface Plasmon Resonance-Derleme.**

**Norrlöw, O., Glad, M., Mosbach, K., 1984.** Acrylic polymer preparations containing recognition sites obtained by imprinting with substrates, *Journal of Chromatography*, 299:29–41.

**Norrlöw, O., Månsson, M.-O., Mosbach, K., 1987.** Improved chromatography: prearranged distances between boronate groups by the molecular imprinting approach, *Journal of Chromatography*, 396:374–377.

**Novotny, L., Hecht, B. 2006.** Principles of nano-optics. *Cambridge University Press: Cambridge, UK*, 378-393.

**O'Shannessy, D.J., Andersson, L.I., Mosbach, K., 1989.** Molecular recognition in synthetic polymers. Enantiomeric resolution of amide derivatives of amino acids on molecularly imprinted polymers, *Journal of Molecular Recognition*, 2:1–5.

**O'Shea, T.A. ve Mancy, K.H., 1978.** The effect of pH and hardness metal ions on the competitive interaction between trace metal ions and inorganic and organic complexing agents found in natural waters, *Water Research*, 12, 703-711.

**Offermanns, S., Rosenthal, W., 2008.** Encyclopedia of molecular pharmacology, 2nd Edition, Springer, 135.

**Ohkubo, K., Urata, Y., Hirota, S., Honda, Y., Fujishita, Y., Sagawa, T., 1994.** Homogenous esterolytic catalysis of a polymer prepared by molecular imprinting of a transition state analogue, *Journal of Molecular Catalysis*, 93:189–193.

**Orellana, G., Moreno-Bondi, M.C., 2005.** Frontiers in chemical sensors: novel principles and techniques, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, NY.

**Osman, B., Uzun, L., Beşirli, N., Denizli, A. 2013.** Microcontact imprinted surface plasmon resonance sensor for myoglobin detection. *Materials Science and Engineering C*, 33:3609–3614.

**Ostiguy, C., Lapointe, G., Menard, L., Cloutier, Y., Trottier, M., Boutin, M., Antoun, M., Normand, C. 2006.** Nanoparticles, Actual knowledge about occupational health and safety risks and prevention measures. *IRSST*, R-455.

**Otto, A. 1968.** Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. *Z. Phys. A Hadrons Nucl.*, 216:398-410.

**Ou, J., Li, X., Feng, S., Dong, J., Dong, X., Kong, L., Ye, M., Zou, H., 2007.** Preparation and evaluation of a molecularly imprinted polymer derivatized silica monolithic column for capillary electrochromatography and capillary liquid chromatography, *Analytical Chemistry*, 79:639-646.

**Owen, V. 1997.** Real-time optical immunosensors—A commercial reality. *Biosensors and Bioelectronics*, 12:i-ii.

**Owens, P.K., Karlsson, L., Lutz, E.S.M., Andersson, L.I., 1999.** Molecular imprinting for bio- and pharmaceutical analysis, *Trends in Analytical Chemistry*, 18(3):146-154.

**Özgür, E. 2011.** Östradiol tayini için moleküler baskılanmış sensörlerin hazırlanması. *Yüksek Lisans Tezi*, HÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Ankara.

**Papaioannou, E.H., Liakopoulou-Kyriakides, M., Papi, R.M., Kyriakidis, D.A., 2008.** Artificial receptor for peptide recognition in protic media: The role of metal ion coordination. *Materials Science and Engineering B*, 152:28–32.

**Patel, A.K., Sharma, P.S., Prasad, B.B., 2009.** Electrochemical sensor for uric acid based on a molecularly imprinted polymer brush grafted to tetraethoxysilane derived sol-gel thin film graphite electrode, *Materials Science and Engineering: C*, 29 (5):1545–1553.

**Peng, Y., 2013.** A novel sensor for uric acid based on an electropolymerization technique, [www.americanlaboratory.com](http://www.americanlaboratory.com)

**Perticone, F., Maio, R., Tassone, J.E., Perticone, M., Pascale, A., Sciacqua, A., Sesti, G. 2012.** Interaction between uric acid and endothelial dysfunction predicts new onset of diabetes in hypertensive patients. *International Journal of Cardiology*, article in press.

**Perumal, V., Hashim, U. 2014.** Advances in biosensors: principle, architecture and applications. *Journal of Applied Biomedicine*, 12(1):1–15.

**Peter, C., Meusel, M., Grawe, F., Katerkamp, A., Cammann, K., Borchers, T. 2001.** Optical DNA-sensor chip for real-time detection of hybridization events. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 371:120-127.

**Philip, D., ve Stoddart, J.F., 1996.** Self-assembly in natural and unnatural systems. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 35:1154–1196.

**Piermarini, S., Migliorelli, D., Volpe, G., Massoud, R., Pierantozzi, A., Cortese, C., Palleschi, G. 2012.** Uricase biosensor based on a screen-printed electrode modified with Prussian blue for detection of uric acid in human blood serum. *Sensors and Actuators B*, article in press.

**Piletsky, S.A., Parhometz, Y.P., Lavryk, N.V., Panasyuk, T.L., El'skaya, A.V., 1994.** Sensors for low-weight organic molecules based on molecular imprinting technique, *Sensors and Actuators B*, 18-19:629-631.

**Piletsky, S.A., Piletskaya, E.V., Elgersma, A.V., Yano, K., Karube, I., Parhometz, Y.P., Elskaya, A.V., 1995.** Atrazine sensing by molecularly imprinted membranes, *Biosensors and Bioelectronics*, 10:959–964.

**Piletsky, S.A., Piletskaya, E.V., El'skaya, A.V., Levi, R., Yano, K., Karube, I., 1997.** Optical detection system for triazine based on molecularly-imprinted polymers, *Analytical Letters*, 30:445-455.

**Piletsky, S.A., Piletskaya, E.V., Panasyuk, T.L., El'skaya, A.V., Levi, R., Karube, I., Wulff, G., 1998.** Imprinted membranes for sensor technology — opposite behavior of covalently and noncovalently imprinted membranes, *Macromolecules*, 31:2137.

**Piletsky, S.A., Piletskaya, E.V., Yano, K., Kugimiya, A., Elgersma, A.V., Levi, R., Kahlow, U., Takeuchi, T., Karube, I., Panasyuk, T.I., El'skaya, A.V., 1996.** A biomimetic receptor system for sialic acid based on molecular imprinting, *Analytical Letters*, 29:157-170.

**Piletsky, S.A., Turner, N.W., Laitenberger, P., 2006.** Molecularly imprinted polymers in clinical diagnostics-future potential and existing problems, *Medical Engineering and Physics*, 28:971–977.

**Plunkett, S. and Arnold, F., 1995.** Molecularly imprinted polymers on silica: selective supports for high-performance ligand-exchange chromatography, *Journal of Chromatography A*, 708:19–29.

**Polyakov, M.V. 1931.** Adsorption properties and structure of silica gel. *Zhurnal Fizieskoj Khimii/Akademiya SSSR*, 2:799–805.

**Poma, A., Turner, A.P.F., Piletsky, S.A., 2010.** Advances in the manufacture of MIP nanoparticles, *Trends in Biotechnology*, 28:629–637.

**Pormsila, W., Krahenbuhl, S., Hauser, P.C. 2009.** Capillary electrophoresis with contactless conductivity detection for uric acid determination in biological fluids. *Analytica Chimica Acta*, 636: 224–228.

**Potts, J.M. 2004.** Current clinical urology, essential urology: A guide to clinical practice. Humana Press.

**Prasad, B.B., Sharma, P.S., Lakshmi, D., 2007.** Molecularly imprinted polymer-based solid-phase extraction combined with molecularly imprinted polymer-based sensor for detection of uric acid. *J. Chromatogr. A*, 1173(1-2):18-26.

**Puoci, F., Cirillo, G., Curcio, M., Iemma, F., Spizzirri, U.G., Picci, N., 2007.** Molecularly imprinted solid phase extraction for the selective HPLC determination of  $\alpha$ -tocopherol in bay leaves, *Analytica Chimica Acta*, 593:164–170.



**Puoci, F., Iemma, F., Cirillo, G., Picci, N., Matricardi, P., Alhaique, F., 2007.** Molecularly imprinted polymers for 5-fluorouracil release in biological fluids, *Molecules*, 12:805–814.

**Puoci, F., Iemma, F., Muzzalupo, R., Spizzirri, U.G., Trombino, S., Cassano, R., Picci, N., 2004.** Spherical molecularly imprinted polymers (smips) via a novel precipitation polymerization in the controlled delivery of sulfasalazine, *Macromolecular Bioscience*, 4:22–26.

**Qu, S., Wang, X., Tong, C., Wu, J., 2010.** Metal ion mediated molecularly imprinted polymer for selective capturing antibiotics containing beta-diketone structure. *Journal of Chromatography A*, 1217:8205–8211.

**Rachkov, A., Minoura, N. 2001.** Towards molecularly imprinted polymers selective to peptides and proteins: The epitope approach. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1544:255-266.

**Raj, C.R. ve Ohsaka, T., 2003.** Voltammetric detection of uric acid in the presence of ascorbic acid at gold electrode modified with self-assembled monolayer. *J. Electroanal. Chem.*, 540:69.

**Ramanavičius, A., Herberg, F.W., Hutschenreiter, S. 2005.** Biomedical application of surface plasmon resonance biosensors (review). *Acta Medica Lituanica*, 12(3):1–9.

**Ramstrom, O., Andersson, L.I., Mosbach, K., 1993.** Recognition sites incorporating both pyridinyl and carboxy functionalities prepared by molecular imprinting, *Journal of Organic Chemistry*, 58:7562–7564.

**Rayleigh, L. 1907.** On the dynamical theory of gratings. *Proc. R. Soc. Lond. A*, 79:399-416.

**Rezus, Y.L.A. ve Bakker, H.J. 2006.** Effect of urea on the structural dynamics of water, *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America (PNAS)*, 103 (49), 18417-18420.

**Rieke, P.C. 1997.** Application of Van Oss-Chaudhury-Good theory of wettability to interpretation of interracial free energies of heterogeneous nucleation. *J Cryst Growth*, 182 (3-4):472-484.

**Robinson, D.K. and Mosbach, K., 1989.** Molecular imprinting of a transition state analogue leads to a polymer exhibiting esterolytic activity, *Journal of Chemical Society, Chemical Communications*, 969–970.

**Roosen-Runge, F., Heck, B.S., Zhang, F., Kohlbacher, O., Schreiber, F., 2013.** Interplay of pH and binding of multivalent metal ions: charge inversion and reentrant condensation in protein solutions, *The Journal of Physical Chemistry B*, 117 (18), 5777-5787.

**Rosatzin, T., Andersson, L.I., Simon, W., Mosbach, K., 1991.** Preparation of Ca<sup>sup</sup>2<sup>+</sup> selective sorbents by molecular imprinting using polymerisable ionophores *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 8:1261-1265.

**Sadana, A., Sadana, N. 2011.** Handbook of biosensors and biosensor kinetics. Elsevier.

**Saifuddin, N., Nur, Y.A.A., Abdullah, S.F., 2011.** Microwave Enhanced Synthesis of Chitosan-Graft-Polyacrylamide Molecular Imprinting Polymer for Selective Removal of 17 $\beta$ -Estradiol at Trace Concentration, *Asian Journal of Biochemistry*, 6(1):38–54.

**Salata, O.V. 2004.** Applications of nanoparticles in biology and medicine. *Journal of Nanobiotechnology*, 1-6.

**Sanders G.T., Pasman, A.J., Hoek, F.J., 1980.** Determination of uric acid with uricase and peroxidase. *J. Clin Chim Acta*, 101:299.

**Sarhan, A., Wulff, G. 1982.** On polymers with enzyme-analogous structure.14. Stereospecific binding by amide bonding or electrostatic interaction. *Makromolekular Chemistry*, 183(7):1603–1614.

**Sarı, M., Akgöl, S., Karataş, M., Denizli, A., 2006.** Reversible immobilization of catalase by metal chelate affinity interaction on magnetic beads, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 45:3036-3043.

**Scharf, L., West, A.P., Gao, H., Lee, T., Scheid, J.F., Nussenzweig, M.C., Bjorkman, P.J., Diskin, R. 2013.** Structural basis for HIV-1 gp120 recognition by a germ-line version of a broadly neutralizing antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.*, 110 (15):6049–6054.

**Schirhagl, R., 2014.** Bioapplications for molecularly imprinted polymers, *Analytical Chemistry*, 86:250–261.

**Sellergren, B. and Shea, K., 1994.** Enantioselective ester hydrolysis catalysed by imprinted polymers, *Tetrahedron Asymmetry*, 5:1403–1406.

**Sellergren, B., 1994.** Imprinted dispersion polymers: A new class of easily accessible affinity stationary phases, *Journal of Chromatography A*, 673:133–141.

**Sener, G., Uzun, L., Say, R., Denizli, A., 2011.** Use of molecular imprinted nanoparticles as biorecognition element on surface plasmon resonance sensor. *Sens. Actuators B: Chem.*, 160:791–799.

**Sergeyeva, T.A., Brovko, O.O., Piletska, E.V., Piletsky, S.A., Goncharova, L.A., Karabanova, L.V., Sergeyeva, L.M., El'skaya, A.V., 2007.** Porous molecularly imprinted polymer membranes and polymeric particles, *Analitica Chimica Acta*, 582:311–319.

**Sergeyeva, T.A., Piletsky, S.A., Brovko, A.A., Slinchenko, E.A., Sergeeva, L.M., El'skaya, A.V., 1999.** Selective recognition of atrazine by molecularly imprinted polymer membranes. Development of conductometric sensor for herbicides detection, *Analytica Chimica Acta*, 392:105-111.

**Severin, K., 2000.** Imprinted polymers with transition metal catalysts. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4:710-714.

**Shaker, S.A. ve Farina, Y., 2009,** Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II) and Cd(II) Mixed Ligand Complexes of Theophylline and Cyanate: Synthesis and Spectroscopic Characterization, *Modern Applied Science*, 3 (12), 88-93.

**Shea, K.J., Spivak, D.A., Sellergren, B., 1993.** Polymer complements to nucleotide bases. Selective binding of adenine derivatives to imprinted polymers, *Journal of the American Chemical Society*, 115:3368–3369.

**Shi, X., Wu, A., Qu, G., Li, R., Zhang, D., 2007.** Development and characterizations of molecularly imprinted polymers based on methacrylic acid for selective recognition of drugs, *Biomaterials*, 28:3741–3749.

**Shnek, D.R., Pack, D.W., Sasaki, D.Y., Arnold, F.H., 1994.** Specific protein attachment to artificial membranes via coordination to lipid-bound copper (II), *Langmuir*, 10:2382–2388.

**Siegel, H., 1976.** Metal Ions in Biological Systems, Dekker, New York.

**Siemann, M., Andersson, L., Mosbach, K., 1996.** Selective recognition of the herbicide atrazine by non-covalent molecularly imprinted polymers, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44:141–145, 1996.

**Song, D., 2013.** Molecularly Imprinted Polymer-New Characterization Methods and Designs, Doctoral dissertation, University of South Carolina.

**Soysal, M. Muti, M. Esen, C. Gencdag, K. Aslan, A. Erdem, A., 2013.** A novel and selective methylene blue imprinted polymer modified carbon paste electrode. *Electroanalysis*, 25:1278–1285.

**Spivak, D., Gilmore, M.A., Shea, K.J., 1997.** Evaluation of binding and origins of specificity of 9-ethyladenine imprinted polymers, *Journal of American Chemical Society*, 119:4388–4393.

**Sreenivasan, K., 1998.** Synthesis and evaluation of a molecularly imprinted polyurethane–poly(HEMA) semi-interpenetrating polymer networks as membrane, *Journal of Applied Polymer Science*, 70(1):19–22.

**Stamfordi, A. ve Justice Jr., J.B., 1996.** Probing brain chemistry. *Anal. Chem.*, 68:359A-363A.

**Striegler, S., 2003.** Carbohydrate recognition in cross-linked sugar-templated poly(acrylates). *Macromolecules*, 36:1310-1317.

**Strochkova, E.M., Turyan, Y.I., Kulseman, I., Shenhar, A. 1997.** Simultaneous voltammetric determination of uric and ascorbic acids in urine *Talanta*, 44:1923.

**Subat, M., Borovik, A.S., Konig, B., 2004.** Synthetic creatinine receptor: imprinting of a lewis acidic zinc(II)cyclen binding site to shape its molecular recognition selectivity. *J. Am. Chem. Soc.*, 126:3185-3190.

**Sundberg, R.J., ve Martin, R.B., 1989.** *Chem. Rev.* 89:1875–1914.

**Sze, Y.K. Davis, A.R., Neville, G.A., 1975.** Raman and infrared studies of complexes of mercury (II) with cysteine, cysteine methyl ester, and methionine, *Inorganic Chemistry*, 14 (8):1969-1974.

**Taguchi, Y., Takano, E., Takeuchi, T., 2012.** SPR sensing of bisphenol A using molecularly imprinted nanoparticles immobilized on slab optical waveguide with consecutive parallel Au and Ag deposition bands coexistent with bisphenol a-immobilized Au nanoparticles. *Langmuir*, 28:7083–7088.

**Tahmassebi, D. and Sasaki, T., 1994.** Synthesis of a new trialdehyde template for molecular imprinting, *Journal of Organic Chemistry*, 59:679–681.

**Thevenot, D.R., Toth, K., Durst, R.A., Wilson, G.S. 1999.** Electrochemical Biosensors: Recommended definitions and classification. *Pure Appl Chem.* 71:2333–2348.

**Tripathi, A., Gupta, R., Saraf, S.A., 2010.** PLGA nanoparticles of anti tubercular drug: drug loading and release studies of a water m-soluble drug. *Int. J. PharmTech. Res.*, 2:2116-2123.

**Tsai, W.C. and Li, L.C. 2009.** SPR-based immunosensor for determining staphylococcal enterotoxin A. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 136:8–12.

**Tullius, T.D., (Ed.), 1989.** Metals and Molecular Biology. Metal-DNA Chemistry; ACS Symposium Series; ACS, Washington, DC, 402:1.

**Turkewitsch, P., Wandelt, B., Darling, G.D., Powell, W.S., 1998.** Fluorescent Functional Recognition Sites through Molecular Imprinting. A Polymer-Based Fluorescent Chemosensor for Aqueous camp, *Analytical Chemistry*, 70:2025-2030.

**Turkoglu, E.A., Yavuz, H., Uzun, L., Akgol, S., Denizli, A., 2013.** The fabrication of nanosensor-based surface plasmon resonance for IgG detection. *Artificial Cells Nanomedicine And Biotechnology*. 41(3):213-221.

**Turner, A.P.F., Karuhe, I., Wilson, G.S. 1987.** Biosensors: fundamentals and applicarions. *Oxford University Press.*, Oxford, UK.

**Tübitak, 2004.** Vizyon 2023 projesi nanoteknoloji strateji grubu. *Nanobilim ve Nanoteknoloji Stratejileri*, Ankara.

**Uezu, K., Nakamura, H., Goto, M., Murata, M., Maeda, M., Takagi, M., Nakashio, F., 1994.** Novel metal ion-imprinted resins prepared by surface template polymerization with w/o emulsion, *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 3:436–438.

**Umpleby, R.J., Baxter, S.C., Chen, Y., Shah, R.N., Shimizu, K.D. 2001.** Characterization of molecularly imprinted polymers with the Langmuir-Freundlich isotherm. *Analytical Chemistry*, 73:4584-4591.

**Urdike, S.J., ve Hicks, G.P., 1967.** The enzyme electrode. *Nature*, 214:986-988.

**Usman Ali, M.S., Ibupoto, Z.H., Kashif, M., Hashim, U., Willander, M., 2012.** A potentiometric indirect uric acid sensor based on ZnO nanoflakes and immobilized uricase. *Sensors*, 12:2787–2797.

**Utku, S., Yılmaz, E., Türkmen, D., Uzun, L., Garipcan, B., Say, R., Denizli, A., 2008.** Ion-imprinted thermosensitive polymers for Fe<sup>3+</sup> removal from human plasma, *Hacettepe J. Biol. & Chem.*, 36 (4):291-304.

**Uzun, L., Say, R., Ünal, S., Denizli, A. 2009(b).** Production of surface plasmon resonance based assay kit for hepatitis diagnosis. *Biosensors and Bioelectronics*, 24:2878–2884.

**vanOss, C.J., Chaudhury, M.K., Good, R.J. 1988.** Interfacial Lifshitz–van der Waals and polar interactions in macroscopic systems. *Chem Rev*, 88 (6):927-941.

**Vasapollo, G., Del Sole, R., Mergola, L., Lazzoi, M.R., Scardino, A., Scorrano, S., Mele, G., 2011.** Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective, *International Journal of Molecular Sciences*, 12:5908-5945.

**Vetelino, J., Reghu, A. 2010.** Introduction to sensors. *CRC Pres, Taylor & Francis Group*.

**Vidyasankar, S., Ru, M., Arnold, F.H., 1997.** Molecularly imprinted ligand-exchange adsorbents for the chiral separation of underivatized amino acids. *J. Chromatogr. A*, 775:51.

**Vlatakis, G., Andersson, L.I., Müller, R., Mosbach, K., 1993.** Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting, *Nature*, 361:645–647.

**Wackerlig, J. ve Lieberzeit, P.A., 2015.** Molecularly imprinted polymer nanoparticles in chemical sensing – Synthesis, characterisation and application. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 207(A):144–157.

**Wade, W.S., Ashley, J.A., Jahangiri, G.K., McElhaney Janda G.K., Lemer, R.A., 1993.** A highly specific metal-activated catalytic antibody. *J Am. Chem. Soc.*, 115:4906.

**Wang, J., Chatrathi, M.P., Tian, B., Polsky, R., 2000.** Microfabricated electrophoresis chips for simultaneous bioassays of glucose, uric acid, ascorbic acid, and acetaminophen. *Anal. Chem.*, 72:2514-2518.

**Wang, J., Cormack, P.A.G., Sherrington, D.C., Khoshdel, E., 2003.** Monodisperse, molecularly imprinted polymer microspheres prepared by precipitation polymerization for affinity separation applications, *Angewandte Chemie International Edition*, 42:5336–5338.

**Wang, Y., Xu, H., Zhang, J., Li, G. 2008.** Electrochemical sensors for clinic analysis (Review). *Sensors*, 8:2043-2081.

**Wang, Z., Königsberger, E. 1998.** Solubility equilibria in the uric acid-sodium urate-water system, *Thermochimica Acta*. 310:237-242.

**Waring, W.S., Webb, D.J., Maxwell, S.R., 2000.** Uric acid as a risk factor for cardiovascular disease. *Q. J. Med.*, 93:707.

**Wei, S. and Mizaikoff, B., 2007.** Recent advances on noncovalent molecular imprints for affinity separations, *Journal of Separation Science*, 30:1794–1805.

**Wei, X., Samadi, A., Husson, S.M. 2005.** Synthesis and characterization of molecularly imprinted polymers for chromatographic separations. *Separation Science and Technology*, 40:109-129.

**Wolfbeis, O.S. 2006.** Surface plasmon resonance based sensors. *Springer series on chemical sensors and biosensors, methods and applications*, Springer.

**Wood, R.W. 1902.** On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum. *Philosophical magazine*, 4:396-402.

**Wood, R.W. 1912.** Diffraction gratings with controlled groove form and abnormal distribution of intensity. *Philosophical magazine*, 23:310–317.

**Wootton, I.D.P., Freeman, H., 1982.** *Microanalysis in Medical Biochemistry*, 6th ed., Churchill Livingstone, New York.

**Wring, S.A. ve Hart, J.P., 1992.** Chemically modified, carbon-based electrodes and their application as electrochemical sensors for the analysis of biologically important compounds. A review. *Analyst*, 117:1215-1229.

**Wulff, G., 1995.** Molecular imprinting in cross-linked materials with the aid of molecular templates - A way towards artificial antibodies. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 34:1812–1832.

**Wulff, G. and Minarik, M., 1990.** Template imprinted polymers for HPLC separation of racemates, *Journal of Liquid Chromatography*, 13:2987–3000.

**Wulff, G. and Schauhoff, S., 1991.** Racemic resolution of free sugars with macroporous polymers prepared by molecular imprinting. Selectivity dependence on the arrangement of functional groups versus spatial requirements, *Journal of Organic Chemistry*, 56:395–400.

**Wulff, G., 2002.** Enzyme-like catalysis by molecularly imprinted polymers, *Chemical Reviews*, 102:1–27.

**Wulff, G., Gross, T., Schonfeld, R., 1997.** Enzyme models based on molecularly imprinted polymers with strong esterase activity. *Angew. Chem.Int. Edit. Engl.*, 36:1962–1964.

**Wulff, G., Heide, B., Helfmeier, G., 1986.** Molecular recognition through the exact placement of functional groups on rigid matrices via a template approach, *Journal of American Chemical Society*, 108:1089–1091.

**Xu, L., Tang, L.J., Cai, C.B., Wu, H.L., Shen, G.L., Yu, R.Q., Jiang, J.H., 2008.** Chemometric methods for evaluation of chromatographic separation quality from two-way data-A review. *Anal. Chem. Acta*, 613:121-134.

**Yamazaki, T., Yilmaz, E.E., Mosbach, K., Sode, K., 2001.** Towards the use of molecularly imprinted sol-gel films. *Anal. Chim. Acta*, 435:209.

**Yang, G., Tan, L., Shi, Y., Wang, S., Lu, X., Bai, H., Yang, Y., 2009.** Direct determination of uric acid in human serum samples using polypyrrole nanoelectrode ensembles, *Bull. Kor. Chem. Soc.* 30:454–458.

**Yano, K. and Karube, I., 1999.** Molecularly imprinted polymers for biosensor applications, *Trends in Analytical Chemistry*, 18(3):199-204.

**Yao, Y., Yi, B., Xiao, J., Li, Z.H.** Surface plasmon resonance biosensors and its application. *Engineering in Medicine and Biology (IEEE)*, 1043-1046.

**Ye, L., Mosbach, K. 2008.** Molecular imprinting: Synthetic materials as substitutes for biological antibodies and receptors. *Chemistry of Materials*, 20:859–868.

**Ye, L., Weiss, R., Mosbach, K., 2000.** Synthesis and characterization of molecularly imprinted microspheres, *Macromolecules*, 33:8239–8245.

**Yoshimatsu, K., Reimhult, K., Krozer, A., Mosbach, K., Sode, K., Ye, L., 2007.** Uniform molecularly imprinted microspheres and nanoparticles prepared by precipitation polymerization: The control of particle size suitable for different analytical applications, *Analytica Chimica Acta*, 584:112–121.

**Young, N.O., Goldstein, J.S., Block, M.J. 1959.** The motion of bubbles in a vertical temperature gradient. *Journal of Fluid Mechanics*, 6 (3):350- 356.

**Yu, F., Tian, S., Yao, D., Knoll, W. 2004.** Surface plasmon enhanced diffraction for label-free biosensing. *Analytical Chemistry*, 76:3530-3535.

**Yu, J., Zhang, C., Dai, P., Ge, S., 2009.** Highly selective molecular recognition and high throughput detection of melamine based on molecularly imprinted sol-gel film, *Analytica Chimica Acta*, 651(2):209–214.

**Yu, K.Y., Tsukagoshi, K., Maeda, M., Takagi, M., 1992.** Metal ion-imprinted microspheres prepared by reorganization of the coordinating groups on the surface. *Anal. Sci.*, 8:701-703.

**Yue-dong, Y. 1998.** Simultaneous determination of creatine, uric acid, creatinine and hippuric acid in urine by high performance liquid chromatography. *Biomedical Chromatography*, 12:47-49.

**Zang, D., Ge, L., Zhao, P., Yu, J., Huang, J., 2011.** A high throughput and high selective chemiluminescence method for quantification of bifenthrin based on molecularly imprinted film. *Advanced Materials Research*, 306–307, 663–666.

**Zen, J.M. ve Chen, P.J. 1997.** A Selective Voltammetric Method for Uric Acid and Dopamine Detection Using Clay-Modified Electrodes. *Anal. Chem.*, 69:5087-5093.

**Zhang, F., Wang, X., Ai, S., Sun, Z., Wan, Q., Zhu, Z., Xian, Y., Jin, L., Yamamoto, K., 2004.** Immobilization of uricase on ZnO nanorods for a reagentless uric acid biosensor. *Anal. Chim. Acta*. 519:155–160.

**Zhang, L., Xu, C., Song, G., Li, B., 2015.** Self-assembly of L-cysteine–gold nanoparticles as chiral probes for visual recognition of 3,4-dihydroxyphenylalanine enantiomers. *RSC Adv.*, 5:27003-27008.

**Zheng, J., Nagashima, K., Parmiter, D., de la Cruz, J., Patri, A.K., 2011.** SEM X-ray microanalysis of nanoparticles present in tissue or cultured cell thin sections. *Methods Mol Biol*. 697:93-99.

**Zuo, Y., Yang, Y., Zhu, Z., He, W., Aydin, Z. 2011.** Determination of uric acid and creatinine in human urine using hydrophilic interaction chromatography. *Talanta*, 83: 1707–1710.



## ÖZGEÇMİŞ

- Adı Soyadı : Aslı GÖÇENOĞLU SARIKAYA
- Doğum Yeri ve Tarihi : İZMİR, 09.11.1984
- Yabancı Dili : İngilizce
- Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)
- Lise : Aliğa Alp Oğuz Anadolu Lisesi, 2002
- Lisans : Ege Üniversitesi, Biyokimya Bölümü, 2007
- Yüksek Lisans : Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2010
- Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl : Uludağ Üniversitesi, Fen edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, 2010- Devam ediyor
- İletişim (e-posta) : agocenoglu@uludag.edu.tr
- Yayımları : **Kara, A., Osman, B., Göçenoğlu, A., Beşirli, N., 2014.** Kinetic, isothermal, and thermodynamic studies of  $Cr(VI)$  adsorption on L-tryptophan-containing microspheres, *Environmental Engineering Science*, 31(6)
- Göçenoğlu Sarıkaya, A., Osman, B., Kara, A., Pazarlıoğlu, N., 2015.** Adsorption of cinnabarinic acid from culture fluid with magnetic microbeads, *Biomedical Chromatography*, DOI 10.1002/bmc.3514.
- Göçenoğlu, A., Pazarlıoğlu, N., 2014.** Cinnabarinic acid: Enhanced production from *Pycnoporus cinnabarinus*, characterization, structural and functional properties, *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 42(2):281-290.

**Sarıkaya Göçenoğlu, A., Osman, B., Kara, A., 2015.** Evaluation of the effectiveness of microparticle-embedded cryogel system in removal of 17 $\beta$ -estradiol from aqueous solution, *Desalination and Water Treatment*, TDWT-2015-0935.R1, 2015.

