T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

İYON TAYİNİ İÇİN YÜZEY PLAZMON REZONANS ALGILAYICI TASARLANMASI

Zeynep GERDAN

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mukden UĞUR

II. DANIŞMAN
Prof. Dr. Adil DENİZLİ

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Biyomedikal Mühendisliği Programı

İSTANBUL-2021

Bu çalışma, 24.08.2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı, Biyomedikal Mühendisliği Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Mukden UĞURI(Danışman)
Türk-Alman Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü

Prof. Dr. Fırat KAÇAR
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Mühendislik Fakültesi

Prof. Dr. Aydın AKAN
İzmir Ekonomi Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Duygu EKİNCİ
Türk-Alman Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Aysel ERSOY
İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa
Mühendislik Fakültesi

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete'de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa'nın abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Lisansüstü Eğitim Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır..

ÖNSÖZ

Öncelikle, doktora sürecinde göstermiş olduğu rehberliği, motivasyonu ve desteği için değerli hocam Prof. Dr. Mukden UĞUR'a içten şükranlarımı sunuyorum.

Tez araştırmam boyunca, beni kabul eden ve hiç bir desteğini benden esirgemeyen, bilimsel konuşmalarıyla ufkumuza ışık tutarak önderlik eden çok değerli hocamız Prof. Dr. Adil DENİZLİ' ye sonsuz saygı ve şükranlarımı sunuyorum.

Tez çalışmam ve yazma sürecinin her anında benim yanımda olan, mükemmel rehberliği, anlayışı, sabrı, sınırsız desteği, akademik alanda eşsiz rol model olan sevgili hocam Dr. Öğr. Üyesi Yeşeren SAYLAN İNCİ'ye özel ve içten teşekkür ederim.

Sevgili ailem, sonsuz sevginiz, hayatım boyunca ilham verici sözleriniz, cesaretlendirmeleriniz, sabrınız ve anlayışınız için size minnettarım. Sizler benim tek vazgeçilmezimsiniz.

Temmuz 2021 Zeynep GERDAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ ..... **iv**
İÇİNDEKİLER ..... **v**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **viii**
TABLO LİSTESİ ..... **xi**
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... **xii**
ÖZET ..... **xiv**
SUMMARY ..... **xvi**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL KISIMLAR **3**
2.1. BAKIR 3
2.1.1. Wilson Hastalığı 3
2.2. MOLEKÜLER BASKILAMA YÖNTEMİ 7
2.2.1. Tarihçe 7
2.2.2. Moleküler Baskılanmış Polimerler 7
2.2.3. Moleküler Baskılama Yöntemi Basamakları 7
2.2.4. Moleküler Baskılama Yöntemleri 10
2.2.4.1. Kovalent Baskılama 10
2.2.4.2. Kovalent Olmayan Baskılama 10
2.2.5. Moleküler Baskılanmış Polimerlerinin Sentezinde Kullanılan Bileşenler 11
2.2.5.1. Kalıp Molekül 11
2.2.5.2. Fonksiyonel Monomer 12
2.2.5.3. Çapraz Bağlayıcılar 13
2.2.5.4. Çözücüler 15
2.2.5.5. Başlatıcılar 15
2.3. SENSÖRLER 16
2.3.1. Elektrokimyasal Sensörler 17
2.3.2. Piezoelektrik Sensörler 18
2.3.3. Optik Sensörler 18
2.4. YÜZEY PLAZMON REZONANS 19
2.4.1.Yüzey Plazmonu 19

2.4.2. SPR Sensörler 21
3. MALZEME VE YÖNTEM 23
3.1. KİMYASALLAR 23
3.2. FONKSİYONEL MONOMERİN SENTEZİ 24
3.3. MAC-Cu(II) ÖN-KOMPLEKSİNİN OLUŞTURULMASI 24
3.4. SPR SENSÖR YÜZEYİNİN MODİFİKASYONU 25
3.5. Cu(II)-BASKILANMIŞ SPR SENSÖRÜNÜN HAZIRLANMASI 26
3.6. Cu(II)-BASKILANMAMIŞ SPR SENSÖRÜN HAZIRLANMASI 27
3.7. SPR SENSÖRLERİNİN KARAKTERİZASYONU 28
3.7.1. FTIR-ATR Analizi 28
3.7.2. Elipsometre Analizi 29
3.7.3. Temas Açısı Analizi 30
3.7.4. AFM Analizi 30
3.8. Cu(II)-BASKILANMIŞ SPR SENSÖR İLE KİNETİK ANALİZLER 31
3.8.1. pH Etkisi 32
3.8.2. Derişim Etkisi 33
3.8.3. Tekrar Kullanılabilirlik Analizleri 33
3.8.4. Seçicilik Analizleri 34
3.8.5. Raf Ömrü Analizleri 35
3.8.6. Yapay Örnek Analizleri 35
3.8.7. Adsorpsiyon İzoterm Modelleri 36
3.8.7.1. Denge ve Bağlanma Analizi 36
3.8.7.2. Adsorpsiyon İzoterm Modelleri 37
4. BULGULAR 38
4.1. MAC MONOMERİNİN KARAKTERİZASYONU 38
4.1.1. FTIR-ATR Analizi 38
4.2. MAC-Cu(II) ÖN-KOMPLEKSİNİN KARAKTERİZASYONU 39
4.3. SPR SENSÖRLERİNİN KARAKTERİZASYONU 39
4.3.1. FTIR-ATR Analizi 39
4.3.2. Elipsometre Analizi 41
4.3.3. Temas Açısı Analizleri 42
4.3.4. AFM Analizleri 44
4.4. Cu(II)-BASKILANMIŞ SPR SENSÖR İLE KİNETİK ANALİZLER 46
4.4.1. pH Etkisi 46

4.4.2. Derişim Etkisi 47
4.4.3. Tekrar Kullanabilirlik Analizleri 48
4.4.4. Seçicilik Analizleri 50
4.4.5. Raf Ömrü Analizleri 53
4.4.6. Yapay Örnek Analizleri 54
4.5. SPR SENSÖRÜN MATEMATİKSEL ANALİZLERİ 55
4.5.1. Denge ve Bağlanma Kinetik Analizleri 55
4.5.2. Adsorpsiyon İzoterm Modelleri 56
4.6. LİTERATÜR KARŞILAŞTIRMASI 58
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 61
KAYNAKLAR 65
EKLER 86
ÖZGEÇMİŞ 87

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: ATP7B proteinin şematik şekli 4

Şekil 2.2: Moleküler baskılama yönteminin basamakları 8

Şekil 2.3: Kovalent ve kovalent olmayan moleküler baskılama 11

Şekil 2.4: Tipik bir biyosensörün elemanları ve seçilmiş bileşenleri 17

Şekil 2.5: Dielektrik sınırlarda meydana gelen toplam iç kırınım 20

Şekil 2.6: SPR sensör sensorgramında gerçekleşen fazlar 22

Şekil 3.1: N-metakriloil-(L)-sistein (MAC) monomerinin sentez tepkimesi 24

Şekil 3.2: MAC ile Cu (II) iyonu arasındaki olası etkileşim 25

Şekil 3.3: Altın sensör yüzeyin optik görüntüsü 26

Şekil 3.4: Spin kaplama sisteminin ve UV lambasının optik görüntüleri 27

Şekil 3.5: Cu(II)-baskılanmış SPR sensörünün hazırlanmasının şematik gösterimi 27

Şekil 3.6: FTIR-ATR spektrofotometrenin optik görüntüsü 29

Şekil 3.7: Elipsometre cihazının optik görüntüsü 29

Şekil 3.8: Temas açısı cihazının optik görüntüsü 30

Şekil 3.9: AFM cihazının optik görüntüsü 31

Şekil 3.10: SPR imager II cihazının optik görüntüsü 32

Şekil 4.1: MAC monomerinin FTIR-ATR spektrumu 38

Şekil 4.2: MAC-Cu (II) ön-komplekslerinin spektrum grafikleri 39

Şekil 4.3: Cu (II)-baskılanmış (MIP) SPR sensörün FTIR-ATR spektrumu 40

Şekil 4.4: Baskılanmamış (NIP) SPR sensör yüzeyinin FTIR-ATR spektrumu 40

Şekil 4.5: Alil merkaptan ile modifiye edilmiş yüzeyin elipsometre görüntüsü 41

Şekil 4.6: Cu(II)-baskılanmış SPR sensör yüzeyinin elipsometre görüntüsü 41

Şekil 4.7: Baskılanmamış SPR sensör yüzeyinin elipsometre görüntüsü 42

Şekil 4.8: Modifiye edilmemiş boş yüzeyin temas açısı görüntüsü 43

Şekil 4.9: Alil merkaptan ile modifiye edilmiş yüzeyin temas açısı görüntüsü 43

Şekil 4.10: Cu(II)-baskılanmış SPR sensör yüzeyinin temas açısı görüntüsü 43

Şekil 4.11: Baskılanmamış SPR sensör yüzeyinin temas açısı görüntüsü 44

Şekil 4.12: Modifiye edilmemiş boş yüzeyin iki ve üç boyutlu AFM görüntüleri 44

Şekil 4.13: Alil merkaptan ile modifiye edilmiş yüzeyin iki ve üç boyutlu AFM görüntüleri 45

Şekil 4.14: Cu(II)-baskılanmış SPR sensör yüzeyinin iki ve üç boyutlu AFM görüntüleri 45

Şekil 4.15: Baskılanmamış SPR sensör yüzeyinin iki ve üç boyutlu AFM görüntüleri 45

Şekil 4.16: Cu(II)-baskılanmış SPR sensör ile farklı pH çözeltilerinde Cu(II) iyonu tayini. Deney koşulları: $c_{Cu(II)}$ = 4 µM, T = 25°C, Akış hızı = 500 µL/dk 46

Şekil 4.17: Cu(II)-baskılanmış SPR sensör ile farklı pH çözeltilerinde Cu(II) iyonu tayini 47

Şekil 4.18: Cu(II)-baskılanmış SPR sensör ile farklı derişimli çözeltilerde Cu(II) iyonu tayini. Deney koşulları: pH = 8.0, T = 25°C, Akış hızı = 500 µL/dk 48

Şekil 4.19: Cu(II)-baskılanmış SPR sensörün Cu(II) iyonu tayinindeki kalibrasyon grafiği 48

Şekil 4.20: Cu (II)-baskılanmış SPR sensörün tekrar kullanımı. Deney koşulları: $c_{Cu(II)}$ = 4 µM, pH = 8.0, T = 25°C, Akış hızı = 500 µL/dk. 49

Şekil 4.21: Cu (II)-baskılanmış SPR sensörün tekrar kullanımı. Deney koşulları: $c_{Cu(II)}$ = 3, 4, 5 µ pH= 8.0, T = 25°C, Akış hızı = 500 µL/dk. 50

Şekil 4.22. Cu(II)-baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensörlerin Cu(II) iyon tayini. Deney koşulları: $c_{Cu(II)}$ = 5 µM, pH = 8.0, T = 25°C, Akış hızı = 500 µL/dk. 51

Şekil 4.23: Cu(II)-baskılanmış SPR sensörün yarışmacı iyonlar ile seçicilik analizi. Deney koşulları: c_{iyon} = 5 µM, pH = 8.0, T = 25°C, Akış hızı = 500 µL/dk. 52

Şekil 4.24: Baskılanmamış SPR sensörün yarışmacı iyonlar ile seçicilik analizi. Deney koşulları: c_{iyon} = 5 µM, pH = 8.0, T = 25°C, Akış hızı = 500 µL/dk. 52

Şekil 4.25: Cu (II)-baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensörlerin seçicilik analizleri 53

Şekil 4.26: Cu(II)-baskılanmış SPR sensörün raf ömrü analizi. Deney koşulları: $c_{Cu(II)}$ = 4 µM, pH = 8.0, T = 25°C, Akış hızı = 500 µL/dk. 54

Şekil 4.27: Cu(II)-baskılanmış SPR sensörün yapay örnek analizi. Deney koşulları: $c_{Cu(II)}$ = 5 µM, pH = 8.0, T = 25°C, Akış hızı = 500 µL/dk. 55

Şekil 4.28: Denge analiz (Scatchard) yaklaşımı 56

Şekil 4.29: Bağlanma kinetik yaklaşımı 56

Şekil 4.30: Langmuir adsorpsiyon izoterm modelleri 57

Şekil 4.31: Freundlich adsorpsiyon izoterm modeller 58

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Wilson hastalığının klinik bulguları 5

Tablo 2.2: Doğal olarak bulunan biyomoleküller ile moleküler baskılama yöntemi ile hazırlanan polimerlerin özelliklerinin karşılaştırılması 9

Tablo 2.3: Sık kullanılan fonksiyonel monomerler 12

Tablo 2.4: Yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcılar 14

Tablo 2.5: Sık kullanılan başlatıcılar 15

Tablo 3.1: MAC-Cu (II) ön-kompleksinin hazırlanma oranları 25

Tablo 4.1: Seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları 51

Tablo 4.2: Kinetik sabitleri 58

Tablo 4.3: Bakır tayininde kullanılan sistemler ile bu çalışmanın karşılaştırılması 59

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
mg	: Miligram
mg/kg	: Miligram/kilogram
µg	: Mikrogram
µg/dL	: Mikrogram/desilitre
g	: Gram
µM	: Mikromolar
°C	: Celcius derece
nm	: Nanometre
µg/gün	: Mikrogram/gün
µL	: Mikrolitre
cm	: Santimetre
mmol	: Milimolar
W	: Watt

Kısaltmalar	Açıklama
ATP	: Adenozin trifosfat
AAS	: Atomik absorpsiyon spektrometresi
ATR	: Zayıflatılmış toplam yansıma
AIBN	: 2,2′-azobis(2-metilpropiyonitril)
AFM	: Atomik kuvvet mikroskobu
Cu (II)	: Bakır
Cd (II)	: Kadmiyum
DNA	: Deoksiribonükleik asit
Fe (II)	: Demir
EEG	: Elektroensefalografi
EM	: Elektromanyetik
EGDMA	: Etilen glikol dimetakrilat
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
FTIR-ATR	: Fourier dönüşümlü kızılötesi-zayıflatılmış toplam yansıma

HPLC : Yüksek preformanslı sıvı kromotografisi
HEMA : 2-hidroksi etil metakrilat
ICP-OES : İndüktif eşleşmiş plazma optik emüsyon spektrometresi
Li (II) : Lidyum
LOD : En düşük tayin limiti
LOQ : En düşük miktar limiti
MR : Manyetik rezonans
MAC : N-metakroil-l-sistein metil ester
MIP : Moleküler baskılanmış polimer
NIP : Baskılanmamış polimer
Ni (II) : Nikel
Pb (II) : Kurşun
SPR : Yüzey plazmon rezonans
SPP : Yüzey plazmon polariton
TM : Enine manyetik
TIR : Toplam iç yansıma
UV : Ultraviyole
QCM : Kuartz kristal mikroterazi
WH : Wilson hastalığı

ÖZET

İYON TAYİNİ İÇİN YÜZEY PLAZMON REZONANS ALGILAYICI TASARLANMASI

DOKTORA TEZİ

Zeynep GERDAN

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Mukden UĞUR

II. Danışman : Prof. Dr. Adil DENİZLİ

Bakır insan vücudunda birçok enzimatik reaksiyonlar için hayati önem taşımaktadır. Eser miktarda olması ve insan vücudu için bu kadar önemli olmasına rağmen vücutta eksikliği veya fazlalığı birçok organda ciddi problemlere yol açmaktadır. Bakırın fazla miktarda dolaşımda olması Alzhemier ve Wilson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklara yol açmaktadır. Wilson hastalığı (WH) ya da hepatolentiküler dejenerasyon, 13. kromozomda bulunan ATP7B genindeki bir bozukluktan gelişen otozomal resesif geçişli bir hastalıktır. Bakırın aşırı birikmesine neden olan bu metabolizma bozukluğu, karaciğer, beyin, göz, böbrek gibi birçok organda ciddi sorunlara neden olmaktadır. Bu denli önemli olan bakırın tespiti için çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Ancak bu yöntemlerin hazırlanmasının zorlu, karmaşık ve pahalı olması araştırmaların yönünü başka yöntemlere kaydırmıştır. Son 20 yılda en çok tercih edilen yüzey modifikasyon tekniklerinden olan moleküler baskılama tekniği, bakırın tespiti için kullanılmaktadır. Moleküler baskılama tekniği, monomer ile kalıp molekül arasındaki etkileşimin gücüne dayanmaktadır. Bu yöntem, yüksek seçicilik ve hassasiyet, kimyasal ve fiziksel dayanıklılık, düşük maliyet ve tekrar kullanılabilirlik gibi eşsiz avantajlar sunmaktadır. Yüzey plazmon rezonans, metal film ile dielektrik ortam arasındaki serbest elektronların salınımları ile ilişkilidir. Yüzey plazmon rezonans temelli sensörler, optik sensör

teknolojisinde kullanım alanı en geniş yelpazeye sahip sensörlerdir. Yüzey plazmon rezonans sensörler, diğer hassas algılama yöntemleri ile karşılaştırıldığında, gerçek zamanlı ve etiketsiz analiz, yüksek algılama alanı, kısa analiz süresi ve düşük maliyetli analiz gibi bir çok avantaja sahiptir.

Bu çalışmada, bakır iyonu (Cu(II)) tayini için moleküler baskılanmış yüzey plazmon rezonans (SPR) sensörü tasarlanmıştır. İlk aşamada fonksiyonel monomer ve kalıp molekül ile (MAC-Cu(II)) ön-kompleks hazırlanmıştır. Hazırlanan bu ön-komplekse 2-hidroksi etil metakrilat (HEMA, $C_6H_{10}O_3$) monomeri ve etilen glikol dimetakrilat (EGDMA, $C_{10}H_{14}O_4$) çapraz bağlayıcısı eklenerek monomer karışımı elde edilmiştir. 2,2′-Azobis(2-metilpropiyonitril) (AIBN, $C_8H_{12}N_4$) başlatıcısı eklendikten sonra daha önceden alillenmiş SPR sensör yüzeyi üzerine bu monomer karışımı damlatılmış ve spin kaplama cihazı yardımıyla homojen bir şekilde kaplanmıştır. Daha sonra sensör yüzeyindeki monomer karışımının fotopolimerizasyon yöntemi ile polimerleşmesi sağlanmıştır. Kontrol ve karşılaştırma deneyleri için aynı protokol ile kalıp molekül olmadan baskılanmamış SPR sensör hazırlanmıştır. Hazırlanan SPR sensörler, Fourier dönüşümlü kızılötesi-zayıflatılmış toplam yansıma spektrofotometresi, elipsometre, atomik kuvvet mikroskobu ve temas açısı ölçümleri ile karakterize edilmiştir. Farklı Cu(II) derişimleri kullanılarak hazırlanan örnek çözeltiler ile Cu(II)-baskılanmış SPR sensörünün kinetik, seçicilik, tekrar kullanılabilirlik ve yapay örnek analizleri yapılmıştır. Tüm bu analizlerin sonucunda matematiksel hesaplamalar gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlara göre Cu(II)-baskılanmış SPR sensörün 0,04 µM-5 µM derişim aralığında %96 doğrulukta ölçüm yapabildiği görülmüştür. En düşük tayin limiti (LOD) ve en düşük miktar limiti (LOQ) 0,027 µM ve 0,09 µM olarak hesaplanmıştır. Cu(II)-baskılanmış SPR sensörün yüksek seçicilikte ve tekrarlanabilir düzeyde ölçüm yapabildiği gösterilmiştir. Son olarak, Cu(II)-baskılanmış SPR sensörün sadece sulu ortamda değil plazma ve idrar gibi karmaşık bir ortamda da başarılı bir şekilde çalıştığı gösterilmiştir.

Temmuz 2021 104 sayfa.

Anahtar kelimeler: Sensör, Bakır, Moleküler Baskılama, Yüzey Plazmon Rezonans

SUMMARY

SURFACE PLASMON RESONANCE SENSOR DESIGN FOR ION DETECTION

Ph.D. THESIS

Zeynep GERDAN

Istanbul University-Cerrahpasa

Institute of Graduate Studies

Department of Biomedical Engineering

Supervisor : Prof. Dr. Mukden UĞUR

Co-Supervisor : Prof. Dr. Adil DENİZLİ

Copper is vital importance for many enzymatic reactions in the human body. Although it is a trace amount and is important for the human body, its deficiency or excess in the body causes serious problems in many organs. A large amount of copper in the circulation leads to neurodegenerative diseases such as Alzheimer's and Wilson's disease. Wilson's disease (WD) or hepatolenticular degeneration is an autosomal recessive disease that develops from a defect in the ATP7B gene on chromosome 13. This metabolism disorder, which causes excessive accumulation of copper, causes severe problems in many organs such as the liver, brain, eye, and kidney. There are various methods to detect copper however, these methods are difficult to prepare, complex, and expensive and hence this fact has shifted the direction of the research to other methods. The molecular imprinting technique, one of the most preferred surface modification techniques in the last 20 years, is used for the detection of copper. The molecular imprinting technique is based on the strength of the interaction between the monomer and the template molecule. This method offers unique advantages such as high selectivity, high sensitivity, chemical, and physical resistance, low cost, and reusability.

Surface plasmon resonance is associated with the oscillations of free electrons between the metal film and the dielectric medium. Surface plasmon resonance-based sensors are used with the widest range in optical sensor technology. Compared to other sensitive detection methods, surface plasmon resonance sensors have many advantages such as real-time and label-free analysis, high detection area, short analysis time, and low-cost analysis.

In this study, a molecularly imprinted surface plasmon resonance (SPR) sensor was designed for copper ion (Cu(II)) determination. In the first step, pre-complex was prepared with functional monomer and template molecule (MAC-Cu(II)). The monomer mixture was obtained by adding 2-hydroxy ethyl methacrylate (HEMA, $C_6H_{10}O_3$) monomer and ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA, $C_{10}H_{14}O_4$) crosslinker to this pre-complex. After 2,2′-azobis (2-methylpropionitrile) (AIBN, $C_8H_{12}N_4$) initiator addition, this monomer mixture was dropped onto the surface of the previously allylated SPR sensor and coated homogeneously with the help of the spin coating device. Then, the polymerization of the monomer mixture on the sensor surface was achieved by the photopolymerization method. For the control and comparison experiments, a non-imprinted SPR sensor without template molecule was prepared with the same protocol. The prepared SPR sensors were characterized by Fourier transform infrared-attenuated total reflection spectrophotometer, ellipsometer, atomic force microscope, and contact angle measurements. Kinetic, selectivity, reusability, and artificial sample analyzes of Cu(II)-imprinted SPR sensor was performed with sample solutions prepared using different Cu(II) concentrations. As a result of all these analyze, mathematical calculations were made and according to the results, it was seen that the Cu(II)-imprinted SPR sensor can measure with 96% accuracy in the concentration range of 0.04 μM-5 μM. The lowest limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) values were calculated as 0.027 μM and 0.09 μM. It has been shown that the Cu(II)-imprinted SPR sensor can measure with high selectivity and repeatability. Finally, the Cu(II)-imprinted SPR sensor has been shown to work successfully not only in an aqueous medium but also in a complex medium such as plasma and urine

July 2021, 104 pages.

Keywords: Sensor, Copper, Molecular Imprinting, Surface Plasmon Resonance

1. GİRİŞ

Bakır, insan fizyolojisinde birçok önemli enzimatik reaksiyonlarda rol oynayan, eser miktarda bulunan bir elementtir [1, 2]. Bakır mitokondriyal sitokrom c oksidaz ve süperoksit dismutaz gibi enzimlerin kofaktörü olarak işlev görmektedir.İnsan vücudu için bu kadar önemli olan bakırın dokularda fazla miktarda bulunması toksik etki yaratmakta ve karaciğer, böbrek, kornea ve merkezi sinir siteminde hasarlara neden olmaktadır [3, 4]. Bakırın fazla miktarda dolaşımda olması, Alzheimer, Wilson hastalığı vb. yol açmaktadır [5]. Ayrıca bu hastalıklara ek olarak meme, gastrointestinal gibi kanser türlerinde bakır derişimi, sağlıklı bireylerdeki bakır derişimlerine oranla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur [6]. Bakırın dokularda fazla birikimine neden olan Wilson hastalığı (WH), hepatolentiküler dejeneresyon olarak da bilinen genetik otozomal resesif bir hastalıktır. WH, 13. kromozomda bulunan bakır taşıyan ATPase2'yi kodlayan ATP7B genindeki bir bozukluktan meydana gelmektedir [7, 8]. WH'nin erken tanı ve tedavisi önemlidir. WH tanısı için birçok yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemler, serum seruloplazmin değeri, idrar bakır seviyesi, radyolojik yöntemler ve genetik çalışmalardır [9-11].

Sensörler, algılanan verileri, dönüştürücüler vasıtasıyla elektrik sinyaline dönüştüren analitik cihazlardır. Sensörlerde kullanılan dönüştürücü tiplerine göre sınıflandırma yapılabilmektedir. Dönüştürücüsüne göre sensörler, elektrokimyasal, piezoelektrik ve optik sensörler olmak üzere üç ana başlık altında toplanmaktadır [12]. Optik sensörler, yüksek hassasiyet, doğruluk, hızlı cevap, özgüllük, hızlı tepki süresi ve düşük maliyet gibi avantajlar sunmaktadır [13, 14]. Optik temelli yüzey plazmon rezonans, SPR, sensörü bir metalin (genellikle altın) ara yüzeyine yakın ortamdaki kırılma indeksinin anlık değişiklikleri ölçen oldukça duyarlı bir cihazdır [15]. SPR sensörlerinde moleküllerin etkileşimlerini incelerken herhangi bir etiketlemeye ihtiyaç duyulmadan gerçek zamanlı analizler yapmak mümkündür [16, 17]. SPR sensörler yüksek hassasiyet ve güvenirlik, düşük tayin limiti, gerçek zamanlı ölçümler gibi avantajlardan dolayı geniş uygulama yelpazesine sahiptir [18, 19]. SPR sensörler ile avantajlarından faydalanarak daha yüksek hassasiyet ve daha düşük tayin limiti elde etmek için, SPR sensörlere farklı sistemler entegre edilerek araştırmalar son yıllarda hızını arttırarak devam etmektedir [20, 21].

Moleküler baskılama yöntemi, sentetik bir polimer matriks içerisinde, kalıp moleküle spesifik boşluklar oluşturma temeline dayanmaktadır. Bu boşluklar, kalıp molekülü yüksek tanıma özelliğine sahiptirler. Polimer matriks içerisinde oluşturulan bu akıllı ve tamamlayıcı boşluklar, kalıp molekülün şekil, boyut ve yüzey kimyası olarak eşleniğidir. Elde edilen polimer, kalıp molekülün hem kimyasal hem de fiziksel özelliklerini tanır. Moleküler baskılama yöntemi, ilk olarak kalıp molekül ile fonksiyonel monomer bir kompleks oluşturur [22, 23]. Ön-kompleksleşme işleminden meydana gelen kalıp molekül-fonksiyonel monomer kompleksine, çapraz bağlayıcı ve başlatıcı eklenerek polimerizasyon işlemi gerçekleştirilir. Uygun desorpsiyon ajanı kullanarak kalıp molekülün uzaklaştırılması sonucu hedef analit ile yüksek afinite sergileyen boş ve spesifik tanıma alanları oluşturulur [24]. Moleküler baskılama tekniği, düşük maliyet, tekrar kullanılabilirlik, termal, mekanik ve kimyasal kararlılık, uzun raf ömrü, çok çeşitli analitlerin üretilmesi gibi birçok avantajı vardır. Moleküler baskılanmış polimerler, pH, yüksek basınç, yüksek sıcaklık ve, organik çözücülere karşı dirençli bir yapı göstermektedir [25, 26].

Bu doktora tez çalışması kapsamında, moleküler baskılama temelli bir sensör algılayıcı oluşturmak için SPR sensör yüzeyine yerleştirilecek Cu(II) iyonlarını tanıma özelliklerine sahip, kararlı, ucuz ve ince nanofilm hazırlanmıştır. Bu amaçla hazırlanan monomer karışımı alil merkaptan ile modifiye edilmiş SPR sensör yüzeyi üzerine damlatılmış ve homojen bir şekilde kaplanarak fotopolimerizasyon yöntemi ile polimerleşmesi sağlanmıştır. Sensör yüzeyinin çeşitli karakterizasyon analizlerinden sonra, farklı Cu(II) derişimlerinde örnek çözeltiler ile Cu(II)-baskılanmış SPR sensörünün kinetik analizleri, tekrar kullanılabilirlik analizleri, yapay örneklerin analizleri ve seçicilik analizleri yapılmıştır. Yapılan deneyler sonunda ulaşılan verilere göre Cu(II)-baskılanmış SPR sensörün 0,04 µM-5 µM derişim aralığında %96 doğrulukta ölçüm yapabildiği görülmüştür. En düşük tayin limiti 0,027 µM olarak hesaplanmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. BAKIR

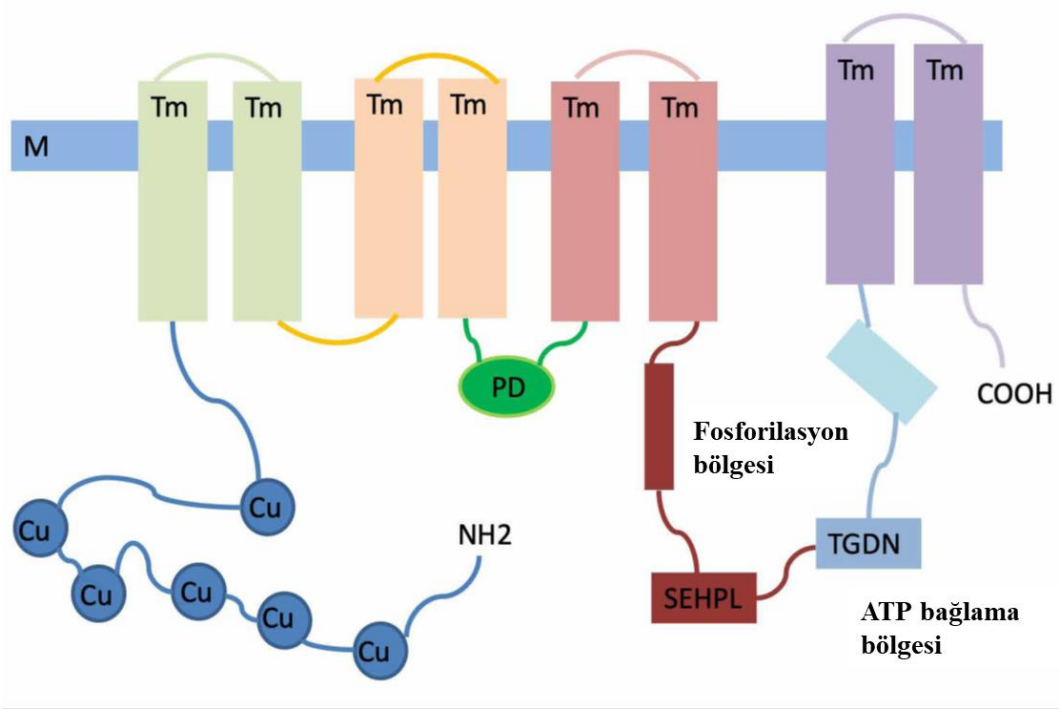
Bakır (Cu(II)) doğada ve insan vücudunda birçok önemli fonksiyonlara sahiptir [27]. Bakır, enzimatik reaksiyonlara katılan birçok protein için kofaktör görevi gören ve insan vücudu için vazgeçilmez olan temel mikro besindir [28, 29]. Bakır insan vücudunda en çok bulunan ve üçüncü gerekli olan iz metal elementtir. Fakat eser miktarda olmasına rağmen insan vücudunda birçok metabolik süreçte rol oynar. Demirin emilmesi ve ferroheme sentezinde vazgeçilmez bir katalizördür [28]. Bakır insan vücudu için normal şartlarda toksit etki yapmamaktadır ancak bakırın fazlalığı ve eksikliği, çeşitli zararlara neden olabilir. Normal fizyolojik süreç için bakırın eser miktarda olması yeterli olmakla birlikte, günlük alınması gereken dozun üzerinde bakır alımı, insan sağlığı için olumsuz sonuçlar doğurmaktadır [30, 31].

Bakır iyonlarının düzenlediği demir metabolizmasının yanı sıra birçok hastalık bakır elementinin eksikliğine veya uzun süre maruz kalınmasına bağlı olarak bakır derişimlerinin artması ile meydana gelmektedir. İnsan için toksik olmayan bakıra uzun süre maruz kalmak ishal, kusma, baş dönmesi, mide ağrısı gibi şikayetlere yol açmaktadır [31]. Uzun süre bakıra maruz kalma sonucunda vücutta biriken serbest bakır iyonları, redoks aktivitesi nedeniyle reaktif oksijen türleri üreterek lipitlere, DNA ve proteinlere zarar verirler. Serbest oksijen türleri, hücreler için potansiyel toksik etki göstermektedir [32, 33]. Bakır hemoostazındaki bozukluğa bağlı olarak vücutta birçok hastalık gelişebilir. Cu(II)'nin derişiminin artması Menkes, Wilson hastalığının da dahil olduğu genetik hastalıklar, nörodejeneratif hastalık olan Alzheimer, Parkinson [34] ve Huntington hastalığı, akut hepatik böbrek yetmezliği gibi birçok olumsuz sağlık problemlerine neden olur [33, 35, 36]. Sağlıklı bir bireyin günlük alması gereken bakır 0,5-2,0 mg'dır [37]. Vücudun tolere edebileceği maksimum bakır derişimi ise 0,5 mg/kg'dır [38].

2.1.1. Wilson Hastalığı

Bakır metabolizmasının otozomal resesif bir bozukluğu olan Wilson hastalığı 13. kromozomda lokalize metabolik hastalıktır [39]. Bu kromozomdaki ATP7B proteinini

kodlayan genlerde mutasyon meydana gelmektedir [40]. Bu mutasyon sonucu ilk olarak karaciğer etkilenerek bakır metabolizması bozulur ve safra ile bakır yeterli olarak vücuttan uzaklaştırılamaz [41, 42]. ATP7B geni bulunduğu 13. kromozomun uzun kolundan kodlanmıştır. Bu gen 21 eksonludur ve 1465 aminoasitlik bir transmembran proteini olan ATP7B proteinini kodlar [43]. WH hastalarında ATP7B geninin 17 eksonuna dağılmış çok sayıda mutasyon tespit edilmiştir [44]. ATP7B geninde meydana gelen mutasyonlar toplumlara göre farklılık göstermektedir. Avrupa'da rastlanan mutasyan türü 1069. aminoasitte bulunan glutamatın ve histidinin yer değiştirmesi ile meydana gelmektedir. R778L mutasyonu Güneydoğu Asya'da sık olarak görülmektedir. Hint toplumunda ise bu iki mutasyon türüne rastlanmamaktadır [43]. ATP7B proteini Şekil 2.1'de gösterildiği gibi 8 transmembran protein, 6 bakır bağlayan bölge, ATP bağlama bölgesi, fosforilasyon bölgesinden oluşmaktadır.



Şekil 2.1: ATP7B proteinin şematik şekli [1].

Wilson hastalığı (WH) birden fazla sistemde bozukluklar meydana getirmektedir [45, 46]. Wilson hastalığının en yaygın klinik bulguları arasında vücuttaki bakır derişiminin artmasına bağlı olarak ilk etkilenen organ olan karaciğerin sirozuna yol açabilen hepatik hasar gösterilebilir. Diğer bulgular ise Tablo 2.1'de gösterildiği gibi gözlerde Kayser-Fleischer halkaları [47], akut hemoliz atakları, nörodejenaratif sorunlardır [48]. Bakır seviyelerinin

belirli bir homeostaz da sürdürülmesi için, gıdalardan ve içme sularından alınan bakır ince bağırsak epiteli hücrelerinde emilerek ya metallothioneine bağlanır ya da aminoasitlerle birleşerek portal venöz dolaşıma katılır. Portal venöz dolaşım ile sindirim sisteminden aldığı bakırı peptitler, albümin ve histidin gibi aminoasitlerle kompleks oluşturarak ve karaciğere gelmesi ve karaciğerden safraya atılması gerekir [49]. Karaciğer, vücuttaki bakırın dengesinin ayarlanmasından sorumlu başlıca organdır [50]. Beyin, karaciğer ve diğer dokularda aşırı bakır birikmesine neden olan bozulmuş ATP7B proteini, mitokondri zarına yerleşerek, bakırın fazla birikip toksit etki etmesini önler [51].

Tablo 2.1: Wilson hastalığının klinik bulguları [1].

Karaciğer	Karaciğer enziminin yükselmesi Akut hepatit Akut karaciğer yetmezliği Karaciğer sirozu
Göz	Kayser-Fleischer Ayçiçeği kataraktı
Beyin	Duygu durum bozukluğu Kişilik bozukluğu Psikoz Kognitif bozukluk İstemsiz hareket Konuşma bozuklukları, Yürüyüş ve denge bozukluğu
Kemikler	Osteoporoz Kondrokalsinoz Kireçlenme Eklem ağrısı
Kan	Trombositopeni Hemolitik anemi Lökopeni
Diğer	Kardiyomiyopati Miyopati Kardiak aritmi Hiperkalsiüri

Karaciğer hücreleri, dışarıdan aldığı bakıra ek olarak dolaşımındaki seruloplazminden de bakır almaktadır [49]. Bakırın %95'i serumda seruloplazmine bağlı olarak, geri kalan kısmı ise albümin, histidin gibi aminoasitlere bağlanarak dolaşımla taşınır [50]. Karaciğere gelen bakır, seruloplazmin içine ATP7B proteini tarafından dahil edilerek dolaşıma salınır. Seruloplazmin, plazmada bulunan ve en önemli bakır oksidaz enzimi olan mavi renkli kuproproteindir. Ferro halde bulunan toksik demiri, toksik olmayan ferri demir haline çevirir. Daha sonra oksitleyip hemoglobin sentezi için gerekli dokulara transferrin ile birleştirip taşımasını sağlar [51]. ATP7B geni bakırın seruloplazmine bağlanmasını ve vücutta fazla bakırın safra yolu ile daha sonra atılması için, safra kanalikülüne verilmesi ve golgi ağı içindeki aposeruloplazmine bakır vermekle görevlidir. Bu proteinde meydana gelen mutasyonlardan dolayı mitokondride bakır miktarı artar. Vücuttan atılması için safraya giden bakır miktarı azalır, bu nedenle de karaciğerde bakır miktarı artmasına neden olur [50]. Bakırın insan sağlığına ve çevreye verdiği ciddi zararlardan dolayı tespiti önemli konulardan biridir [52]. İz metallerin biyoloji çevresel ve jeolojik örneklerden düşük derişimlerde tespit edilebilmesi için birçok yöntem kullanılmaktadır. Bakır tespitinde, atomik absorpsiyon spektrometresi (AAS) [53], anodik sıyırma voltametresi [54, 55], yüksek preformanslı sıvı kromotografisi (HPLC), indüktif eşleşmiş plazma optik emüsyon spektrometresi (ICP-OES) [56], indüktüf olarak eşleşmiş plazma kütle spektrometresi yaygın olarak kullanılmaktadır [33, 57, 58]. Ancak kullanılan bu yöntemlerin güvenilir, doğru ve hızlı olması gibi avantajlarının yanı sıra pahalı ve karmaşık işlemler gibi aşılması gereken dezavantajları vardır [57].

Wilson hastalığı, gelişiminin ilk evrelerinde ve geniş kapsamlı doku hasarı meydana gelmeden önce teşhis edilmezse potansiyel olarak ölümcül olabilir [59]. Wilson hastalığının tespiti için seruloplazmin seviyesi, idrarda bakır seviyesi, karaciğer biyopsisi [60] ve manyetik rezonans (MR) [61] kullanılır. Kandaki seruloplamin seviyesinin 20 mg/dL'den az olması kişinin hasta olduğunun belirtisi olabilir. Seruloplazmin referans değerleri 20 mg/dL ile 40 mg/dL arasındadır. İdrar seviyesi 100 µg/gün'den fazla olmamalıdır [62]. Bu iki laboratuvar bulgusu teşhis için genellikle yeterlidir. Altın standart olarak kullanılan bir yöntem ise karaciğer biyopsisidir. Bu en doğru testtir fakat hastanın konforu açısından zor bir süreçtir. 1 gram kuru karaciğer dokusunda sağlıklı bireylerde bakır miktarı 100 µg'ın altında olmaktadır. Fakat Wilson hastası olan bireylerde karaciğerdeki bakır miktarı 250 µg'dan fazladır [50, 63]. Wilson hastalığına bağlı olarak gelişen nörolojik semptomların teşhisi için

noninvaziv teknik olan MR görüntüleme ve EEG görüntüleme kullanılmaktadır. MR, T2 ortamında bazal gangliyonlarda hipertensiteler göstermelidir [64]. Bakırın tespiti için maliyeti düşük, hassas, tekrarlanabilir ve hızlı analitik metotların geliştirilmesi gerekmektedir [57].

2.2. MOLEKÜLER BASKILAMA YÖNTEMİ

2.2.1. Tarihçe

Moleküler baskılama yöntemine ilgi yeni olsa da moleküler etkileşim kavramı oldukça eski olup, 1972 yılında Wulff ve Kloz tarafından önceden belirlenmiş ligand seçiciliğine sahip organik polimerler hazırlamıştır. Yapılan bu bağımsız çalışma moleküler baskılama teknolojisinin başlangıcı sayılmaktadır. Fakat her ne kadar Wulff ve arkadaşları tarafından yapılan bu çalışma ilk moleküler baskılama olarak kabul edilmiş olsa da aslında 1930'ların başında kavramsal olarak benzer yaklaşımları destekleyen 40 makale ortaya çıkmıştır [65, 66]. En önemli gelişme, 1980'lerin başında Mosbach grubu tarafından kovalent olmayan yaklaşımın ortaya çıkması ile olmuştur ve bu moleküler baskılamanın kapsamını önemli ölçüde genişletmiştir [67].

2.2.2. Moleküler Baskılanmış Polimerler

Moleküler baskılama tekniği, son 20 yılda hızlı bir şekilde popülaritesi artan, sentetik reseptörlerin ve biyomimetik sensör tanıma alanlarına sahip moleküler tanıma bölgeleri tasarlamak için bir yaklaşımdır [68, 69]. Moleküler baskılama tekniği, esas olarak moleküler tanımaya dayanır. Bu seçici tanıma, monomerler ve kalıp molekül arasındaki etkileşimlerin gücüne dayanmaktadır [70]. Kalıp molekül etrafındaki monomerin polimerizasyon işleminden sonra oluşan yapay tanıma alanlarının oluşturulması tekniğidir [71-73].

2.2.3. Moleküler Baskılama Yöntemi Basamakları

Moleküler baskılama yöntemi ile hazırlanan polimerlerin kolay hazırlanabilir olması, ucuz, yüksek tanıma özelliklerine sahip ve kararlı olmasından [74] dolayı son yıllarda birçok araştırmacının ilgisini çekmiştir. Moleküler baskılama işlemi, ön-kompleksleşme, polimerizasyon işlemi ve kalıp molekülün uzaklaştırılması olmak üzere üç basamaktan oluşmaktadır:

1. *Basamak: Ön-kompleksleşme*

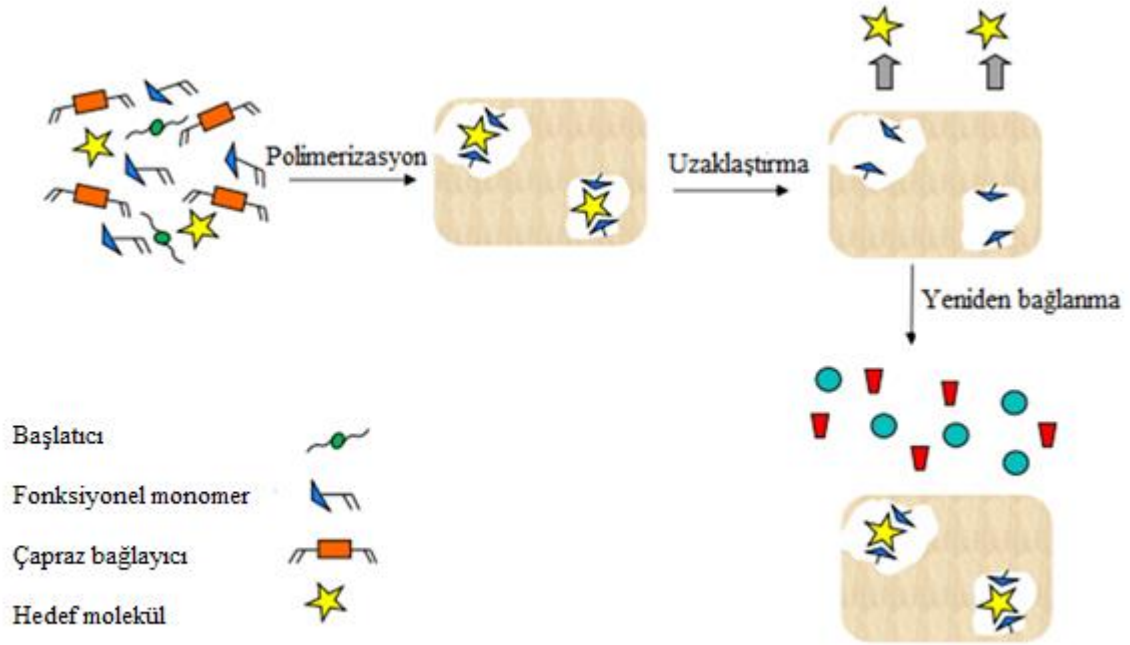
Fonksiyonel gruplar içeren polimerleşme özelliğine sahip ve uygun olarak seçilen monomerler, kalıp molekül etrafında kovalent ya da kovalent olmayan etkileşimlerle birbirleri ile bağlanır. Bu bağlamda meydana gelen etkileşimlerde kalıp molekülün polimer üzerinde meydana getirdiği yapının fiziksel ve kimyasal özellikleri büyük önem arz eder [75, 76].

2. *Basamak: Polimerizasyon işlemi*

Ön-kompleksleşme ile oluşan monomer-kalıp molekül kompleksine başlatıcı ve çapraz bağlayıcı ekleyerek fonksiyonel monomer üzerinden polimerizasyon işlemi gerçekleştirilir. Fonksiyonel monomerlerde olan fonksiyonel kısımlar boyut ve şekil olarak kalıp molekülün tamamlayıcısı olarak görev almaktadır [75].

3. *Basamak: Kalıp molekülün uzaklaştırılması*

Polimerlerde, kalıp molekülün şekil, boyut ve kimyasal işlevsellik açısından kalıp moleküle tamamlayıcı olan tanıma boşluklarının oluşması için, uygun bir yıkama ajanı ile kalıp molekül polimerden uzaklaştırılır (Şekil 2.2). Oluşan bu boşluklar, kalıp moleküle karşı yüksek seçiciliğe ve afiniteye sahiptir [76-78]. Bu seçicilik ve yüksek afinite, fonksiyonel gruplar ile kalıp molekül arasındaki spesifik etkileşimlerle birlikte baskılamanın şekline dayanır [79].



Şekil 2.2: Moleküler baskılama yönteminin basamakları [80].

Bu yöntem, zorlu koşullar altında karmaşık matrikslerle başa çıkması, ucuz ve kararlı olması [81], tekrar kullanılabilmesi [82], kalıp molekülü yüksek tanıma kapasitesi [83], yüksek mekanik dayanıklılığı [84], ısı ve basınç gibi zorlayıcı şartlara karşı gösterdikleri direnç [85, 86], ve birkaç yıl sonunda performansında önemli bir değişiklik olmaması [87] gibi özelliklerinden dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır [88, 89]. Moleküler baskılanmış polimerler, sentezleri sırasında kalıp molekülün varlığı nedeniyle yüksek moleküler tanıma yeteneklerine sahiptirler. Bu nedenle moleküler baskılanmış polimerler, proteinler [90, 91], antikorlar [92, 93] ve bakteriler [94] gibi kalıp molekülleri seçici olarak tanıyabilir [95]. Moleküler baskılama tekniğinin oldukça geniş bir kullanım yelpazesi vardır. Bunlardan bazıları protein saflaştırma ve ayırma [96], sensörler [97], ilaç analizi [98, 99], gıda ve çevre analizleridir [100]. Bu teknik sadece ilaçlar, şekerler gibi küçük moleküllerin tespiti için değil daha büyük moleküllerin tespiti için de tasarlanıp kullanılmaktadır [95, 101]. Doğal biyomoleküllere kıyasla moleküler baskılanmış polimerlerin avantajları Tablo 2.2'de gösterilmiştir. Moleküler baskılama tekniği, farklı bileşimlere ve farklı amaçlara yönelik olarak çeşitli yollarla hazırlanabilmektedir. Bunlar, fotopolimerizasyon [102], serbest radikal polimerizasyonu [103], yığın polimerizasyonu, sol-jel [104] ve elektropolimerizasyondur [105].

Tablo 2.2: Doğal olarak bulunan biyomoleküller ile moleküler baskılama yöntemi ile hazırlanan polimerlerin özelliklerinin karşılaştırılması [80].

Doğal biyomoleküller	**Moleküler baskılanmış polimerler**
Düşük kararlılık	Yüksek kararlılık
Pahalı	Ucuz
Organik çözücülerde düşük performans	Organik çözücülerde yüksek performans
Daha fazla operasyonel sistem gerekli	Gerekli minimum sistemler
Sınırlı analitler ile çalışmak	Herhangi bir analit ile çalışılır
Diğer teknolojilerle düşük uyumlu	Diğer teknolojilerle yüksek uyumlu

2.2.4. Moleküler Baskılama Yöntemleri

Moleküler baskılama yöntemi, fonksiyonel monomer ve kalıp molekül arasında meydana gelen etkileşime göre kovalent ve kovalent olmayan olmak üzere iki gruba ayrılır [106, 107].

2.2.4.1. Kovalent Baskılama

Wulff'un öncülüğünü yaptığı, kovalent baskılama işlemi ön işlem gerektiren bir baskılama türüdür. Polimerizasyon işlemi gerçekleşmeden önce, baskılama için kullanılacak kalıp molekül ile fonksiyonel monomer birbirlerine kovalent bağlar ile bağlanır [108]. Bu bağlar polimerizasyon işlemi sonrası kırılır ve polimerde kullanılan molekülün kalıbını oluşturmak için uzaklaştırılır. Kalıp molekülü polimer ile etkileşime girdiğinde kırılan bu kovalent bağlar tekrar oluşur [89, 109].

Kovalent baskılamanın avantajları

Kovalent bağlar daha kararlı bir yapıya sahiptirler. Bu özeliklerinden dolayı fonksiyonel monomer-kalıp molekül kompleksi stokiyometrik oranda birleşir ve yüksek kararlı bir yapı sergilerler [110]. Sıcaklık ve pH gibi polimerizasyon şartlarında kararlı yapılarından dolayı bir kısıtlama yoktur. Bağlanma bölgeleri daha homojendir [111].

Kovalent baskılamanın dezavantajları

Kovalent bağlanmanın birçok olumsuz özelliğinden dolayı kullanım alanları sınırlıdır. Bunlar yavaş bağlanma kinetiği, kalıp molekülün polimere sınırlı tersinir bağlanma sayısı, sınırlı uygun kalıp molekülü ve kalıp molekülü uzaklaştırmanın bağın yüksek kararlılık ile bağlanmasından dolayı zor olmasıdır [112, 113].

2.2.4.2. Kovalent Olmayan Baskılama

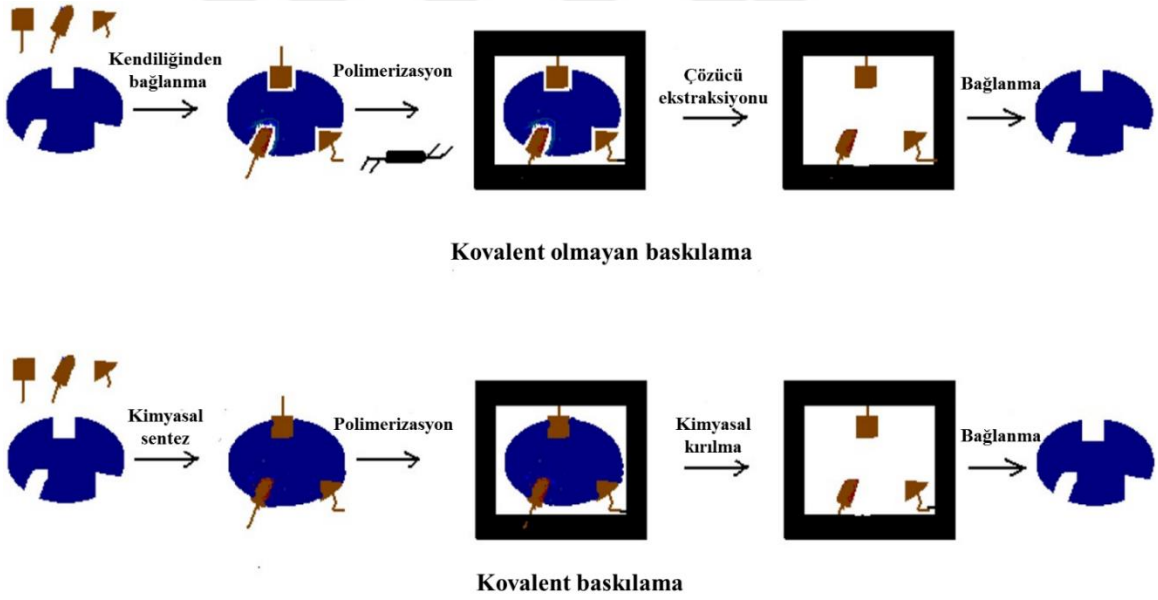
Günümüzde, moleküler baskılanmış bölgeleri üretmek için Mosbach ve grubu tarafından geliştirilen kovalent olmayan baskılama yöntemi en yaygın kullanılan tekniktir [114]. Kovalent olmayan baskılamada, monomer ve kalıp molekül arasında kendiliğinden meydana gelen birleşme ile özel bağlanma bölgeleri oluşur [115]. Bu baskılama türünde, baskılanacak moleküller iyonik, hidrofobik ve hidrojen bağıyla hem baskılama işleminde hem de yeniden bağlanma işleminde etkileşim kurarlar [116]. Bu bağlar zayıf olsa da yüksek kararlılığa sahip kompleksler oluşturmaktadır.

Kovalent olmayan baskılamanın avantajları

Kovalent olmayan baskılama methodu daha yüksek afinite ile bağlanma bölgelerine sahiptir. Polimerizasyon işlemi gerçekleşmeden önce fonksiyonel monomer ile kalıp molekül arasında gerçekleşen etkileşim kolay ve hızlıdır ve sorunsuz şekilde gerçekleşir. Polimerizasyondan sonra ise kalıp molekülün polimerden uzaklaştırılması kolaydır [117, 118]. Bunun nedeni ise moleküller arası hidrojen bağı, iyonik bağ gibi zayıf bağların oluşmasıdır. Diğer bir avantajı ise metadolojisi daha kolaydır [119].

Kovalent olmayan baskılamanın dezavantajları

Kovalent bağlamada, monomer ve kalıp molekül arasında oluşan etkileşimler hidrofobik ortamlarda kararlı olurken aynı etkileşimler polar ortamlarda kolayca zarar görür. Fazla kullanılan fonksiyonel monomerler, spesifik olmayan bağlanma bölgelerinin oluşmasına neden olur. Bağlanma bölgelerinin dağılımları homojen olmayan yapıdadır [120, 121].



Şekil 2.3 Kovalent ve kovalent olmayan baskılamanın şematik gösterimi [109].

2.2.5. Moleküler Baskılanmış Polimerlerinin Sentezinde Kullanılan Bileşenler

2.2.5.1. Kalıp Molekül

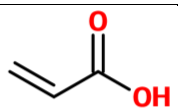
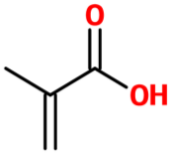
Molekül baskılama yönteminde kullanılan kalıp molekül analit olarak kabul edilir. Kalıp molekülün doğru seçimi, baskılama işleminin başarısını ortaya koymaktadır. Kalıp molekülün kimyasal yapısı kullanılan fonksiyonel monomeri belirlemek için önemlidir [122]. Kalıp molekülün fonkiyonel monomer ile bir kompleks yapı oluşturabilmesi için fonksiyonel grup

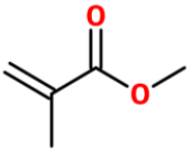
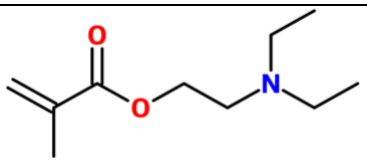
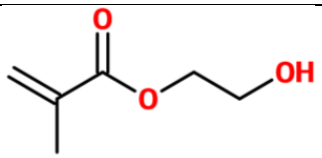
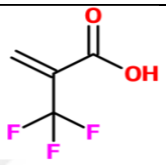
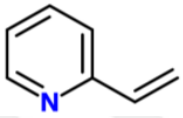
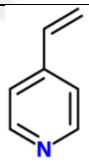
içermesi aranan en önemli kriterdir. Kalıp molekül üzerinde bulunan bu fonksiyonel gruplar kalıp molekülün amit, karboksil, hidroksil grupları hidrojen bağı ile etkileşime girer [117]. Kalıp molekül olarak kullanılmak istenen moleküllerin tümü kalıp molekül olmaya elverişli değildir. Kullanılan kalıp molekülün, kimyasal reaksiyonun meydana geldiği yüksek sıcaklık, reaksiyonu yavaşlayan ya da durduran şartlarda kararlı bir yapı göstermesi gerekmektedir. Baskılanacak molekül olarak ilaçlar [123, 124], aminoasitler [125], proteinler [126-129], nükleik asitler [130, 131], hormonlar [132-134] enzimler [135], antikorlar [136-138], virüsler [139-141], bakteriler [142], metaller [143-145] ve mikroorganizmalar [146] kullanılabilir.

2.2.5.2. Fonksiyonel Monomer

Fonksiyonel monomerler, moleküler baskılama işleminin gerçekleşebilmesi için gerekli olan temel bileşiklerdir. Fonksiyonel monomerlerin görevi baskılama işleminde tanıma merkezlerindeki bağlanma bölgelerini oluşturmaktır [147]. Monomer ile kalıp molekülün oluşturduğu kompleks yapının kararlı olması ve baskılama işleminin başarılı olması için fonksiyonel monomer seçimi önemlidir [148]. Polimerizasyondan önce, kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki etkileşim seviyesi, iyi afinite ile etkili moleküler baskılanmış polimeri geliştirmek için dikkate alınması gereken önemli bir faktördür [149]. Fonksiyonel monomer seçiminde, baskılanacak molekül ya da iyonun fonksiyonel grupları, monomerin fonksiyonalitesi ile uyumlu olmalıdır. Asidik, bazik ve nötral özelliklere sahip fonksiyonel monomerler vardır. Son çalışmalar, iki monomer ile hazırlanan moleküler baskılanmış polimerlerin tek fonksiyonel monomere sahip olanlardan daha iyi tanıma performansı sağladığını göstermiştir [148]. Tablo 2.3'de sık kullanılan fonksiyonel monomerler bulunmaktadır.

Tablo 2.3: Sık kullanılan fonksiyonel monomerler [150].

Akrilik asit	
Metakrilik asit	

Metil metakrilat	
Dietilaminoetil metakrilat	
2-Hidroksietil metakrilat	
2-(Triflorometil) akrilik asit	
2-Vinilpiridin	
4-Vinilpiridin	

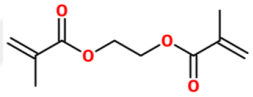
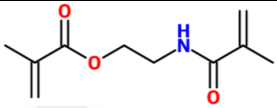
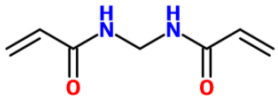
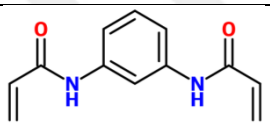
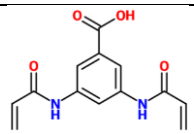
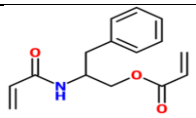
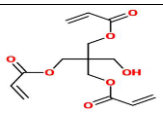
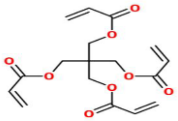
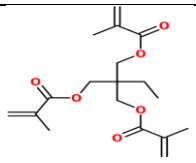
2.2.5.3. Çapraz Bağlayıcılar

Moleküler baskılanmış polimer hazırlamada diğer önemli unsurlardan biri çapraz bağlayıcılardır. Çapraz bağlayıcının başlıca üç ana fonksiyonu bulunmaktadır. Birincisi, polimerin yapısının makrogözenekli veya mikrojel olup olmamasının kontrol edilmesini sağlar. İkincisi ise baskılama işleminden sonra kalıbın kararlı bir yapıda kalmasını sağlamaktadır. Son olarak polimer matriksin mekanik kararlı olmasını sağlar [151, 152]. Yüksek oranlarda kullanılan çapraz bağlayıcılar, polimer matriksin kararlılığını arttırır ve çözücüde çözünmesini önleyerek kullanımını kolaylaştırır. Mekanik dayanıklılığa sahip malzeme elde etmek için tercih edilir [153, 154].

Baskılama işleminin etkili olabilmesi için seçilen çapraz bağlayıcı ile fonksiyonel monomerlerin reaktiflik oranları uyumlu olmalıdır. Bu oranlar arasındaki uyumsuzluk fonksiyonel monomer veya çapraz bağlayıcılardan birinin daha baskın olmasına neden

olduğundan dolayı homojen kopolimerizasyon gerçekleşmeyebilir. Düşük oranlarda kullanılan çapraz bağlayıcı ve fonksiyonel monomer kullanımı, kalıp molekülün bağlanma bölgelerini birbirlerine oldukça yaklaştırır. Gerçekleşen yaklaşmadan dolayı bu bağlanma bölgeleri komşu bölgelerce kapatılarak etkin bir sonuç gösteremez. Aşırı yüksek mol oranlarındaki çapraz bağlayıcı kullanımı kalıp molekül veya fonksiyonel monomer ile kovalent olmayan etkileşime girmesine neden olur. Bu etkileşimde baskılamanın etkinliğini azaltmaktadır [155, 156]. Yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcılar Tablo 2.4'de gösterilmektedir.

Tablo 2.4: Yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcılar [157].

Etilen glikol dimetakrilat	
N, O-Bismetakriloil etanolamin	
N, N-Metilenbisakrilamit	
N, N-1,4-Fenilendiakrilamit	
3,5-Bis(akriloyilamido) benzoik asit	
N, O-Bisakriloyil-L-fenilalaninol	
Pentaeritritol triakrilat	
Pentaeritritol tetraakrilat	
Trimetilolpropan trimetakrilat	

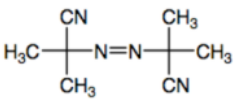
2.2.5.4. Çözücüler

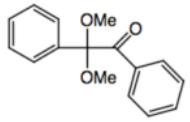
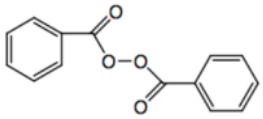
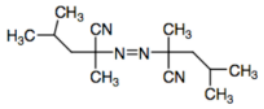
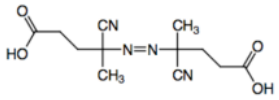
Baskılama yönteminin önemli parametrelerinden bir diğeri ise çözücülerdir. Çözücüler, parojen reaktiftir [158]. Bu özelliklerinden dolayı tüm maddeleri bir fazda çözerek sentez işlemine katılır. Çözücülerin, makrogözenekli yapıların oluşması sırasında gözeneklerin boyutları ve yapısı, toplam gözenek hacmini koruma ve gözeneklerin morfolojisi gibi bir başka önemli görevleri de vardır. Çözücülerin yüksek çözünürlük etkisi, düşük gözenek dağılımı ve yüksek yüzey alanına sahip polimerlere yol açarken, düşük çözünürlük etkisi ise tam tersi etki yapmaktadır [159]. Gözenek oluşumu polimere bağlanan kalıp molekülün salınmasını kolaylaştırır. Bir diğer görevi de polimerizasyonun gerçekleştiği sırada reaksiyon ısısını homojen bir şekilde yaymaktır. Homojen olmayan ısı dağılımı polimerizasyon esnasında tepkime sıcaklığını lokal olarak arttırır. Bu artış istenmeyen yan ürünlerin oluşmasına neden olur. Baskılamanın çeşidine bağlı olarak çözücü türüde değişmektedir. Kovalent olmayan baskılamaya nazaran, kovalent baskılamada, birçok çözücü bileşenlerin tümünü iyi çözebilmektedir. Kovalent olmayan baskılamada ise, etkileşimin meydana gelmesi için ve baskılamanın etkisini arttırmak için çözücü seçimi daha önemlidir [160]. Polimerlerin kalıp moleküle olan seçiciliğinin tam olabilmesi için, oluşturulan boşluğun kalıp molekül tanıma alanları olan boşluklara tam uygun boyutta oluşabilmesi çözücülerin seçimine bağlıdır [161].

2.2.5.5. Başlatıcılar

Polimerizasyon, tüm reaksiyonun aktif merkezi haline gelen tek bir monomer molekülünün aktivasyonu ile başlayan zincirleme bir reaksiyondur. Reaktif türlerin tetiklenmesi genellikle polimerizasyon karışımında bir başlatıcının varlığından kaynaklanır. Başlatıcılar kalıp moleküle ve polimerizasyon türlerine göre değişiklik göstermektedir. En çok tercih edilip kullanılan başlatıcılar Tablo 2.5'de gösterilmektedir. Bunlar arasında, 2,2′-azobis(2-metilpropiyonitril) (AIBN, $C_8H_{12}N_4$) en uygun şekilde 50-70°C ayrışma sıcaklıklarında kullanılır [162].

Tablo 2.5. Sık kullanılan başlatıcılar [163].

2,2′-Azobis(2-metilpropiyonitril)	

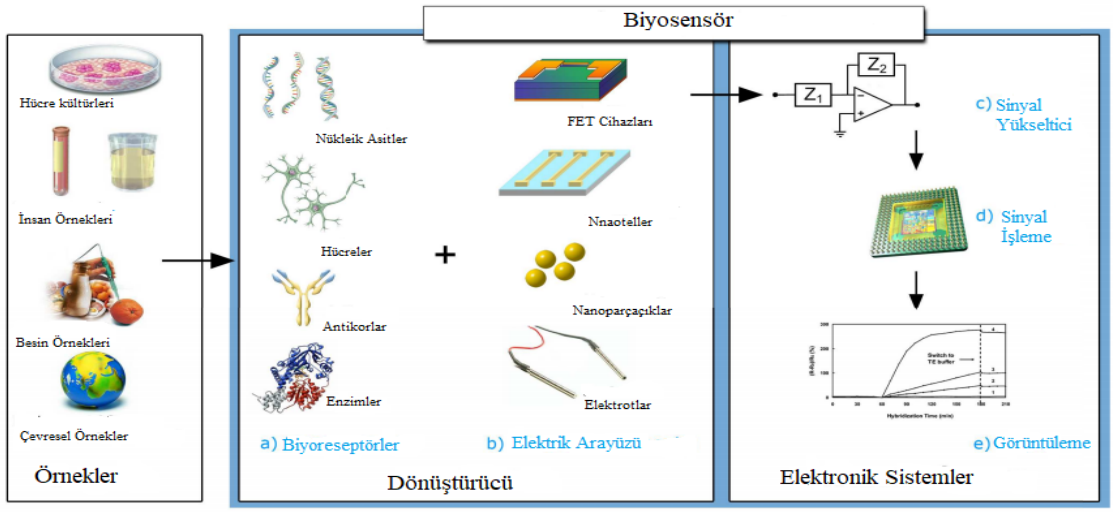
Benzil dimetilasetal	
Benzoil peroksit	
Azobisdimetilvaleronitril	
4,4'-Azobis(4-siyanovalerik asit)	

2.3. SENSÖRLER

Sensörlerle ilgili araştırmalar son yıllarda hızlı bir şekilde artmıştır. Sensörler analiz edilecek olan maddeden elde edilen sinyalin bir sistem vasıtasıyla ölçülebilen sinyale dünüştüren analitik cihazlardır [164]. Biyosensörler ise, biyolojik bir olayın elektriksel sinyale dönüştürülmesini sağlar [165]. Şekil 2.4'de tipik bir biyosensör şematik olarak gösterilmektedir. Genel olarak bir biyosensör üç temel bileşenden oluşmaktadır bunlar dönüştürücüler, reseptörler ve elektronik kısımdır [80, 166]. Sensörün algılama prensibi, analit ile reseptör arasındaki spesifik etkileşime dayanmaktadır. Böyle bir etkileşimin sonucu olarak, dönüştürücü tarafından saptanan pH, ısı, kütle veya elektron transferi, potansiyel fark, optik özelliklerin değişimi ve diğerleri gibi bir veya daha fazla fizikokimyasal özellikte bir değişiklik ortaya çıkar. Bu sistem, reseptörün tepkisini doğrudan analitin mevcudiyeti ile bağlantılı veya analit derişimi ile orantılı bir elektronik sinyale dönüştürür [167].

Teşhis yöntemlerinin zaman alıcı olması ve pahalı olmasından dolayı teşhis için hızlı, güvenilir ve hassas yeni yöntemler gerekmektedir. Tüm bu nedenlerden dolayı sensörler klinik çevresel ve gıda izlemesi, kimyasal ve biyolojik bileşiklerin tespiti için çok önemli araçlar haline gelmiştir [113, 168]. Sensör uygulamalarında kullanılan analit, analiz edilecek madde ve yapılar olarak tanımlanır. Biyoreseptörler ise bileşik veya karışımları oluşturan unsurlardır. Biyoreseptörler olarak kullanılan en yaygın analitler, enzimler ve antikorlardır [165, 169]. Dönüştürücüler, algılanan enerjiyi bir formdan başka bir forma çeviren

biyosensörlerin bir parçasıdır [170, 171]. Sensörlerin gerçek örneklerin karmaşık matrikslerindeki analitlere yanıt vermesi gerektiğinden, sensörlerin seçiciliği çok önemli bir parametredir [172]. Sensörlerde, örnekler ve ligandlar arasındaki etkileşim sonucu oluşan sinyalin ölçülmesi ve iletilmesi sırasında elektrokimyasal, optik ve piezoelektrik gibi dönüştürücüler kullanılır [165, 174]. Sensörlerin çok geniş bir kullanım yelpazesi vardır. Sensör teknolojisi biyomedikal, sağlık teknolojileri farmakolojik ve çevre analizleri gibi geniş bir platformda kullanılmaktadır [175, 176].



Şekil 2.4: Tipik bir biyosensörün elemanları ve seçilmiş bileşenleri [173].

2.3.1. Elektrokimyasal Sensörler

Kimyasal olayların tespit edilebilir elektrik sinyallerine dönüştürüldüğü [177] elektrokimyasal sensörler, metabolizmanın araştırılması, biyolojik süreçlerin kontrolü, sanayi, çevresel gibi çeşitli alanlarda uzun süredir kullanılır [80, 178]. Elektrokimyasal sensörler, hedef türlerin elektrot üzerinde, elektrokimyasal reaksiyonunun etkisini, potansiyel ve iletkenlikteki değişiklikleri gösterir [179]. Elektrokimyasal sensörler, pH değerini, elektrik iletkenliğini, çözünmüş iyonların ve gazların derişimlerini, şekil ve boyut değişikliklerinin ölçer. Akımı sabit bir gerilim veya sıfır akımdaki gerilimi izler, iletkenlik veya empedans değişikliklerini ölçer [180, 181]. Bu sensörlerde kullanılan elektrota bağlı olarak 30°C ile 1600°C sıcaklık aralığı rahatlıkla kullanılabilir [178]. Sensörlerin hassasiyeti, seçiciliği ve kararlılığı ortamın basınç, sıcaklık, pH'ından etkilenir. Bu sensörlerin tespit limitleri oldukça düşüktür. Elektrokimyasal sensörler, sayısız avantajlara sahiptir. Yüksek duyarlılık, kolay numune

hazırlama [172], hızlı yanıt, düşük maliyet [182] gibi avantajlarının yanı sıra dar doğrusal analit, yetersiz tespit limiti veya yetersiz seçicilik gibi dezavantajlara da sahiptir [183].

2.3.2. Piezoelektrik Sensörler

Piezoelektrik sensör temelli kuartz kristal mikroterazi, QCM, sensörleri en yaygın kullanılan çeşitidir. QCM, sensör yüzeyinde biriken kütleden kaynaklanan, kuartz kristali rezonatörünün frekansındaki değişikliği ölçen sensördür. Kuartz kristali, mekanik, kimyasal ve elektriksel özelliklerinden dolayı en çok tercih edilip kullanılan kristal tipidir. Bu sensörlerin maliyeti oldukça düşük çözünürlüğü ise oldukça yüksektir [184]. QCM sensörler, çok ince bir kuvars levha etrafına yerleştirilmiş bir çift elektrottan meydana gelmektedir. QCM sensörün titreşim modu, kristalin kesim şekline ve geometrisine bağlıdır. Sensör yüzeyinde kütle eklenmesi veya kaybı, frekans değişikliğine ve dolayısıyla sensör yüzeyinde bir etikete gerek kalmadan meydana gelen moleküler etkileşimlerin ölçülmesine neden olur [185]. QCM, boşlukta, gaz ve sıvı ortamlarda çeşitli maddeleri tespit etmek için kullanılmıştır [186]. QCM ayrıca bakterilerin [187, 188], virüslerin [189] ve hastalık biyobelirteçlerinin saptanmasını sağlayan çalışmalarda [190] da kullanılmıştır. Bunlar, QCM sensörlerin, diğer sensörler tiplerine göre en önemli avantajlarıdır [191]. Hızlı analiz, yüksek hassasiyet, basit enstrümantasyonu ve düşük maliyeti gibi avantajlarından dolayı QCM sensörlere daha fazla önem verilmiştir [192]. QCM otomatik, gerçek zamanlı ve yerinde algılama olarak geliştirilmiştir [193, 194].

2.3.3. Optik Sensörler

Çeşitli fizikokimyasal reaksiyonların bir sonucu olarak hedef analitlere duyarlı ve seçici olan optik sensörler, basit ve çıplak göz ile tanıma avantajları ve analizde daha az karmaşık ekipman olması nedeniyle gerçek zamanlı tespitte son yıllarda büyük bir ilgi görmektedir [195]. Düşük maliyet, kısa analiz süreleri, yerinde analiz için uygun olmaları nedeniyle optik sensörler klasik yöntemlere göre üstünlük göstermektedir [196]. Optik sensörler, bir reseptör ve bir optik dönüştürücü kullanarak analiz yapabilen kompakt cihazlardır [197]. Böyle bir sistemin birincil amacı, algılama ortamındaki analit ile tanıma elemanı arasında meydana gelen etkileşimden kaynaklanan yüzey optik özelliklere orantılı optik sinyaller üretmektir [198]. Optik sensör, biyo-tanıma elemanları olarak antikor [199], protein [200], nükleik asit [201] olabilir. Işığın madde ile etkileşimine dayanan tüm analitik yöntemleri kapsayan optik sensörler, genellikle sürekli ve eş zamanlı çoklu analit izlemenin avantajlarını sunar [202].

2.4. YÜZEY PLAZMON REZONANS

1902'de Wood, yüzey plazmon dalgalarının uyarılmasına bağlı olarak düzensiz kırılma olgusunu tanımlamıştır. Wood yapmış olduğu çalışmada kırınım düzenleyici yüzeyden polarize ışığı aynaya yansıttığında, aynada aydınlık ve karanlık bölgeler gözlemlemiştir. 1968'de Otto [203], zayıflatılmış toplam yansıma (ATR) yöntemini bilim dünyasına sunmasıyla yüzey plazmon rezonans olgusu tam olarak anlaşılmaya başlanmıştır. 1971'de ise Kretschmann ATR yöntemi ile yüzey plazmonlarının optik uyarılması olan Kretschmann konfigürasyonunu sunmuştur [204, 205]. 1982'de Liedeberg ve Nylander, yüzey plazmon rezonansını optik biyosensör olarak ilk defa kullanmışlardır. Bilim dünyasına yaptıkları bu katkıdan sonra yüzey plazmon rezonans (SPR) sensör teknolojisi ve uygulamalarıyla ilgili sayısız araştırma raporu ortaya çıkmıştır [92, 206]. Yüzey plazmon rezonans (SPR), sensörün popülaritesi, temel biyolojik çalışmalar [207], ilaç keşfi, klinik tanı [208], çevresel [209] ve tarımsal izleme [202] gibi uygulamalar için artmaktadır.

2.4.1.Yüzey Plazmonu

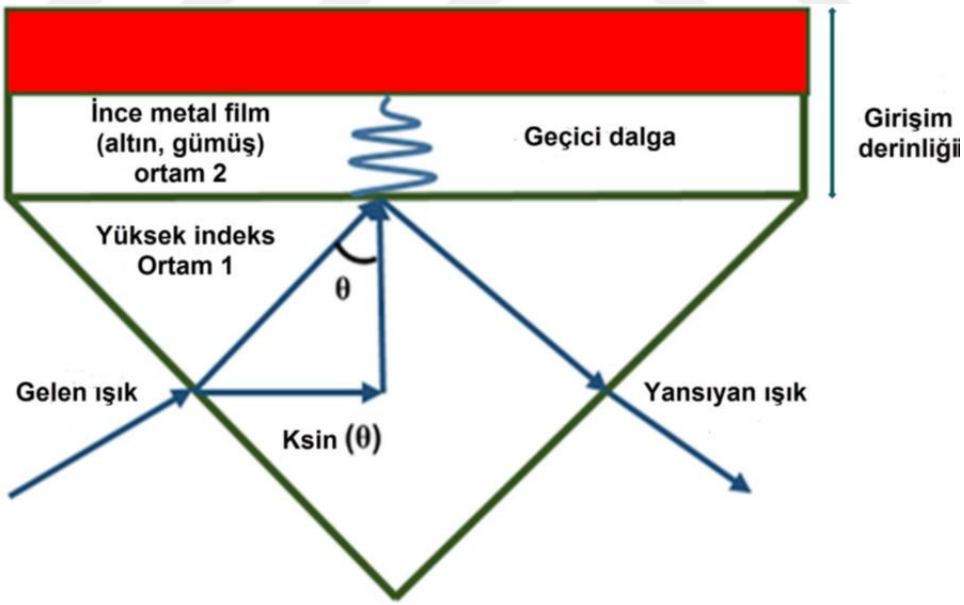
Yüzey plazmonlarının oluşumu, optik uyarma yöntemine bağlıdır [210]. Yüzey plazmonu meydana gelebilmesi için dielektrik-metal ara yüzeylerinde serbest elektronların ve fotonların olması gerekir [211]. Yüzey plazmonları metal-dielektrik ara yüze yakın metallerdeki, serbest elektronların oluşturulduğu etkileşimler sonucu oluşan serbest yükün kolektif salınımı ile ilişkilidir [212, 213]. Bu elektron salınımları ve ara yüzün çevresinde üssel olarak azalan ve bozulan bir dalga oluşturur. Elektromanyetik ışık dalgaları (EM) çevremizdeki her yerde bulunur ve bunlardan biri yüzey plazmon rezonansına neden olur [214]. Yüzey plazmonu enine bir elektromanyetik dalgadır (p-polarize) [215] ve elektromanyetik olan ara yüzde yerleşiktir. Bu elektromanyetik dalganın alan vektörü, arayüzde maksimuma ulaşır. Bundan dolayı hem dielektrik hem de metal içinde üssel olarak bozulur. Bu dalga ara yüz boyunca yayılan yüzey plazmon polaritonları (SPP) üretir [216, 217]. Yüzey plazmonları, düz bir metal yüzeyin ışıkla uyarılmasıyla direkt olarak oluşmaz. Plazmonları uyarabilmek için üç farklı sistem kullanılmaktadır:

- Toplam iç yansıma veya kırınım koşullarında çalışan bir prizma

- Dalga klavuzu sistemi

- Grating sistemi [213]

Yüzey plazmonlarının optik uyarımına bağlı olarak en yaygın kullanılan geometri zayıflatılmış toplam yansıma olarak da bilinen Kretschmann konfigürasyonudur [218]. Bu konfigürasyon da dielektrik geçirgenliklerin ölçülmesi için prizma, ince plazmonik metal yüzey (~ 50 nm) ile temas halindedir [213, 219]. Kritik bir açının üzerinde düzlem polarize ışık, yüksek kırılma indisine sahip bir prizmadan geçerken toplam iç yansımaya uğrar [18, 215]. Toplam iç yansıma, enine manyetik polarize dalgalar kullanarak yüzey plazmonlarının uyarılması için ilk şarttır [220]. Şekil 2.5'de gösterildiği üzere, ince metal yüzeyindeki elektron yoğunluğunun salınımını uyaran ışığın toplam iç yansıma ile oluşan kendiliğinden sönümlü dalganın kullanıldığı yaklaşım mevcuttur [215, 221]. Gelen ışığın momentumunun [15] ve enerjisinin, yüzey plazmon dalga vektörü ile eşit olduğunda plazmonlar uyarılır [18, 222]. Uyarılmaya bağlı olarak yansıyan ışığın yoğunluğunda bir düşüş meydana gelir [18, 221]. Tüm konfigürasyonlarda temel amaç aynıdır: Sensör yüzeyinde meydana gelen kırılma indisindeki değişimi, etiketlemeye ihtiyaç duymadan, gerçek zamanlı ölçmektir [223].



Şekil 2.5: Dielektrik sınırlarda meydana gelen iç kırınım [224].

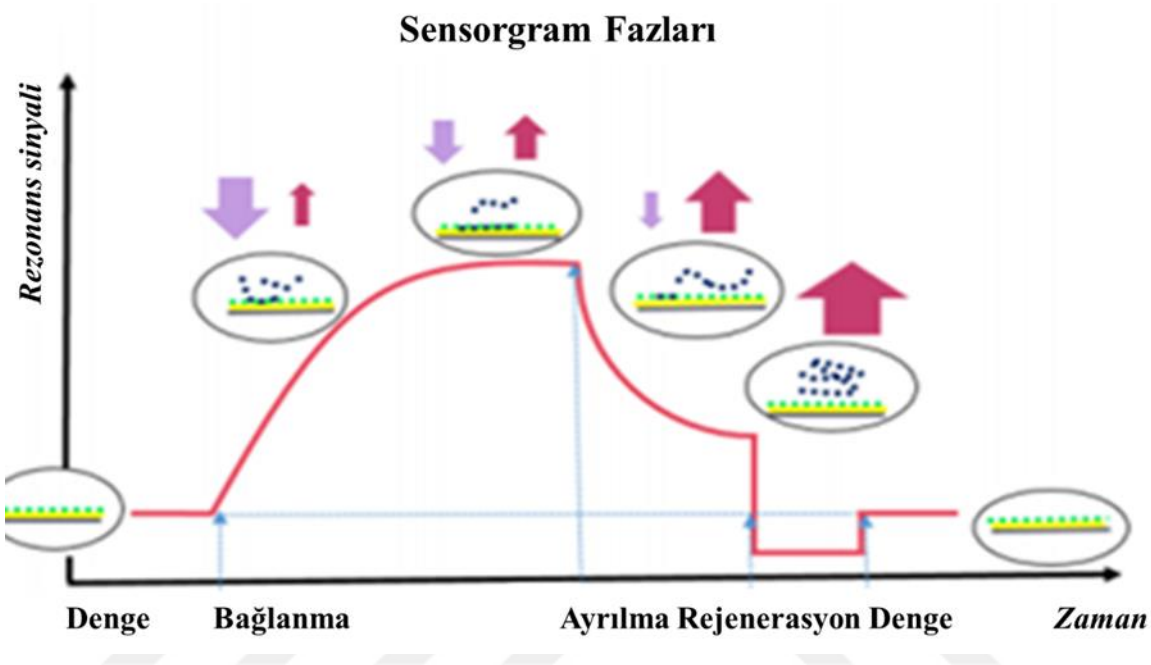
Kaybolan dalganın penetrasyon derinliği, fotonun parlaklığına, ışığın meydana geldiği yer ile çevrenin kırılma indisi oranına ve ışığın dalga boyuna bağlıdır [224]. Sensör yüzeyinde kullanılan metale göre yüzey plazmon rezonansının profili değişmektedir. Kullanılmak

istenen her metal kendi doğasına göre farklı optik özelliklere sahiptir. Yaygın olarak kullanılan metaller genelde altın, gümüş, indiyum, sodyum, bakır ve alüminyumdur [225, 226]. Gümüş metali keskin bir resonans piki oluşturur. Bunun nedeni ise yüzey plazmon salınımlarının metal yüzeyde kendiliğinden azalmasıdır [227-229]. Sensör yüzeyinde kullanılacak metallerin yüzeyleri saf olmalıdır. Atmosferik koşullara bağlı olarak gelişebilen oksit ve sülfit gibi yapılar rezonansı engeller. Kullanılacak metalin sensör olarak kullanılabilmesi için bağlanma kimyasalları ile uyumlu olmalıdır. Bu özelliklerinin ikisini birden sağlayan nadir metallerden biri altındır [230]. Yaygın olarak kullanılan diğer metaller sodyum reaktif yapıdadır. İndinyum çok pahalı bir metaldir. Gümüş ise atmosferik şartlardan etkilenerek oksitlenmektedir [231].

2.4.2. SPR Sensörler

SPR sensörler kompakt tasarım, maliyetinin düşüklüğü ve hassas özellikleri nedeniyle son yirmi yılda birçok araştırmacı tarafından ilgi odağı olmuştur. Ticarileştirilen SPR sensör teknolojisi, afinite ve bağlama sabitlerinin belirlenmesi [232], genotip analizleri, çevre ve gıda analizleri, tıbbı teşhis ve biyomedikal alanlarda birçok önemli uygulama sahasına sahiptir [233-235]. SPR sensörler, antikorlar [236], proteinler [237], lipitler [238], virüsler [239] ve ilaç keşfi [240] gibi birçok analizde kullanılır [241]. SPR temelli sensörler, optik sensör teknolojileri arasında en gelişmiş olanıdır. Bu özellik hiçbir etiketlemeye gereksinim duyulmamasından kaynaklanmaktadır [242]. SPR tekniği, etiketlemeye gereksinim duymadan [243], metal bir yüzeydeki yüzey plazmonlarının kırılma indeksindeki değişiklikleri ölçmek için tasarlanan yüzeye duyarlı optik bir yöntemdir [241, 244, 245]. Metal üzerine hareketsizleştirilmiş analitler ile reseptör arasındaki etkileşimleri karakterize eder ve nicelleştirir [204, 246]. Gerçek zamanlı [245] ve hızlı ölçüm, yüksek hassasiyet ve özgüllük [247, 248], etiketlemeye ihtiyaç duyulmaması [249], kolay numune hazırlama ve düşük maliyetli olması SPR sensörlerin eşsiz avantajlarındandır [250, 251]. SPR sensörü plazmon alanı aralığındaki, ışığın rezonans açısındaki kaymanın ölçülmesine dayanmaktadır [228, 252]. Analizi yapılmak istenen analit içeren çözelti SPR sensörü ile etkileşime geçtiğinde, çözeltideki analit, moleküler tanıma elemanlarına bağlanır ve metal yüzeyde bir yoğunluk artışına neden olur [253]. Bu yoğunluk artışına bağlı olarak keskin bir rezonans tepe noktası belirir [254]. Daha sonra rezonans açısında kayma oluşur. Bu değişiklik ile bir analitin varlığını ve derişimini tespit etmek mümkündür [255]. Son olarak da sisteme desorpsiyon

çözeltisi verildiğinde kalıp molekül yüzeyden ayrılır. Şekil 2.6'da SPR sensöründe analitin bağlanması ve uzaklaştırılmasını gösteren sensorgram gösterilmektedir. Son on yılda, yüzey SPR tekniği ağır metal iyonlarının tespiti dahil olmak üzere çeşitli uygulamalar için etkili bir optik teknik olarak ortaya çıkmıştır [256].



Şekil 2.6: SPR sensör sensorgramında gerçekleşen fazlar [257].

3. MALZEME VE YÖNTEM

Bu doktora tez çalışması kapsamında yapılan deneysel çalışmalar aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- Seçilen fonksiyonel monomerin sentezi ve karakterizasyonu,
- Ön-kompleksin hazırlanması ve karakterizasyonu,
- Cu(II)-baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensörlerin hazırlanması,
- Cu(II)-baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensörlerin karakterizasyonu,
- Cu(II)-baskılanmış SPR sensör ile kinetik çalışmaları,
- Cu(II)-baskılanmış SPR sensör ile tekrar kullanılabilirlik çalışmaları,
- Cu(II)-baskılanmış SPR sensör ile seçicilik çalışmaları,
- Cu(II)-baskılanmış SPR sensör ile raf ömrü çalışmaları,
- Cu(II)-baskılanmış SPR sensör ile yapay örnek çalışmaları,
- Baskılanmamış SPR sensör ile kinetik çalışmaları,
- Baskılanmamış SPR sensör seçicilik çalışmaları,
- Cu(II)-baskılanmış SPR sensörün matematiksel hesaplarının yapılması,
- Cu(II)-baskılanmış SPR sensörün literatür ile kıyaslanması.

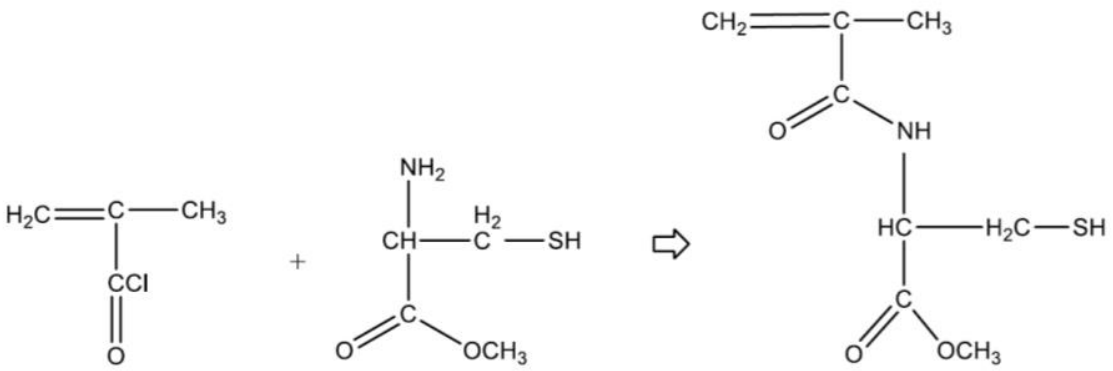
3.1. KİMYASALLAR

Bakır nitrat hemipentahidrat ($Cu(NO_3)_2.2.5H_2O$), çinko nitrat ($Zn(NO_3)_2$), nikel nitrat hekzahidrat ($Ni(NO_3)_2.6H_2O$), ferrik nitrat ($Fe(NO_3)_3.9H_2O$), lityum nitrat ($LiNO_3$), kadmiyum nitrat tetrahidrat ($Cd(NO_3)_2.4H_2O$), kurşun-(IInitrat ($Pb(NO_3)_2$), etilendiamin tetraasetik asit (EDTA, $C_{10}H_{16}N_2O_8$), 2-hidroksi etil metakrilat (HEMA, $C_6H_{10}O_3$), etilen glikol dimetakrilat (EGDMA, $C_{10}H_{14}O_4$), 2,2′-azobis(2-metilpropiyonitril) (AIBN, $C_8H_{12}N_4$), 2-propen-1-tiyol (alil merkaptan, C_3H_6S), L-sistein ($C_3H_7NO_2S$), hidrokinon ($C_6H_6O_2$), diklorometan (CH_2Cl_2), trietilamin ($C_6H_{15}N$), metakriloil klorür (C_4H_5ClO), dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4) ve potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. Etanol (C_2H_5OH), hidrojen peroksit (H_2O_2), sodyum klorür (NaCl), sodyum hidroksit (NaOH), sülfürik asit (H_2SO_4) ve asetik asit (CH_3COOH) Merck ve Fluka firmalarından temin edilmiştir. Tüm kimyasallar analitik saflıktadır. Yapay idrar ve

plazma örnekleri ise BIORAD (Liquichek Urine Chemistry Control)'dan tedarik edilmiştir. Yapılan deneylerde temin edilen saf suyun direnci 18 MΩ/cm'dir.

3.2. FONKSİYONEL MONOMERİN SENTEZİ

Yüzey plazmon rezonans algılayıcı sistemin yüzeyinde hazırlanan nanofilmin yapısında kullanılan fonksiyonel monomerin (N-metakroil-l-sistein metil ester, MAC) sentezi şu şekilde gerçekleştirilmiştir. İlk olarak 100 mL diklorometan çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltiye 0,2 g hidrokinon ve 5,0 g L-sistein eklenmiştir. 13,0 g trietilamin bu çözeltiye eklenerek çözeltinin sıcaklığı 0ºC'ye getirilmiştir. 4 mL metakriloil klorür bu çözelti üzerine yavaş yavaş dökülmüştür. Reaksiyon 2 saat boyunca manyetik karıştırıcı ile azot atmosferi altında karıştırılmıştır. Gerçekleşen kimyasal reaksiyonun ardından, tepkimeye girmeyen metakriloil klorür, sodyum hidroksit (%10'luk) çözeltisi ile ekstrakte edilmiştir [247]. Daha sonra döner bir buharlaştırıcıda sulu faz uzaklaştırılmıştır. Fonksiyonel monomerin kalan kısmı etanol içerisinde çözünerek kullanıma hazır hale getirilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: N-metakriloil-(L)-sistein (MAC) monomerinin sentez tepkimesi.

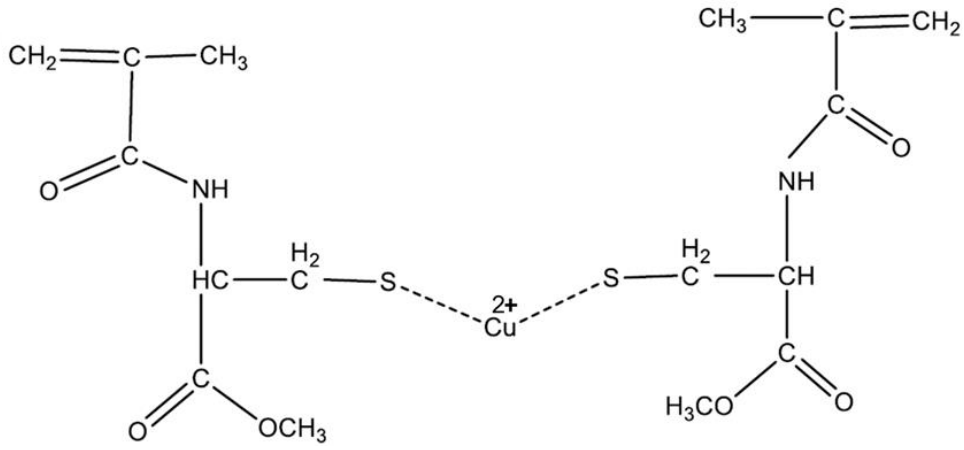
3.3. MAC-CU(II) ÖN-KOMPLEKSİNİN OLUŞTURULMASI

MAC–Cu(II) ön-kompleksinin oluşturulması için kalıp molekül olan Cu(II) iyon kaynağı olarak bakır nitrat hemipentahidrat ($Cu(NO_3)_2.2.5H_2O$) bileşiği ve MAC fonksiyonel monomerden oluşan ön-kompleks farklı oranlarda hazırlanmıştır (Tablo 3.1). Bunun için 0,05 mmol (12 mg) $Cu(NO_3)_2.2.5H_2O$ ve 0,025, 0,005, 0,010 ve 0,015 mmol (2, 4, 8 ve 12 μL)

MAC alınarak toplam hacim 500 µL olacak şekilde hazırlanmış ve 30 dakika rotatör yardımıyla karıştırılmıştır. MAC ile Cu(II) iyonu arasındaki olası etkileşimin Şekil 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.1: MAC-Cu(II) ön-kompleksinin hazırlanma oranları.

Oran	MAC Monomer	Kalıp Molekül (Cu(II))
0.5:1	0,025 mmol	0,05 mmol
1:1	0,005 mmol	0,05 mmol
2:1	0,010 mmol	0,05 mmol
3.1	0,015 mmol	0,05 mmol

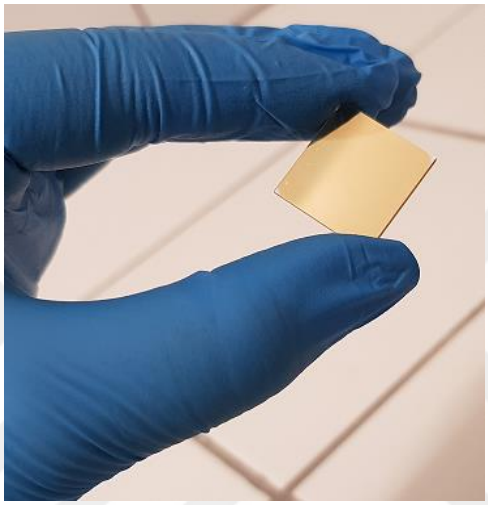


Şekil 3.2: MAC ile Cu(II) iyonu arasındaki olası etkileşim.

3.4. SPR SENSÖR YÜZEYİNİN MODİFİKASYONU

SPRchipTM marka altın sensör yüzeyler SPRimager®II GWC Technologies firmasından temin edilmiştir. Altın yüzeyler SPRimager II sistemine uygun 2,5x2,5 cm^2 boyutlarındadır. Bu yüzeyler SF10 camda titanyum (2 nm) ve altın (50 nm) kaplama içerir (Şekil 3.3). SPR

sensörün altın yüzeyinin modifikasyonu alil merkaptan ile yapılmıştır. SPR sensör yüzeyi temizlenerek 10 µL alil merkaptan ile modifiye edilmiş ve sonra 12 saat boyunca inkübe edilmiştir. Bu sürenin bitiminde SPR sensörünün yüzeyi etanol ile defalarca yıkanmış ve kurutulmuştur. Modifikasyon sonrasında alil grupları vasıtasıyla doymamış bağlar oluşturulmuş ve SPR sensörünün altın yüzeyinde polimerizasyonun gerçekleşebilmesi için hazır hale getirilmiştir.



Şekil 3.3: Altın sensör yüzeyin optik görüntüsü.

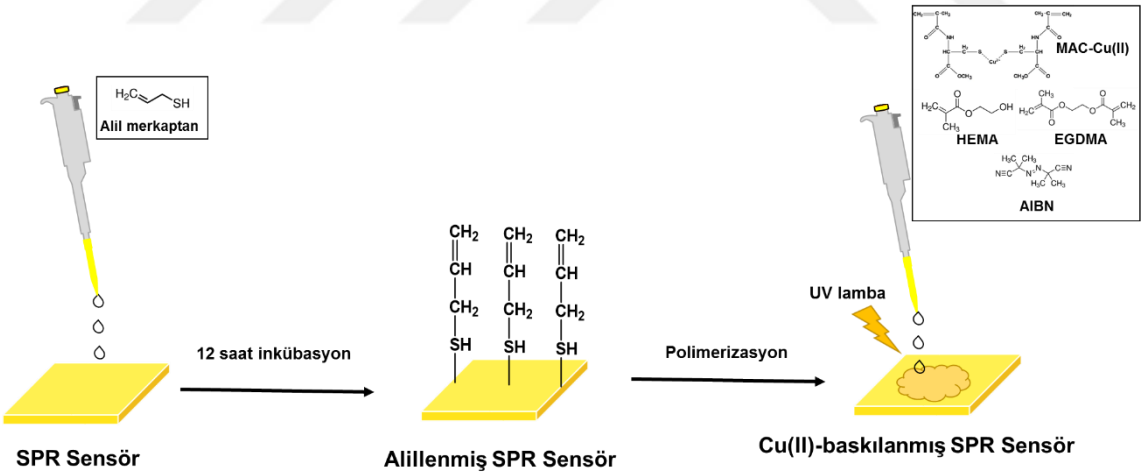
3.5. CU(II)-BASKILANMIŞ SPR SENSÖRÜNÜN HAZIRLANMASI

Cu(II)-baskılanmış SPR sensörü yüzeyindeki nanofilm, MAC-Cu(II) ön-kompleksi ve 2-hidroksi etil metakrilat (HEMA, $C_6H_{10}O_3$) fonksiyonel monomeri ve etilen glikol dimetakrilat (EGDMA, $C_{10}H_{14}O_4$) çapraz bağlayıcısı kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanmış MAC-Cu(II) ön-kompleksi içine uygun miktarlardaki monomer ve çapraz bağlayıcı eklenerek iyice karışmaları sağlanmıştır. 2,2′-Azobis(2-metilpropiyonitril) (AIBN, $C_8H_{12}N_4$) başlatıcısı monomer karışımına eklenmiştir. Daha sonra alil merkaptan ile modifiye edilmiş SPR sensör yüzeyine 10 µL monomer karışımı damlatılmıştır. SPR sensör yüzeyinin homojen bir şekilde kaplanması için spin kaplama cihazı kullanılmıştır. Hazırlanan yüzey üzerinde polimerleşmenin gerçekleşmesi için, 40 dakika boyunca UV lamba (365 nm, 100 W) altında tutularak fotopolimerizasyon tamamlanmıştır (Şekil 3.4). Tepkimeye dahil olmayan monomer ve safsızlıkların uzaklaştırılması işlemi etanol ile yıkanarak yapılmıştır. Karakterizasyon ve

kinetik çalışmalardan önce, desorpsiyon çözeltisi (0,01 mM EDTA) SPR sensör yüzeyi ile etkileştirerek Cu(II) iyonlarının nanofilmden uzaklaşması sağlanmıştır. Desorbe işlemine tabi tutulan sensör yüzeyinin yıkanması işlemi deiyonize su ile yapılmış ve etüvde kurutulmuştur. Şekil 3.5'de tüm hazırlama basamakları şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.4: Spin kaplama sisteminin ve UV lambasının optik görüntüleri.



Şekil 3.5: Cu(II)-baskılanmış SPR sensörünün hazırlanmasının şematik gösterimi.

3.6. CU(II)-BASKILANMAMIŞ SPR SENSÖRÜN HAZIRLANMASI

Cu(II)-baskılanmamış SPR sensörü yüzeyindeki nanofilm, sadece MAC monomeri, 2-hidroksi etil metakrilat (HEMA, $C_6H_{10}O_3$) fonksiyonel monomeri ve etilen glikol dimetakrilat

(EGDMA, $C_{10}H_{14}O_4$) çapraz bağlayıcısı kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan monomer karışımına 2,2′-azobis(2-metilpropiyonitril) (AIBN, $C_8H_{12}N_4$) başlatıcısı eklenmiştir. Daha sonra alil merkaptan ile modifiye edilmiş SPR sensör yüzeyine 10 µL monomer karışımı damlatılmıştır. SPR sensör yüzeyinin homojen bir şekilde kaplanması için spin kaplama cihazı kullanılmıştır. Hazırlanan yüzey üzerinde polimerleşmenin oluşması için 40 dakika boyunca UV lamba (365 nm, 100 W) altında tutularak fotopolimerizasyon olayı gerçekleşmiştir (Şekil 3.4). Tepkimeye girmeyen monomer ve safsızlıkların uzaklaştırılması işlemi etanol ile yıkanarak yapılmıştır.

3.7. SPR SENSÖRLERİNİN KARAKTERİZASYONU

Modifiye edilmemiş boş yüzeyinin, alil merkaptan ile modifiye edilmiş yüzeyinin, Cu(II)-baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensör yüzeylerinin karakterizasyon çalışmaları Fourier dönüşümlü kızılötesi-zayıflatılmış toplam yansıma (FTIR-ATR) spektrofotometresi, elipsometre, temas açısı ve atomik kuvvet mikroskobu (AFM) cihazları kullanılarak yapılmıştır.

3.7.1. FTIR-ATR Analizi

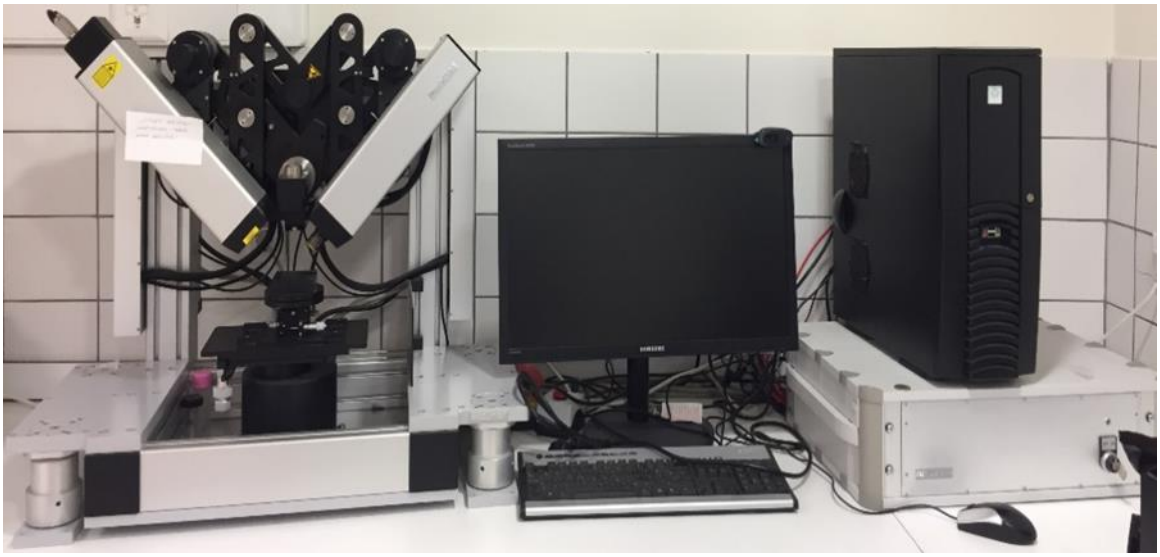
Cu(II)-baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensör yüzeylerindeki nanofilmlerin FTIR spektrumu için FTIR-ATR spektrofotometresi (Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS10, ABD) kullanılmıştır. Cihazın örnek yuvasına yerleştirilen SPR sensör yüzeyler 400-4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında FTIR spektrumu çekilmiş ve yüzeyde gerçekleşen toplam yansıma miktarı ölçülmüştür (Şekil 3.6).



Şekil 3.6: FTIR-ATR spektrofotometrenin optik görüntüsü.

3.7.2. Elipsometre Analizi

Alil merkaptan ile modifiye edilmiş yüzeyin, Cu(II)-baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensör yüzeylerinde bulunan nanofilmlerin kalınlık değerlerini ölçmek için EP3-Nulling Elipsometre (Almanya) cihazı kullanılmıştır (Şekil 3.7). Kalınlık ölçümü gerçekleştirebilmek için cihazın geliş açısı 62° ve dalga boyu 532 nm'ye ayarlanmıştır. SPR sensörler, lazer ışık kaynağı altına yerleştirilmiş, yüzey kalınlık değerini hesaplama programı için SF10 cam, titanyum (2 nm) ve altın (50 nm) katmanları veri olarak girilmiştir. SPR sensör yüzeyinde bulunan farklı noktalarından ölçüm alınmış ve ortalama değerleri hesaplanmıştır.



Şekil 3.7: Elipsometre cihazının optik görüntüsü.

3.7.3. Temas Açısı Analizi

Modifiye edilmemiş boş yüzeyin, alil merkaptan ile modifiye edilmiş yüzeyin, Cu(II)-baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensör yüzeylerinin su temas açı değerleri ölçülmüştür (Krüss DSA 100, Almanya). Şekil 3.8'te gösterilen cihaz yardımıyla temas açısı ölçümleri gerçekleştirilmiş ve ölçümler için yapışık damla yönteminden yararlanılmıştır. Bu yöntemle bir damla su yüzeylerim üzerine ayrı ayrı damlatılarak temas açısı elde edilmiştir. SPR sensör yüzeyinin farklı bölgelerinden su damlatmak suretiyle üç farklı fotoğraf çekilmiştir. Her biri için ayrı temas açısı değeri belirlenmiş ve üç ölçümün ortalama değeri alınmıştır.



Şekil 3.8: Temas açısı cihazının optik görüntüsü.

3.7.4. AFM Analizi

Modifiye edilmemiş boş yüzeyin, alil merkaptan ile modifiye edilmiş yüzeyin, Cu(II)-baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensör yüzeylerindeki nanofilmlerin pürüzlülüğü AFM analizleri ile incelenmiştir. Asylum Research 3D Standalone (Oxford Instruments, İngiltere) cihazında atomik boyutlara kadar inceltilip sivriltilmiş iğne ucu ölçüm yaparken kullanılmıştır. SPR sensör yüzeyi yüksek çözünürlük ile taranarak iki ve üç boyutlu görüntüler elde edilmiştir (Şekil 3.9). Yüzeylerin, hava ortamında milimetrelik boyutlara sahip bir çap içerisine yerleştirilerek ve yarı değen modda görüntüsü alınmıştır. Görüntülerin tarama hızı 1 μm/s iken 5x5 μm^2'lik bir alandan görüntü elde edilmiştir.



Şekil 3.9: AFM cihazının optik görüntüsü.

3.8. CU(II)-BASKILANMIŞ SPR SENSÖR İLE KİNETİK ANALİZLER

Cu(II)-baskılanmış SPR sensörünün yüzey plazmon eğrileri SPR imager II (GWC Technologies, ABD) sistemi kullanılarak alınmıştır (Şekil 3.10). Sensörün hazırlanmasında kullanılan altın kaplanmış SPR yüzey (SPR-1000-050) aynı firmadan temin edilmiştir. SPR sistemi, peristaltik pompa, lazer ışık kaynağı, kamera, ayna sistemi, ve yazılım programının bulunduğu bilgisayardan oluşmaktadır. Sistemin lazer ışık kaynağı Quartz Halogen Lamps (6 V, 10 W, 2000 H, International Light Technologies, ABD) kullanılmıştır. SF10 equilateral prizma (GWC Technologies, ABD) kullanılmıştır. Prizma, her kullanımda etanol ile silinerek lens kâğıdı (4" x 6") ile kurulanmıştır. Görüntü alınması sırasında ışığın Cu(II)-baskılanmış SPR sensörün yüzeyine varma açısı değiştirilerek (48.7-56.7°) ışığın kırılma (ΔR) değerleri kaydedilmiştir. Böylece yüzey plazmon eğrileri, eğimi ve ışığın geliş açısına karşı kırılma miktarı grafiğe dönüştürülerek rapor edilmiştir.



Şekil 3.10: SPR imager II cihazının optik görüntüsü.

Kinetik analizleri incelemek üzere Cu(II)-baskılanmış SPR sensörün yüzeyi önce deiyonize su ile yıkanmıştır. Daha sonra, SPR sisteminden adsorpsiyon tampon çözeltisi geçirilmiş, yüzey plazmon eğrileri elde edilmiş ve rezonans kırılma açısı saptanmıştır. Sistem uygun rezonans kırılma açısına ayarlanmış ve deneyler aynı açı değeri üzerinden yapılmıştır. Kinetik analizler, SPR view yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Yazılım anlık olarak %kırılma miktarı değişiminin ölçülebilmesine olanak sağlamıştır. Rezonans kırılma açısı saptandıktan ve sistemde bulunan ayna belirlenen rezonans açısı değerine ayarlandıktan sonra sistemden adsorpsiyon tamponu geçirilmesine devam edilmiştir.

3.8.1. pH Etkisi

Cu(II)-baskılanmış SPR sensör yüzeyinin hazırlanması ve karakterizasyonu tamamlandıktan sonra kinetik çalışmalara geçilmiştir. Cu(II)-baskılanmış SPR sensörün farklı pH ortamlarındaki performans değişikliği incelenmiştir. Bu kapsamda, beş farklı pH (4.0, 5.0, 6.0, 7.0 ve 8.0) değerine sahip tampon çözeltiler hazırlanmıştır. Sistem dengeye ulaştıktan 180 saniye sonra ile farklı tampon çözeltilerinde, aynı Cu(II) derişimine (4 µM) sahip örnekler sırayla 500 µL/dk akış hızında 300 saniye boyunca SPR sistemine peristaltik pompa ile verilmiştir. Rezonans frekansında meydana gelen kayma değerleri anlık olarak gözlemlenmiş ve sinyaller dengeye ulaştığında sisteme desorpsiyon çözeltisi (0,01 mM EDTA) gönderilerek Cu(II) iyonlarının ortamdan uzaklaşması sağlanmıştır. 180 saniyelik desorpsiyon işleminden sonra alınan veriler kaydedilerek, SPR sisteminden tekrar deiyonize su ile yıkanmış ve daha sonra sistemin dengeye gelmesi için adsorpsiyon tamponu geçirilmiştir. Bir sonraki örnek

sisteme verilmeden önce adsorpsiyon-desorpsiyon-yıkama işlemleri tekrarlanmıştır. Dengeye ulaşan sistemde diğer tampon çözeltilerinde hazırlanmış Cu(II) örneklerinin kinetik çalışmaları da aynı yöntem tekrarlanarak yapılmıştır. Akış hızı tüm analizlerde sabit tutulmuştur.

3.8.2. Derişim Etkisi

Kinetik çalışmalara, farklı derişimlerdeki Cu(II) içeren çözeltilerin hazırlanması ile devam edilmiştir. Cu(II)-baskılanmış SPR sensörün farklı derişimlerdeki Cu(II) içeren çözeltilerine verdiği performans değişikliği incelenmiştir. Bu kapsamda, sekiz farklı Cu(II) derişimi (5 µM, 4 µM, 3 µM, 2 µM, 1 µM, 0,4 µM, 0,1 µM, 0,04 µM) değerine sahip örnekler maksimum kırılma değerine sahip pH 8.0 fosfat tampon çözeltisi içerisinde hazırlanmıştır. Sistem dengeye ulaştıktan 180 saniye sonra örnekler sırayla 500 µL/dk akış hızında 300 saniye boyunca SPR sistemine peristaltik pompa ile verilmiştir. Rezonans frekansında meydana gelen kayma değerleri anlık olarak gözlemlenmiş ve sinyaller dengeye ulaştığında sisteme desorpsiyon çözeltisi (0,01 mM EDTA) gönderilerek Cu(II) iyonlarının ortamdan uzaklaşması sağlanmıştır. 180 saniyelik desorpsiyon işleminden sonra alınan veriler kaydedilerek, SPR sisteminden tekrar deiyonize su yıkanmış ve daha sonra sistemin dengeye gelmesi için adsorpsiyon tamponu geçirilmiştir. Bir sonraki örnek sisteme verilmeden önce adsorpsiyon-desorpsiyon-yıkama işlemleri tekrarlanmıştır. Akış hızı tüm analizlerde sabit tutulmuştur.

3.8.3. Tekrar Kullanılabilirlik Analizleri

Cu(II)-baskılanmış SPR sensörün tekrar kullanılabilirliğini incelenmek amacıyla 4 µM derişiminde hazırlanmış Cu(II) örneği SPR sistemine verilmiştir. Sistem 180 saniye sonunda dengeye ulaştıktan sonra, 180 saniye süresince Cu(II) örneği sistemden geçirilmiş ve yine 180 saniye süresince de 0,01 mM EDTA verilerek desorpsiyon işlemi yapılmıştır. Bu aşamalar aynı derişime sahip örnek ile ardarda dört defa tekrarlanmıştır. Ayrıca 3 µM, 4 µM ve 5 µM olmak üzere artan derişimde Cu(II) örnekleri sırasıyla Cu(II)-baskılanmış SPR sensör ile etkileştirilerek sensörün tekrar kullanılabilirliği incelenmiştir. Bu amaçla, sistem yine 180 saniye boyunca dengeye getirilmiş, 180 saniye boyunca 3 µM derişimde Cu(II) örneği sistem ile etkileştirilmiş ve yine 180 saniye boyunca da 0,01 mM EDTA verilerek desorpsiyon gerçekleştirilmiştir. Hemen ardından aynı sürelerde 4 µM ve 5 µM derişimde Cu(II) örnekleri Cu(II)-baskılanmış SPR sensör ile etkileştirilerek analiz tamamlanmıştır. Analiz sonunda tüm

veriler kayıt edilerek, deiyonize su sisteme tekrar verilmiş ve ardından sistemin dengeye gelebilmesi için adsorpsiyon tamponu geçirilmiştir. Bir sonraki örnek sisteme verilmeden önce adsorpsiyon-desorpsiyon-yıkama işlemleri tekrarlanmıştır. Akış hızı tüm analizlerde sabit tutulmuştur.

3.8.4. Seçicilik Analizleri

Baskılama seçiciliğini göstermek için önce Cu(II)-baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensörler ile pH 8.0 tampon çözeltisinde hazırlanan 5 μM derişimde Cu(II) örneği ile etkileştirilmiştir. Sonrasında Fe(II), Cd(II), Li(II), Ni(II) ve Pb(II) yarışmacı ajanları kullanılarak hazırlanan örnek çözeltileri SPR sistemine verilerek Cu(II)-baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensörler ile etkileştirilmiştir. Sistem dengeye ulaştıktan 180 saniye sonra örnekler sırayla 500 μL/dk akış hızında 300 saniye boyunca SPR sistemine peristaltik pompa ile verilmiştir. Rezonans frekansında meydana gelen kayma değerleri anlık olarak gözlemlenmiş ve sinyaller dengeye ulaştığında sisteme desorpsiyon çözeltisi (0,01 mM EDTA) gönderilerek Cu(II) iyonlarının ortamdan uzaklaşması sağlanmıştır. 180 saniyelik desorpsiyon işleminden sonra alınan veriler kaydedilerek, SPR sistemi tekrar deiyonize su ile yıkanmış ve daha sonra sistemin dengeye gelmesi için adsorpsiyon tamponu geçirilmiştir. Bir sonraki örnek sisteme verilmeden önce adsorpsiyon-desorpsiyon-yıkama işlemleri tekrarlanmıştır. Akış hızı tüm analizlerde sabit tutulmuştur.

Elde edilen veriler ışığında seçicilik (k) ve bağıl seçicilik (k') katsayı değerleri aşağıdaki eşitliklere göre hesaplanmıştır. Yarışmacı ajanların var olduğu bir ortamda Cu(II) iyonunun Cu(II)-baskılanmış SPR sensör ile etkileşimini ifade eden seçicilik katsayısı (k) Eşitlik 3.1 kullanılarak hesaplanır.

$$k = k_{Cu(II)\ iyonu} / k_{yarışmacı\ iyon} \quad (3.1)$$

Cu(II)-baskılanmış SPR sensör ile diğer iyonların k değerleri baskılamanın seçiciliğinin yüksek olup olmadığının anlaşılması için kullanılır. Bağıl seçicilik katsayısı (k') Eşitlik 3.2 kullanılarak hesaplanır:

$$k' = k_{Baskılanmış} / k_{Baskılanmamış} \quad (3.2)$$

3.8.5. Raf Ömrü Analizleri

Cu(II)-baskılanmış SPR sensörün dayanaklılığını göstermek için raf ömrü analizleri yapılmıştır. Bunun için oda sıcaklığında kapalı şekilde saklanan Cu(II)-baskılanmış SPR sensörün daha sonraki ölçümlerde herhangi bir performans kaybı olup olmadığı araştırılmıştır. Farklı zamanlarda (1, 3, 24, 36 ay) aynı Cu(II) derişimi (4 μM) ile örnekler hazırlanmış ve sensör ile etkileştirilmiştir. Sistem dengeye ulaştıktan 180 saniye sonra örnekler sırayla 500 μL/dk akış hızında 300 saniye boyunca SPR sistemine peristaltik pompa ile verilmiştir. Rezonans frekansında meydana gelen kayma değerleri anlık olarak gözlemlenmiş ve sinyaller dengeye ulaştığında sisteme desorpsiyon çözeltisi (0,01 mM EDTA) gönderilerek Cu(II) iyonlarının ortamdan uzaklaşması sağlanmıştır. 180 saniyelik desorpsiyon işleminden sonra alınan veriler kaydedilerek, SPR sistemi tekrar deiyonize su ile yıkanmış ve daha sonra sistemin dengeye gelmesi için adsorpsiyon tamponu geçirilmiştir. Bir sonraki örnek sisteme verilmeden önce adsorpsiyon-desorpsiyon-yıkama işlemleri tekrarlanmıştır. Akış hızı tüm analizlerde sabit tutulmuştur.

3.8.6. Yapay Örnek Analizleri

Cu(II)-baskılanmış SPR sensörün karmaşık örneklerde kullanılabilir olduğunun anlaşılabilmesi için yapay plazma ve idrar örnekleri hazırlanmıştır. pH 8.0 tampon çözeltisinde 5 μM derişimde Cu(II) örneği hazırlamak için yapay plazma ve idrar örneklerinin her birinden 10 μL alınmıştır. Örnekler sırası ile SPR sistemine verilerek Cu(II)-baskılanmış SPR sensör ile etkileştirilmiştir. Sistem dengeye ulaştıktan 180 saniye sonra örnekler sırayla 500 μL/dk akış hızında 300 saniye boyunca SPR sistemine peristaltik pompa ile verilmiştir. Rezonans frekansında meydana gelen kayma değerleri anlık olarak gözlemlenmiş ve sinyaller dengeye ulaştığında sisteme desorpsiyon çözeltisi (0,01 mM EDTA) gönderilerek Cu(II) iyonlarının ortamdan uzaklaşması sağlanmıştır. 180 saniyelik desorpsiyon işleminden sonra alınan veriler kaydedilerek, SPR sistemi tekrar deiyonize su ile yıkanmış ve daha sonra sistemin dengeye gelmesi içn adsorpsiyon tamponu geçirilmiştir. Bir sonraki örnek sisteme verilmeden önce adsorpsiyon-desorpsiyon-yıkama işlemleri tekrarlanmıştır. Akış hızı tüm analizlerde sabit tutulmuştur.

3.8.7. Adsorpsiyon İzoterm Modelleri

Cu(II)-baskılanmış SPR sensör yüzeyi ile Cu(II) iyonu arasındaki etkileşimin kinetik ve izoterm analizi, kalıp molekül ve polimerik nanofilm etkileşimlerini belirlemek için kullanılmıştır. Bu amaçla ilk olarak denge (Scatchard) ve bağlanma analizleri yapılarak farklı adsorpsiyon izoterm modelleri incelenmiştir.

3.8.7.1. Denge ve Bağlanma Analizi

Toplam ligand miktarı ($[B]_0$), yüzeyin maksimum analit bağlama kapasitesi olarak tanımlanmış ve diğer tüm derişim değerleri SPR sinyali olarak belirtilmiştir. Serbest analit derişiminin akış hücresinde sabit olarak kaldığı şartlar altında bağlanma Eşitlik 3.3'deki gibi ifade edilmiştir:

$$d\Delta R/dt = k_a c\,(\Delta R_{maks} - \Delta R) - k_d \Delta R \qquad (3.3)$$

Bu eşitlikte $d\Delta R/dt$, SPR sinyalinin değişim hızı; ΔR ve ΔR_{maks}, bağlanma esnasında ölçülen ve maksimum elde edilen sinyal; c, Cu(II) derişimi (μM), k_a, bağlanma hız sabiti ($\mu M^{-1}.s^{-1}$) ve k_d, ayrılma hız sabiti (s^{-1})'dir. Bağlanma sabiti K_A (μM^{-1}), k_a ve k_d değerlerinin oranından hesaplanmıştır. Denge durumunda, $d\Delta R/dt=0$ alınarak Eşitlik 3.4'deki gibi sadeleştirilmiştir:

$$\Delta R_{denge}/c = K_A \Delta R_{maks} - K_A \Delta R_{denge} \qquad (3.4)$$

Böylece bağlanma sabiti K_A, $\Delta R_{denge}/c$'ye karşı ΔR_{denge} grafiğinden hesaplanmıştır. Ayrılma sabiti K_D ise; $1/K_A$ eşitliği ile elde edilmiştir.

Eşitlik 3.3 tekrar düzenlendiğinde Eşitlik 3.5 elde edilmiştir.

$$d\Delta R/dt = k_a c \Delta R_{maks} - (k_a c + k_d)\Delta R \qquad (3.5)$$

Eşitlikte, etkileşim kontrollü kinetikler için çizilen $d\Delta R/dt$'ye karşı ΔR grafiğinin, eğimi $-(k_a c + k_d)$ olan bir doğru verdiği görülmüştür. Başlangıç bağlanma hızı analit derişimi ile doğrusal bir ilişkili olduğu görülmüş ve nicel olarak derişim hesaplanmasında kullanılmıştır. ΔR_{maks}'un deneysel olarak tespit edilmesi zor olduğundan takip edilen yaklaşım, birçok farklı analit derişimlerinde bağlanma sensorgramlarının alınması olmuştur. Eşitlik 3.6'deki gibi ileri ve geri yöndeki hızların analizi için çizilen $d\Delta R/dt$'ye karşı ΔR grafikleri, ileri ve geri yöndeki hız sabitleri ile alakalı bir eğim değeri (s) vermiştir:

$$s = k_a c + k_d \qquad (3.6)$$

s'ye karşı c grafiği, eğimi k_a olan bir doğru ve teorik olarak da kesim noktası k_d değerini vermiştir. Fakat $k_a c >> k_d$ olduğu durumlarda k_d hesaplaması için bu yöntem çok güvenilir olmadığından Eşitlik 3.7'deki gibi ayrılma kinetiğinin incelenmesi yöntemi seçilmiştir:

$$\ln(\Delta R_0 / \Delta R_t) = k_d (t - t_0) \quad (3.7)$$

Bu eşitlikte ΔR_0 ve ΔR_t, ayrılma eğrisindeki t_0 ve t anlarındaki SPR sinyal değerlerini vermiştir.

3.8.7.2. Adsorpsiyon İzoterm Modelleri

Cu(II)-baskılanmış SPR sensörü ile Cu(II) iyonu arasında gerçekleşen etkileşimi tayin etmek amacıyla iki farklı adsorpsiyon izoterm modeli uygulanmıştır. Langmuir adsorpsiyon izoterm modelinde homojen bağlanma varsayımına dayanırken Freundlich adsorpsiyon izoterm modelinde ise heterojen bağlanma varsayımına dayanır.

$$\Delta R=\{\Delta R_{maks}[c]/K_D+[c]\} \quad (3.8)$$

$$\Delta R=\Delta R_{maks}[c]1/n \quad (3.9)$$

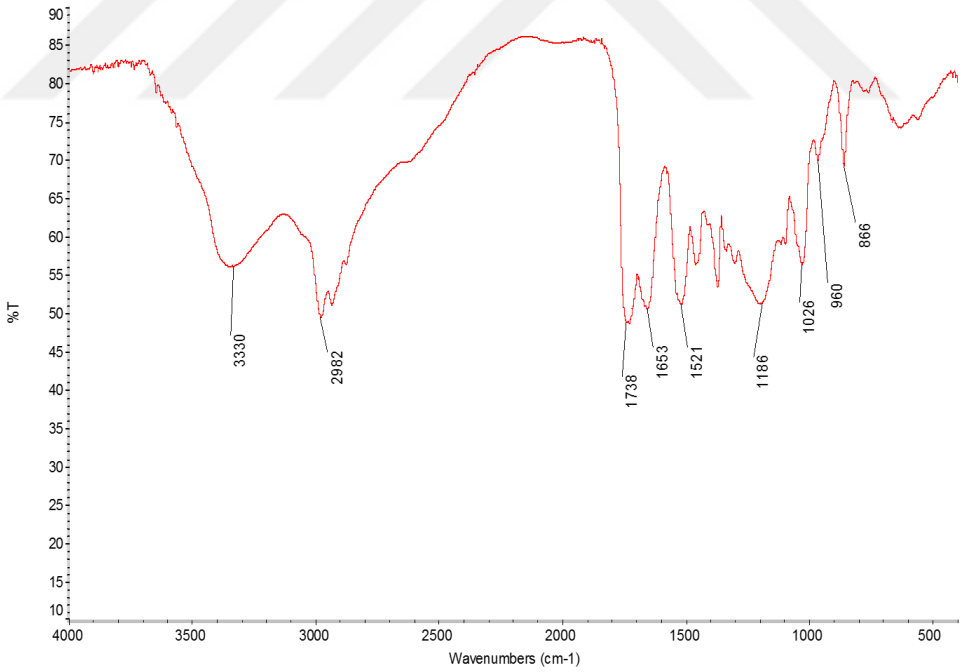
Bu eşitlikte ΔR_{maks} maksimum SPR sinyal kayması; ΔR_{denge}, denge halindeki SPR sinyal kayması; [c], analit değişimi (μM); K_A (μM-1), bağlanma denge sabiti K_D (μM), ayrılma denge sabiti; 1/n, Freundlich yüzey heterojenite indeksidir. Eşitlik 3.8 ve 3.9 kullanılarak katsayılar ayrı ayrı hesaplanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. MAC MONOMERİNİN KARAKTERİZASYONU

4.1.1. FTIR-ATR Analizi

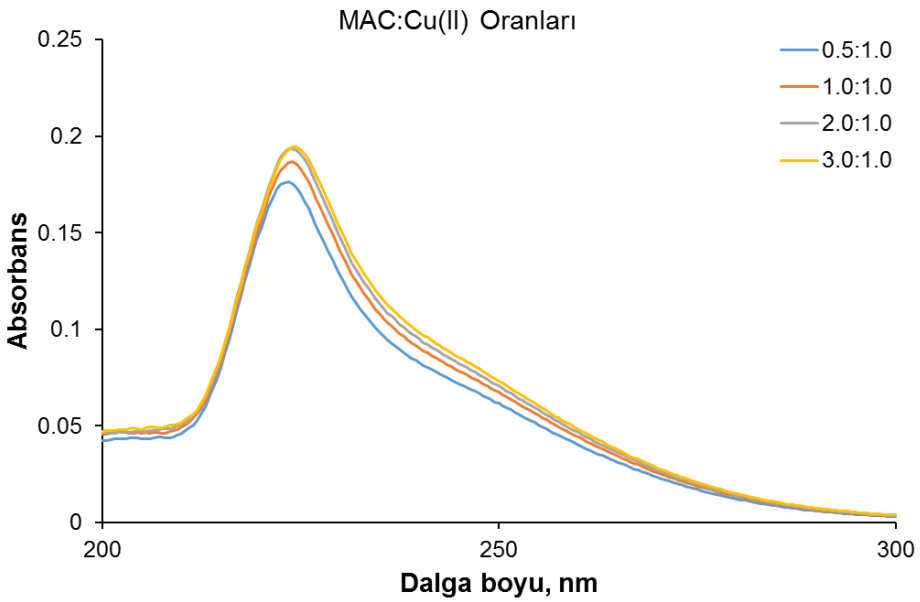
MAC monomerinin FTIR-ATR spektrumu, FTIR-ATR spektrofotometresi cihazı kullanılarak elde edilmiştir. MAC monomeri cihazın örnek haznesine damlatılmış, 400-4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında monomerdeki toplam yansıma miktarı ölçülmüş ve spektrum elde edilmiştir. Şekil 4.1'de gösterildiği gibi MAC monomeri 3330 cm^{-1} civarında –NH ve 2982 cm^{-1} civarında –SH bandına sahiptir. Karboksilik aside bağlı –OH grubunun gerilme bandı ile –NH'a ait gerilme bandı aynı bölgede örtüşerek geniş pik oluşturmuştur. Ayrıca, 1738 cm^{-1}'de C=O bantları, 1653 cm^{-1} ve 1521 cm^{-1}'de ise amid I ve amid II bantları gözlenmiştir. Bu sonuçlar, MAC monomerinin başarı ile sentezlendiğini göstermiştir.



Şekil 4.1: MAC monomerinin FTIR-ATR spektrumu.

4.2. MAC-CU(II) ÖN-KOMPLEKSİNİN KARAKTERİZASYONU

Kalıp molekül olarak Cu(II) ve fonksiyonel monomer olarak MAC monomerinin kullanılması ile MAC-Cu(II) ön-kompleksi hazırlanmıştır. Ön-kompleksin optimizasyon ölçümleri UV spektrofotometresi (Shimadzu, Model 1601, Japonya) ile gerçekleştirilmiştir. MAC-Cu(II) ön-kompleksi spektrofotometrik olarak değerlendirildiğinde elde edilen sonuçlar ışığında doygunluğa ulaştığı optimum oranın 2.0:1.0 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.2). Bu orandan sonra önemli bir değişiklik olmadığından ve sinyal şiddetinin artmasının sona ermesinden dolayı Cu(II)-baskılanmış SPR sensörün hazırlanması için bu oran seçilmiştir.



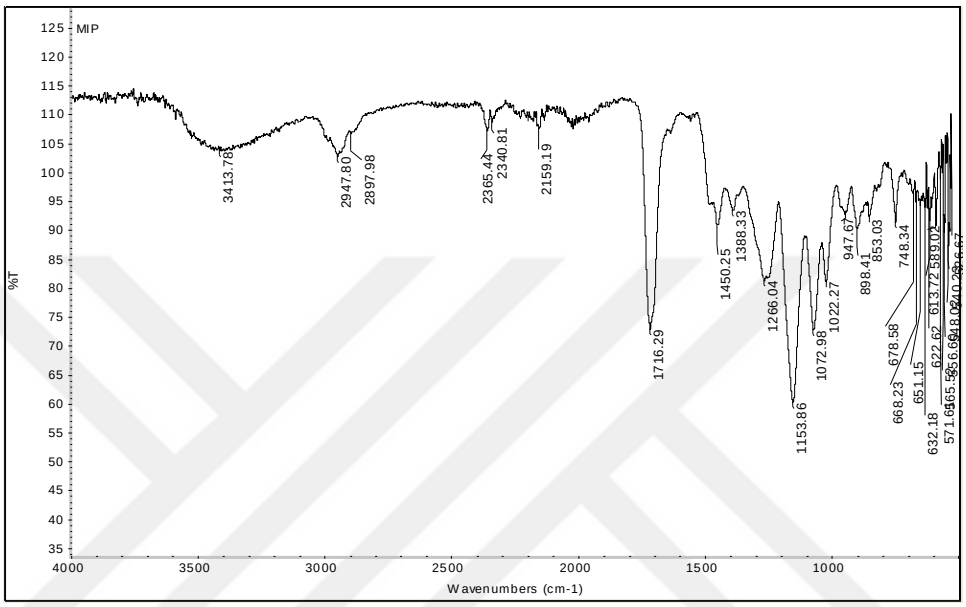
Şekil 4.2: MAC-Cu(II) ön-komplekslerinin spektrum grafikleri.

4.3. SPR SENSÖRLERİNİN KARAKTERİZASYONU

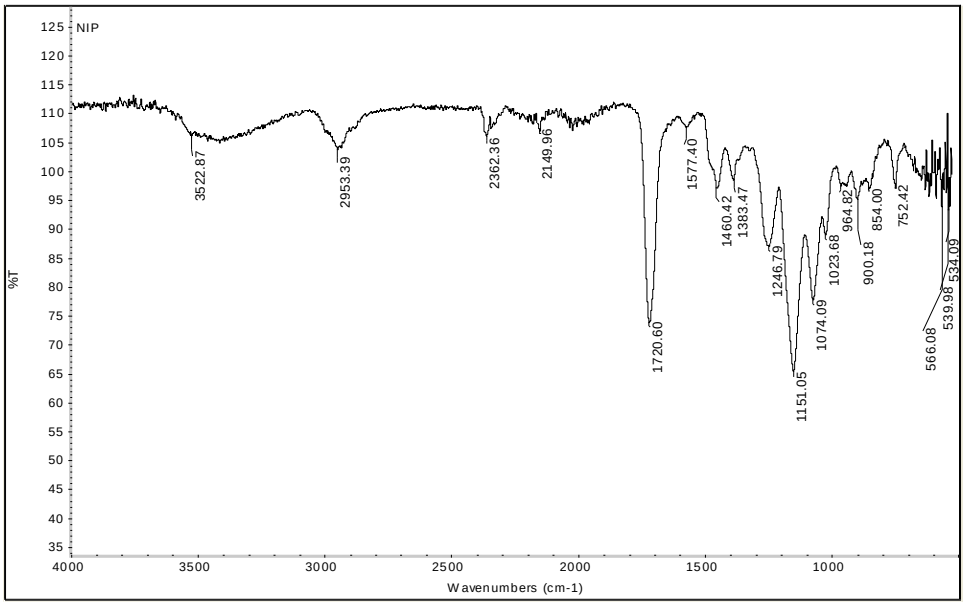
4.3.1. FTIR-ATR Analizi

Cu(II)-baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) SPR sensör yüzeylerinin FTIR-ATR spektrumları, FTIR-ATR spektrofotometresi kullanılarak elde edilmiştir. 1716 cm^{-1}'deki bandın sinyal şiddetinin artması ve kayması, 1024 cm^{-1}'deki koordine olmuş –S-Cu bağlarının 1153 cm^{-1}'e kayması MAC-Cu(II) ön-kompleksinin nanofilmin yapısını oluşturduğunu göstermiştir (Şekil 4.3). Ayrıca, Cu(II) ile herhangi bir bağı olmayan baskılanmamış SPR

sensör yüzeyinin FTIR-ATR spektrumu incelendiğinde 1577 cm^{-1}'deki bandın MAC monomerinin HEMA monomerinin yapısına girmesiyle oluşan karboksil–karbonil (-COO) grubu için pik oluştuğu görülmüştür (Şekil 4.4). Böylece, Cu(II)-baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensör yüzeylerindeki nanofilmlere ait spesifik bantlar polimerleşmenin başarıyla gerçekleştiğini göstermiştir.



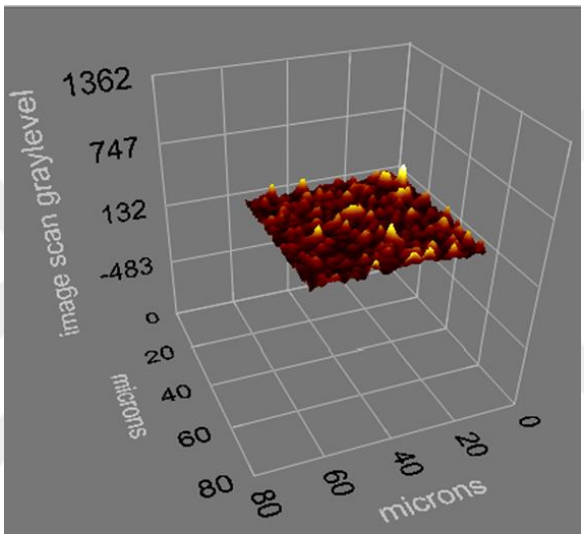
Şekil 4.3: Cu(II)-baskılanmış (MIP) SPR sensör yüzeyinin FTIR-ATR spektrumu.



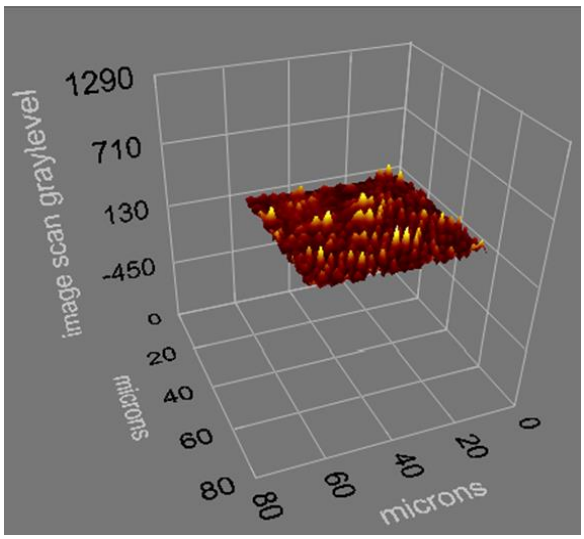
Şekil 4.4: Baskılanmamış (NIP) SPR sensör yüzeyinin FTIR-ATR spektrumu.

4.3.2. Elipsometre Analizi

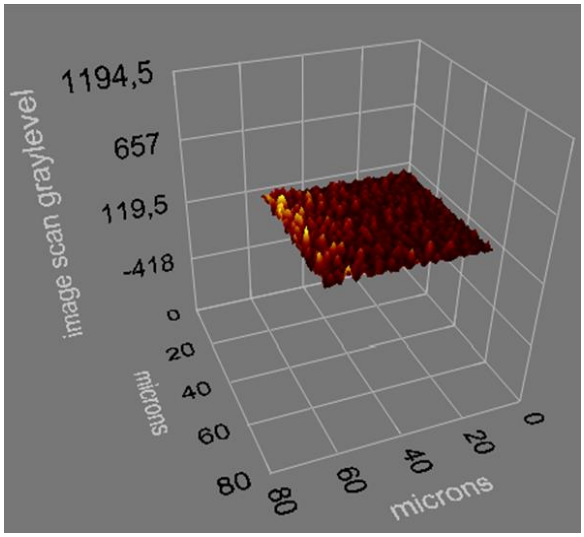
Alil merkaptan ile modifiye edilmiş yüzeyin, Cu(II)-baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensör yüzeylerinde bulunan nanofilmlerin kalınlığı EP3-Nulling Elipsometre cihazı ile ölçülmüştür. Üç ayrı şekilde verilen (Şekil 4.5, Şekil 4.6 ve Şekil 4.7) alil merkaptan ile modifiye edilmiş yüzeyin, Cu(II)-baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensör yüzeylerinin elipsometre analizlerindeki ortalama kalınlık değerleri sırasıyla 75.1 ± 2.7 nm, 87.6 ± 2.6 nm ve 82.5 ± 2.9 nm olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.5: Alil merkaptan ile modifiye edilmiş yüzeyin elipsometre görüntüsü.



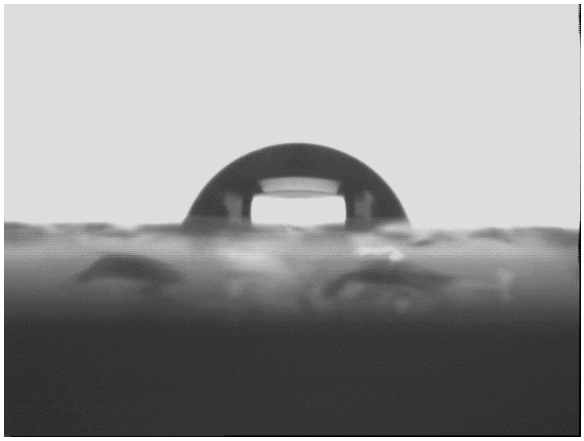
Şekil 4.6: Cu(II)-baskılanmış SPR sensör yüzeyinin elipsometre görüntüsü.



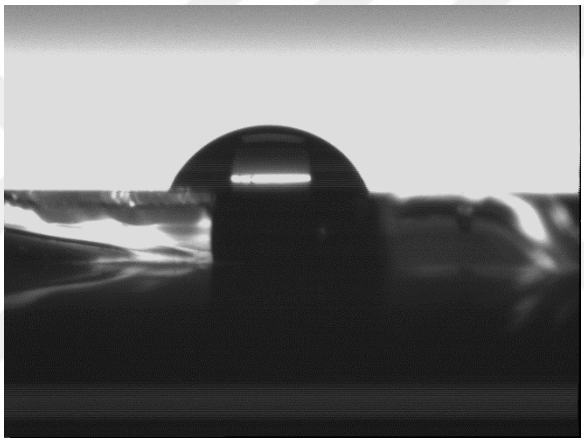
Şekil 4.7: Baskılanmamış SPR sensör yüzeyinin elipsometre görüntüsü.

4.3.3. Temas Açısı Analizleri

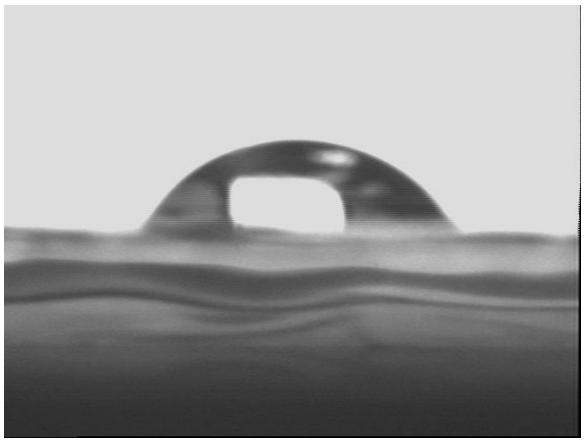
Modifiye edilmemiş boş yüzeyin, alil merkaptan ile modifiye edilmiş yüzeyin, Cu(II)-baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensör yüzeylerinin su ile yaptığı temas açıları ölçülmüştür. Şekil 4.8'de görüldüğü üzere modifiye edilmemiş yüzeyin temas açısı değeri 76.2° ± 0.3 iken alil merkaptan ile modifiye edilmiş yüzeyin temas açısı değeri 66.9° ± 1.2 olarak ölçülmüştür (Şekil 4.9). Yüzey modifikasyonu işleminde kullanılan alil merkaptanın kimyasal yapısında bulunan tiyol gruplarının varlığı temas açısı değerinde azalmaya neden olmuştur. Şekil 4.10 ve Şekil 4.11'de sırasıyla gösterilen Cu(II)-baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensör yüzeylerinin temas açısı değerleri sırasıyla 72.8°±2.3 ve 69.4° ± 2.1 olarak ölçülmüştür. Temas açısının değerinin düşmesi, yüzeyin su sevme (hidrofilik) özelliğinin arttığı anlamına gelmektedir. Baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensörlerin hazırlanması için kullanılan fonksiyonel monomeri, MAC, sistein içerikli bir malzemedir ve olup oldukça hidrofilik özelliğe sahiptir. Bu sebeple, yüzeye hidrofilik karakterde bir polimerin bağlanması, yüzeyin hidrofilik özelliğinin artmasına sebep olmuş ve temas açısı değerini düşürmüştür. Ayrıca Cu(II)-baskılanmış SPR sensör yüzeyinin temas açısının ise 72.8°'ye düşmesi yapıya su ile koordinasyon yapabilen Cu(II) iyonlarının girdiğini gösterir.



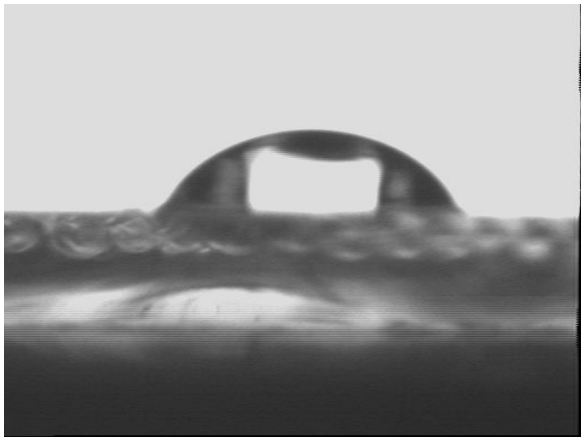
Şekil 4.8: Modifiye edilmemiş boş yüzeyin temas açısı görüntüsü.



Şekil 4.9: Alil merkaptan ile modifiye edilmiş yüzeyin temas açısı görüntüsü.



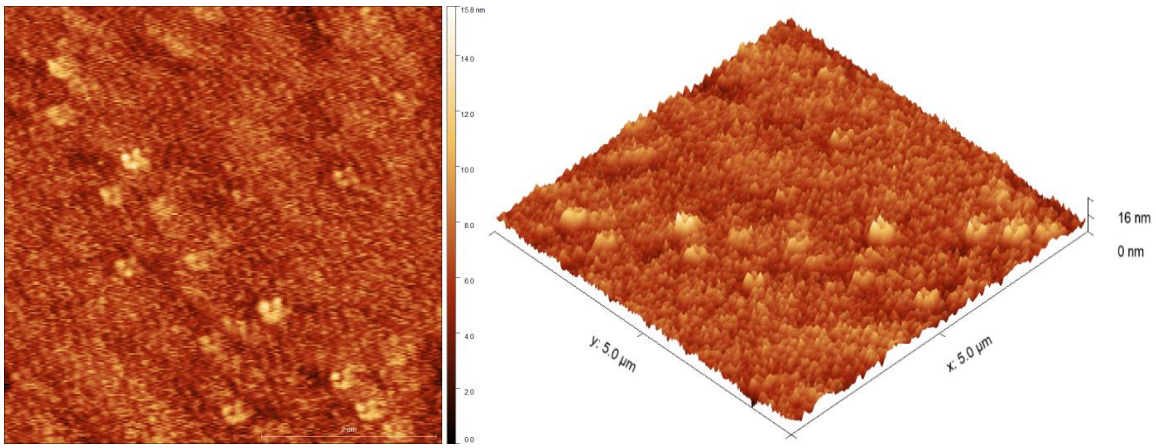
Şekil 4.10: Cu(II)-baskılanmış SPR sensör yüzeyinin temas açısı görüntüsü.



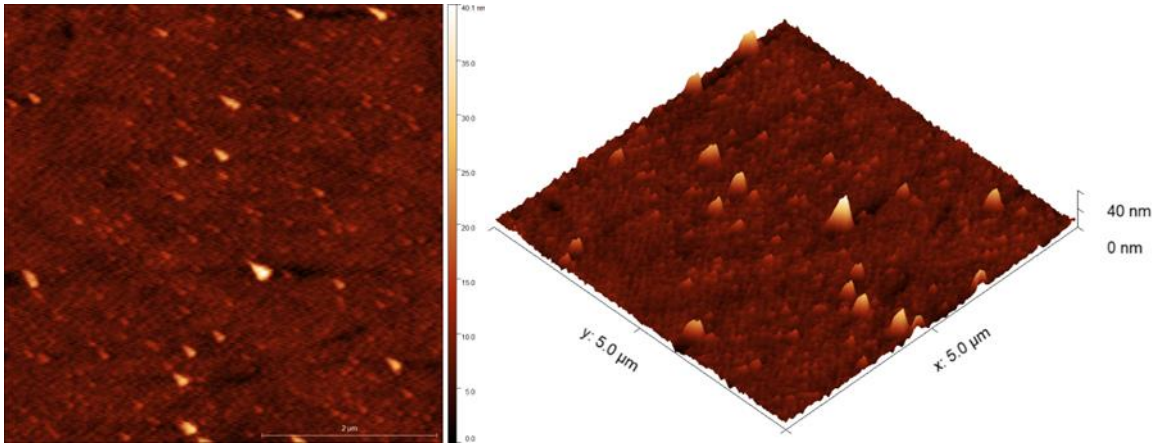
Şekil 4.11: Baskılanmamış SPR sensör yüzeyinin temas açısı görüntüsü.

4.3.4. AFM Analizleri

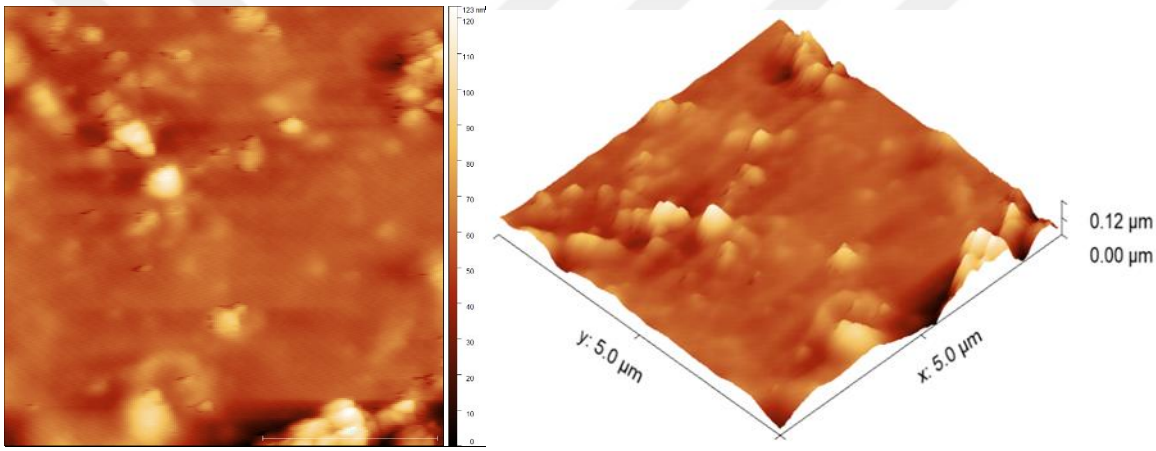
Modifiye edilmemiş boş yüzeyin, alil merkaptan ile modifiye edilmiş yüzeyin, Cu(II)-baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensör yüzeylerindeki nanofilmlerin morfolojik özellikleri AFM analizleri ile incelenmiştir. Modifiye edilmemiş boş yüzeyin, alil merkaptan ile modifiye edilmiş yüzeyin, Cu(II)-baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensör yüzeylerindeki nanofilmlerin ortalama pürüzlülük değerleri sırasıyla 1.4 ± 0.2 nm (Şekil 4.12), 2.2 ± 1.1 nm (Şekil 4.13), 5.8 ± 2.3 nm (Şekil 4.14) ve 5.1 ± 1.9 nm (Şekil 4.15) olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlar SPR sensörlerin altın yüzeylerine nanofilmlerin başarılı ve homojen bir şekilde sentezlendiğini göstermiştir.



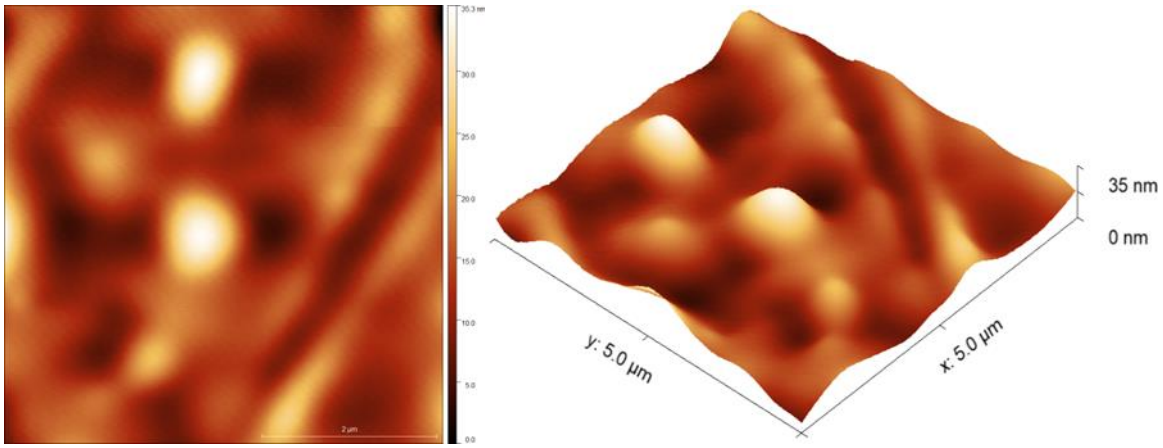
Şekil 4.12: Modifiye edilmemiş boş yüzeyin iki ve üç boyutlu AFM görüntüleri.



Şekil 4.13: Alil merkaptan ile modifiye edilmiş yüzeyin iki ve üç boyutlu AFM görüntüleri.



Şekil 4.14: Cu(II)-baskılanmış SPR sensör yüzeyinin iki ve üç boyutlu AFM görüntüleri.



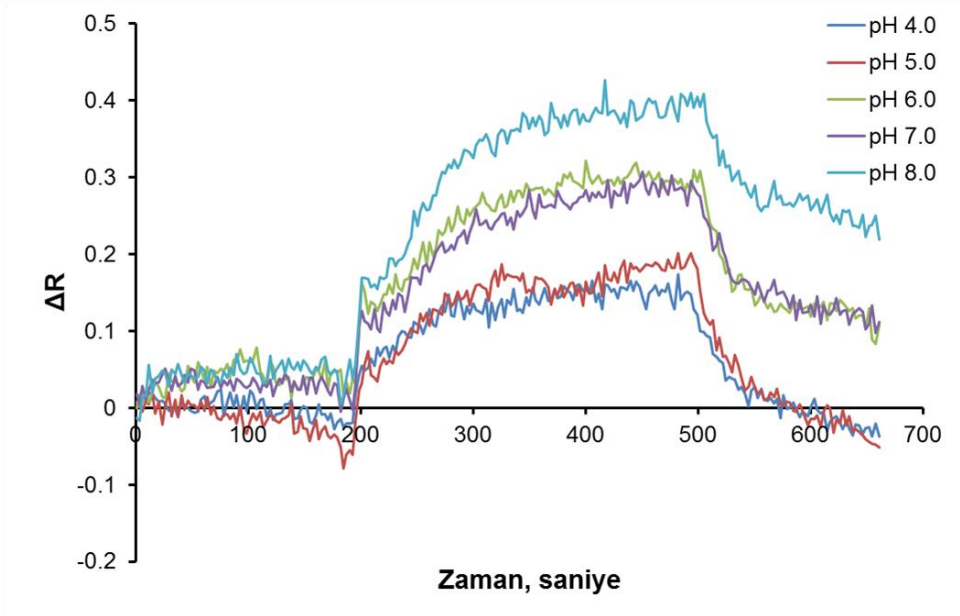
Şekil 4.15: Baskılanmamış SPR sensör yüzeyinin iki ve üç boyutlu AFM görüntüleri.

4.4. Cu(II)-BASKILANMIŞ SPR SENSÖR İLE KİNETİK ANALİZLER

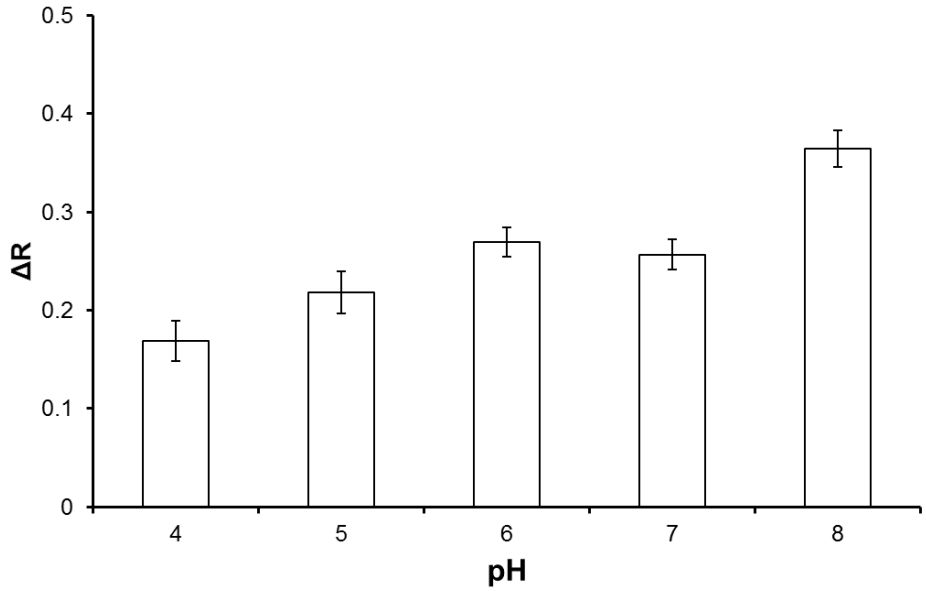
4.4.1. pH Etkisi

Cu(II)-baskılanmış SPR sensörün farklı pH ortamlarındaki performans değişikliği incelenmiştir. Bu kapsamda, beş farklı pH (4.0-8.0) değerine sahip fosfat tampon çözeltiler hazırlanmıştır. Sistem dengeye ulaştıktan 180 saniye sonra ile farklı tampon çözeltilerinde, aynı Cu(II) derişimine (4 µM) sahip örnekler sırayla 500 µL/dk akış hızında 300 saniye boyunca SPR sistemine peristaltik pompa ile verilmiştir. Rezonans frekansında meydana gelen kayma değerleri anlık olarak gözlemlenmiş ve sinyaller dengeye ulaştığında sisteme desorpsiyon çözeltisi (0,01 mM EDTA) gönderilerek Cu(II) iyonlarının ortamdan uzaklaşması sağlanmıştır.

Şekil 4.16 ve Şekil 4.17'de gösterildiği gibi elde edilen veriler ışığında maksimum kırılmanın (ΔR) pH 8.0 fosfat tamponunda olduğu gözlenmiştir. Sisteinin R grubu olan tiyol grubunun pKa'sı 8.33 olduğundan pH 8.0 fosfat tamponunda, Cu(II) ile tiyoller kuvvetli ikili koordinasyon yapmıştır. Ayrıca pH 8.0, sisteinin izoelektrik noktasının (pI 5.02) üzerinde olduğundan sistein negatif yükleneceğinden pozitif yüklü Cu(II) iyonuyla rahatça bağlanma gerçekleşir.



Şekil 4.16: Cu(II)-baskılanmış SPR sensör ile farklı pH çözeltilerinde Cu(II) iyonu tayini. Deney koşulları: $c_{Cu(II)}$ = 4 µM, T = 25°C, Akış hızı = 500 µL/dk.

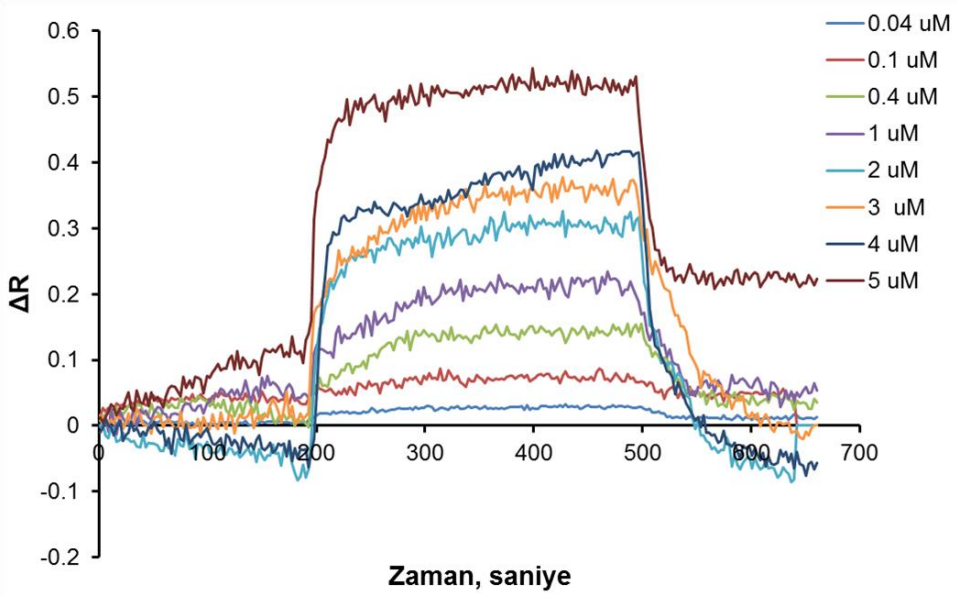


Şekil 4.17: Cu(II)-baskılanmış SPR sensör ile farklı pH çözeltilerinde Cu(II) iyonu tayini.

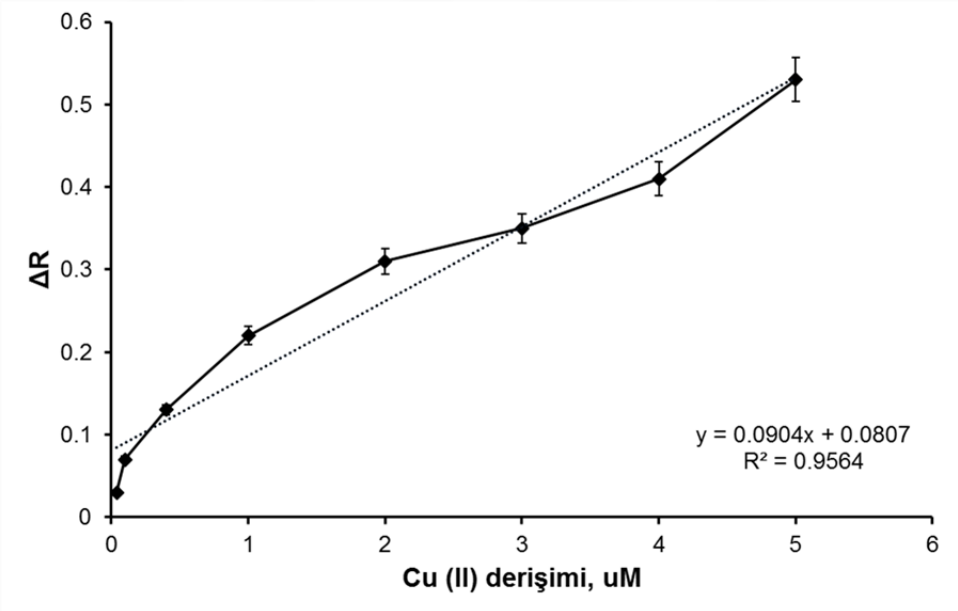
4.4.2. Derişim Etkisi

Cu(II)-baskılanmış SPR sensörün farklı derişimlerdeki Cu(II) iyonu içeren çözeltilerine verdiği performans değişikliği incelenmiştir. Bu kapsamda, sekiz farklı Cu(II) derişimi (0,04 µM-5 µM) değerine sahip örnekler maksimum kırılma değerine sahip pH 8.0 fosfat tampon çözeltisi içerisinde hazırlanmıştır. Sistem dengeye ulaştıktan 180 saniye sonra örnekler sırayla 500 µL/dk akış hızında 300 saniye boyunca SPR sistemine peristaltik pompa ile verilmiştir. Rezonans frekansında meydana gelen kayma değerleri anlık olarak gözlemlenmiş ve sinyaller dengeye ulaştığında sisteme desorpsiyon çözeltisi (0,01 mM EDTA) gönderilerek Cu(II) iyonlarının ortamdan uzaklaşması sağlanmıştır.

Şekil 4.18'de görüldüğü gibi Cu(II)-baskılanmış SPR sensör yüzeyine artan Cu(II) derişimi ile birlikte ΔR kırılma değeri artar. Buna bağlı olarak 0,04 µM-5 µM derişim aralığında kalibrasyon grafiği çizilmiş ve grafikten doğrunun denklemi y=0.0904x+0.0807 olarak elde edilmiştir. Ayrıca grafiğin doğrusallığına bağlı olarak korelasyon katsayısı R^2=0.96 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre, hazırlanan Cu(II)-baskılanmış SPR sensör 0,04 µM-5 µM aralığında %96 doğrulukta ölçüm yapmıştır (Şekil 4.19). Elde edilen veriler ışığında Cu(II)-baskılanmış SPR sensörün en düşük tayin limiti (LOD) ve en düşük miktar limiti (LOQ) değerleri 0,027 µM ve 0,09 µM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.18: Cu(II)-baskılanmış SPR sensör ile farklı derişimli çözeltilerde Cu(II) iyonu tayini. Deney koşulları: pH = 8.0, T = 25°C, Akış hızı = 500 µL/dk.



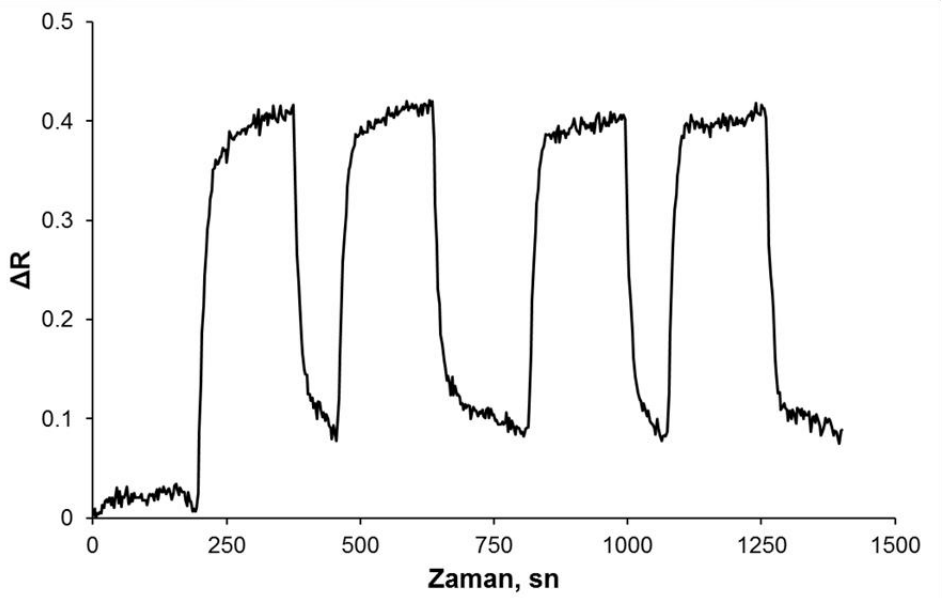
Şekil 4.19: Cu(II)-baskılanmış SPR sensörün Cu(II) iyonu tayinindeki kalibrasyon grafiği.

4.4.3. Tekrar Kullanabilirlik Analizleri

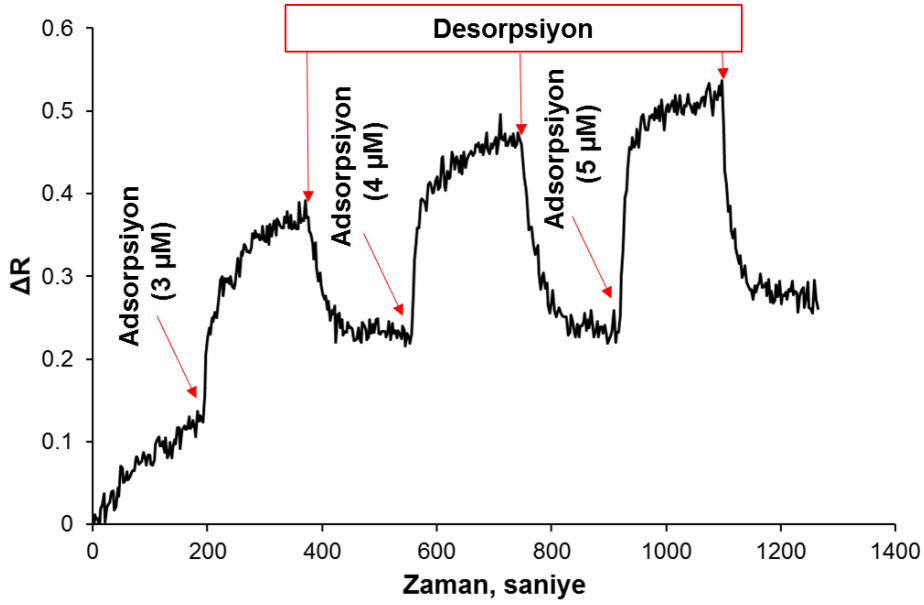
Cu(II)-baskılanmış SPR sensörün tekrar kullanılabilirliğini incelenmek amacıyla 4 µM derişiminde hazırlanmış Cu(II) iyonu örneği SPR sistemine verilmiştir. SPR sistemi 180 saniye boyunca dengeye ulaştıktan sonra, 180 saniye boyunca örnek sisteme verilmiş ve yine

180 saniye boyunca da 0,01 mM EDTA sistemden geçirilerek desorpsiyon gerçekleştirilmiştir. Bu işlemler aynı derişime sahip örnek ile peşpeşe dört kez tekrarlanmıştır. Ayrıca 3 µM, 4 µM ve 5 µM olmak üzere artan derişimde Cu(II) örnekleri sırasıyla Cu(II)-baskılanmış SPR sensör ile etkileştirilerek sensörün tekrar kullanılabilirliği incelenmiştir. Bu amaçla, sistem yine 180 saniye boyunca dengeye getirilmiş, 180 saniye boyunca 3 µM derişimde Cu(II) örneği sistemden geçirilmiş ve yine 180 saniye boyunca da 0,01 mM EDTA verilerek desorpsiyon gerçekleştirilmiştir. Hemen ardından aynı sürelerde 4 µM ve 5 µM derişimde Cu(II) örnekleri Cu(II)-baskılanmış SPR sensör ile etkileştirilerek analiz tamamlanmıştır.

Şekil 4.20'de görüldüğü gibi bağlanma bölgelerinde herhangi bir bozulma ve dolayısıyla herhangi bir performans kaybı olmaksızın sensör yüzeyi tekrar tekrar kullanılabilmektedir. Ayrıca artan derişimde Cu(II) iyon örnekleri sırasıyla Cu(II)-baskılanmış SPR sensör ile etkileştiğinde kırılma indisinin artarak değiştiği ve herhangi bir performans kaybı olmadan Cu(II) iyonu tayini yapabildiği gözlenmiştir.



Şekil 4.20: Cu(II)-baskılanmış SPR sensörün tekrar kullanımı. Deney koşulları: $c_{Cu(II)}$ = 4 µM, pH = 8.0, T = 25°C, Akış hızı = 500 µL/dk.



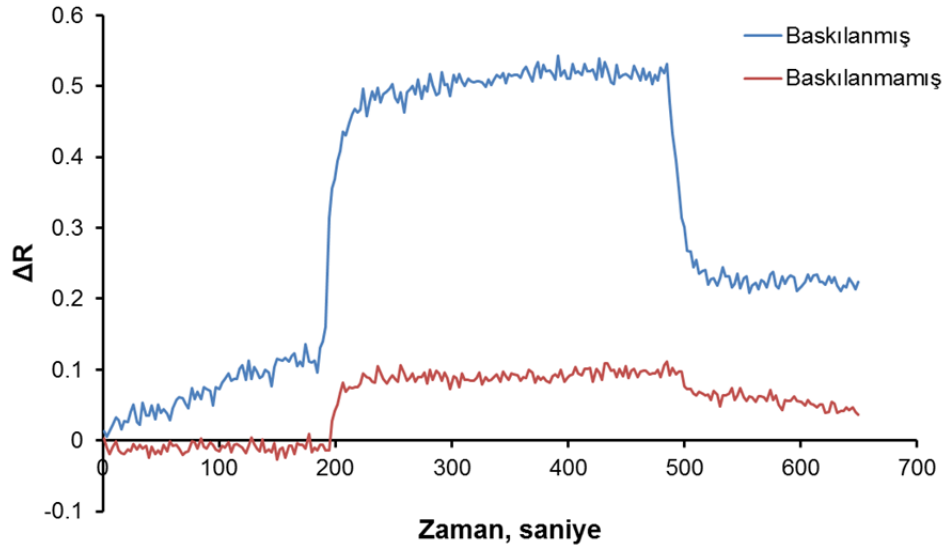
Şekil 4.21: Cu(II)-baskılanmış SPR sensörün tekrar kullanımı. Deney koşulları: $c_{Cu(II)}$ = 3 µM, 4 µM, 5 µM, pH = 8.0, T = 25°C, Akış hızı = 500 µL/dk.

4.4.4. Seçicilik Analizleri

Baskılama seçiciliğini göstermek için önce Cu(II)-baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensörler ile pH 8.0 tampon çözeltisinde hazırlanan 5 µM derişimde Cu(II) örneği ile etkileştirilmiştir. Sonrasında Fe(II), Cd(II), Li(II), Ni(II) ve Pb(II) yarışmacı ajanları kullanılarak hazırlanan örnek çözeltileri SPR sistemine verilerek Cu(II)-baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensörler ile etkileştirilmiştir. Sistem dengeye ulaştıktan 180 saniye sonra örnekler sırayla 500 µL/dk akış hızında 300 saniye boyunca SPR sistemine peristaltik pompa ile verilmiştir. Rezonans frekansında meydana gelen kayma değerleri anlık olarak gözlemlenmiş ve sinyaller dengeye ulaştığında sisteme desorpsiyon çözeltisi (0,01 mM EDTA) gönderilerek Cu(II) iyonlarının ortamdan uzaklaşması sağlanmıştır.

Baskılanmamış SPR sensörün Cu(II) iyonu tayininde ΔR değerinin 0,53'ten 0,089'a düştüğü gözlenmiştir (Şekil 4.22). Böylece, baskılanmamış SPR sensörün Cu(II) iyonu ile kayda değer bir etkileşime girmediğini sinyal şiddetinde meydana gelen azalma ile gözlemlenmiştir. Ayrıca, Fe(II), Cd(II), Li(II), Ni(II) ve Pb(II) yarışmacı ajanları kullanılarak hazırlanan çözeltiler SPR sistemine verilerek Cu(II)-baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensörler ile etkileştirilmiştir. Bu örnekler pH 8.0 tampon çözeltisinde 5 µM derişimde hazırlanmışlardır. Şekil 4.23 ve Şekil 4.24'de farklı metaller ile hazırlanmış örneklerin Cu(II)-baskılanmış ve

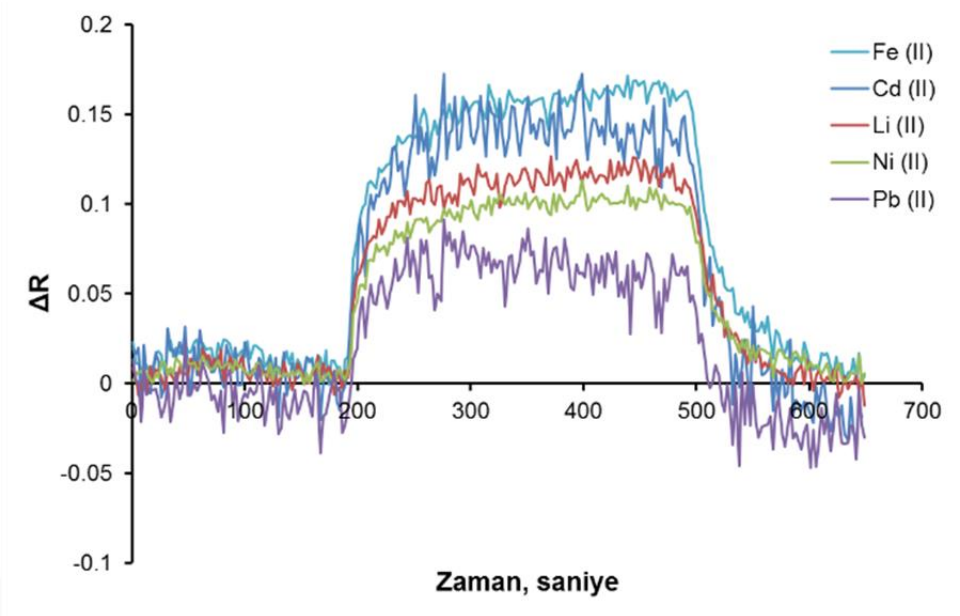
baskılanmamış SPR sensörler ile verdiği ΔR grafikleri görülür. Elde edilen sonuçlara göre Cu(II)-baskılanmış SPR sensör ile yarışmacı ajanların etkileştirildiğinde Cu(II) kalıp molekülüne göre daha düşük sinyaller verdiği gözlenmiştir. Ayrıca, yapılan seçicilik katsayısı (k) hesaplamalarına göre Cu(II)-baskılanmış SPR sensörünün Fe(II), Cd(II), Li(II), Ni(II) ve Pb(II) metallerine göre sırasıyla 3.31, 3.79, 4.82, 5.30 ve 8.83 kat olmak üzere Cu(II) metaline daha seçici olduğu görülmüştür (Şekil 4.25). Yine yapılan bağıl seçicilik katsayısı (k') hesaplarına göre Cu(II)-baskılanmış SPR sensörün baskılanmamış SPR sensöre göre sırasıyla 5.96, 3.08, 2.86, 2.50, 3.03 ve 2.61 kat daha seçici olduğu görülmüştür. Seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları Tablo 4.1'de gösterilmiştir.



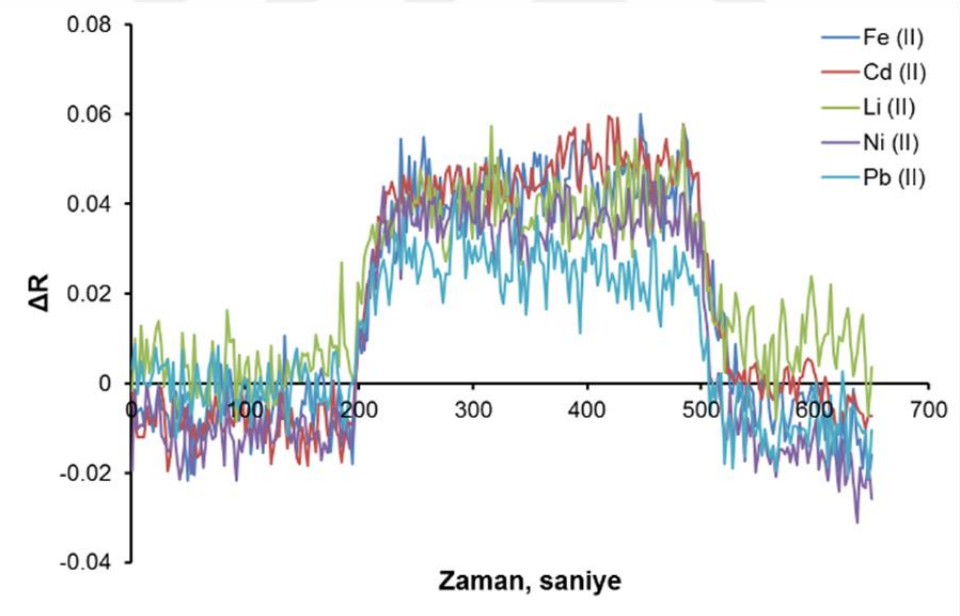
Şekil 4.22. Cu(II)-baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensörlerin Cu(II) iyon tayini. Deney koşulları: $c_{Cu(II)}$ = 5 µM, pH = 8.0, T = 25°C, Akış hızı = 500 µL/dk.

Tablo 4.1: Seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları.

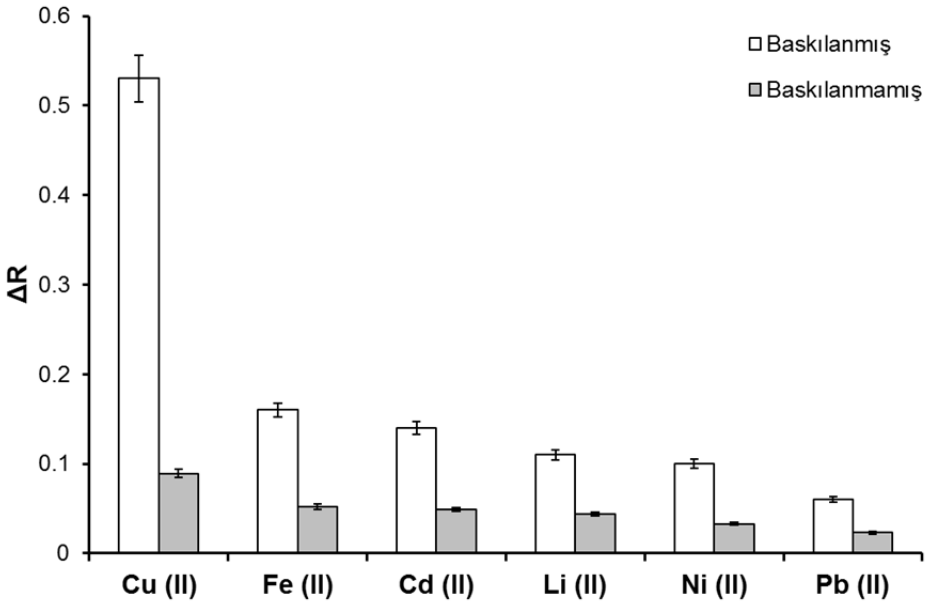
	Baskılanmış		Baskılanmamış		
	ΔR	k	ΔR	k	k'
Cu (II)	0.53		0.089		
Fe (II)	0.16	3.31	0.052	1.71	3.08
Cd (II)	0.14	3.79	0.049	1.82	2.86
Li (II)	0.11	4.82	0.044	2.02	2.5
Ni (II)	0.1	5.3	0.033	2.7	3.03
Pb (II)	0.06	8.83	0.023	3.87	2.61



Şekil 4.23: Cu(II)-baskılanmış SPR sensörün yarışmacı iyonlar ile seçicilik analizi. Deney koşulları: c_{iyon} = 5 µM, pH = 8.0, T = 25°C, Akış hızı = 500 µL/dk.



Şekil 4.24: Baskılanmamış SPR sensörün yarışmacı iyonlar ile seçicilik analizi. Deney koşulları: c_{iyon} = 5 µM, pH = 8.0, T = 25°C, Akış hızı = 500 µL/dk.

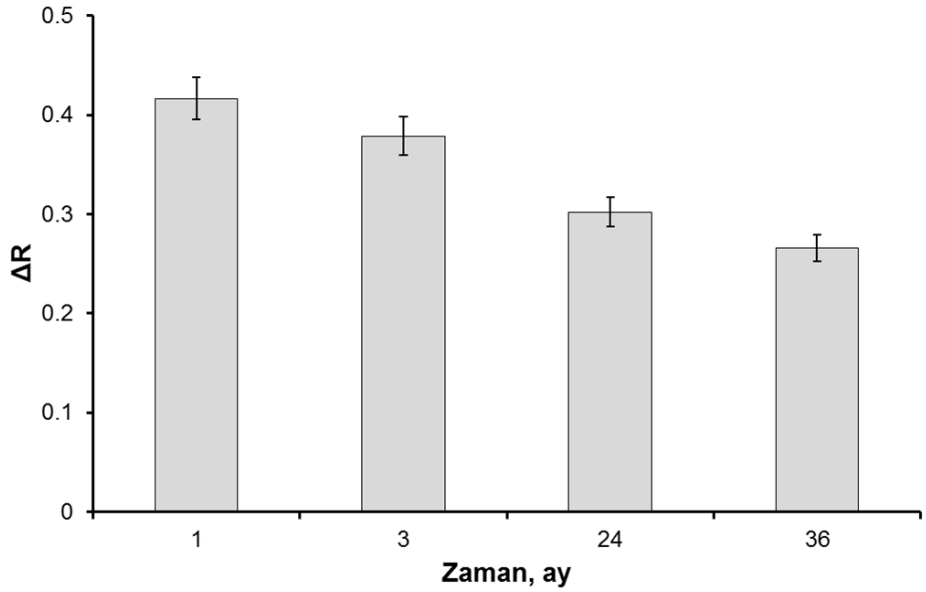


Şekil 4.25: Cu(II)-baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensörlerin seçicilik analizleri.

4.4.5. Raf Ömrü Analizleri

Cu(II)-baskılanmış SPR sensörün dayanıklılığını göstermek için raf ömrü analizleri yapılmıştır. Bunun için oda sıcaklığında kapalı şekilde saklanan Cu(II)-baskılanmış SPR sensörün daha sonraki ölçümlerde herhangi bir performans kaybı olup olmadığı araştırılmıştır. Farklı zamanlarda (1, 3, 24, 36 ay) aynı Cu(II) derişimi (4 µM) ile örnekler hazırlanmış ve sensör ile etkileştirilmiştir. Sistem dengeye ulaştıktan 180 saniye sonra örnekler sırayla 500 µL/dk akış hızında 300 saniye boyunca SPR sistemine peristaltik pompa ile verilmiştir. Rezonans frekansında meydana gelen kayma değerleri anlık olarak gözlemlenmiş ve sinyaller dengeye ulaştığında sisteme desorpsiyon çözeltisi (0,01 mM EDTA) gönderilerek Cu(II) iyonlarının ortamdan uzaklaşması sağlanmıştır..

Şekil 4.26'da görüldüğü gibi Cu(II)-baskılanmış SPR sensörün yanıtı geçen 36 aylık sürede sadece 0,42'den 0,26'e düştüğü görülmüş ve performans kaybı %38 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuca göre, Cu(II)-baskılanmış SPR sensörü, tolere edilebilir bir performans kaybı ile Cu(II) iyonlarının tayini için uzun süre kullanılabilir.

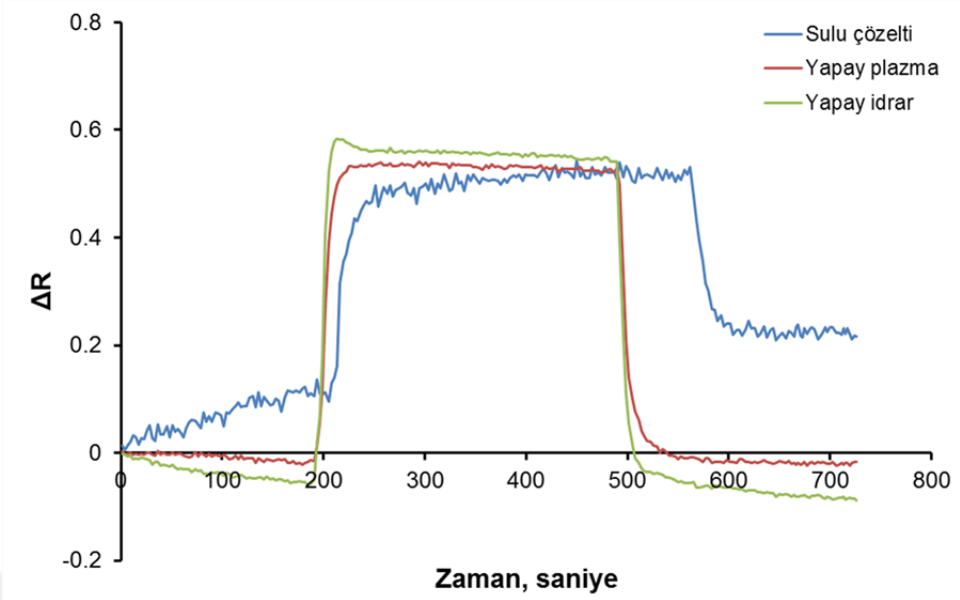


Şekil 4.26: Cu(II)-baskılanmış SPR sensörün raf ömrü analizi. Deney koşulları: $c_{Cu(II)}$ = 4 µM, pH = 8.0, T = 25°C, Akış hızı = 500 µL/dk.

4.4.6. Yapay Örnek Analizleri

Cu(II)-baskılanmış SPR sensörün gerçek örneklerde kullanılabilir olduğunun anlaşılabilmesi için yapay plazma ve idrar örnekleri hazırlanmıştır. pH 8.0 tampon çözeltisinde 5 µM derişimde Cu(II) örneği hazırlamak için yapay plazma ve idrar örneklerinin her birinden 10 µL alınmıştır. Örnekler sırası ile SPR sistemine verilerek Cu(II)-baskılanmış SPR sensör ile etkileştirilmiştir. Sistem dengeye ulaştıktan 180 saniye sonra örnekler sırayla 500 µL/dk akış hızında 300 saniye boyunca SPR sistemine peristaltik pompa ile verilmiştir. Rezonans frekansında meydana gelen kayma değerleri anlık olarak gözlemlenmiş ve sinyaller dengeye ulaştığında sisteme desorpsiyon çözeltisi (0,01 mM EDTA) gönderilerek Cu(II) iyonlarının ortamdan uzaklaşması sağlanmıştır.

Şekil 4.27'de görüldüğü gibi Cu(II)-baskılanmış SPR sensör ile yapay plazma ve yapay idrar örneklerinden Cu(II) tayini gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler ışığında Cu(II)-baskılanmış SPR sensörün sadece sulu çözelti ortamında değil yapay plazma ve/veya yapay idrar gibi kompleks ortamlarda da Cu(II) tayini gerçekleşebileceğini göstermiştir. Aynı ortamda bulunan diğer moleküller Cu(II)-baskılanmış SPR sensörün bağlanma bölgelerinde deformasyon oluşturmadığı ve tayin performansında herhangi bir kayıp olmadığı gözlenmiştir.

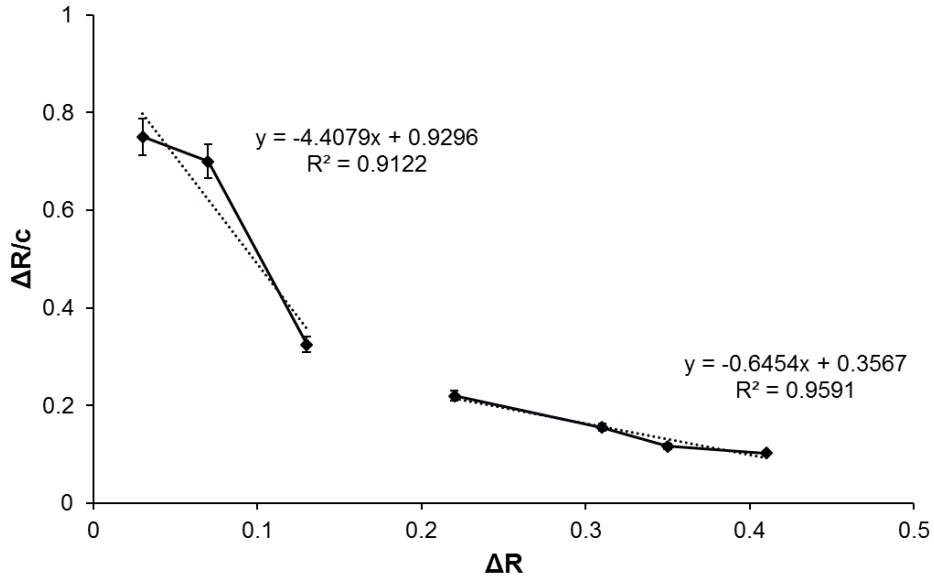


Şekil 4.27: Cu(II)-baskılanmış SPR sensörün yapay örnek analizi. Deney koşulları: $c_{Cu(II)}$ = 5 µM, pH = 8.0, T = 25°C, Akış hızı = 500 µL/dk.

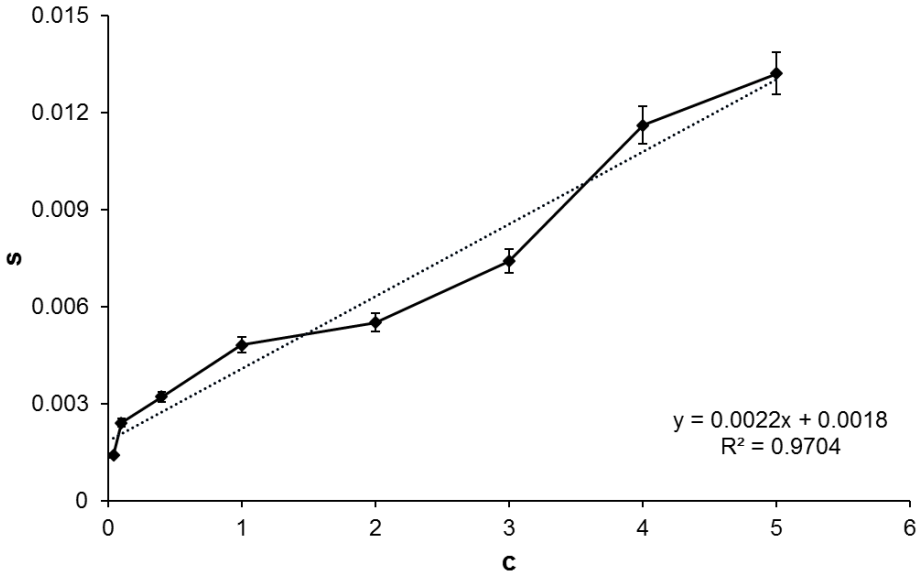
4.5. SPR SENSÖRÜN MATEMATİKSEL ANALİZLERİ

4.5.1. Denge ve Bağlanma Kinetik Analizleri

Cu(II)-baskılanmış SPR sensörün farklı Cu(II) derişimleri analizinden elde edilen veriler ışığında Şekil 4.28 ve Şekil 4.29'de denge ve bağlanma kinetik analizleri için grafikler çizilmiştir. Bu grafiklere ait ΔR_{maks}, k_a, k_d, K_A ve K_D kinetik sabitleri Tablo 4.2'te gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre, denge analiz yaklaşımı Scatchard'da hesaplanan teorik ΔR_{maks} değerinin (0,55) deneysel elde edilen ΔR_{maks} değerine (0,53) oldukça yakın olduğu görülmüştür. Aynı şekilde bağlanma analiz sonucuna göre de Cu(II) iyonunun Cu(II)-baskılanmış SPR sensör yüzeyin %97 doğrulukta bağlandığı görülmüştür.



Şekil 4.28: Denge analiz (Scatchard) yaklaşımı.



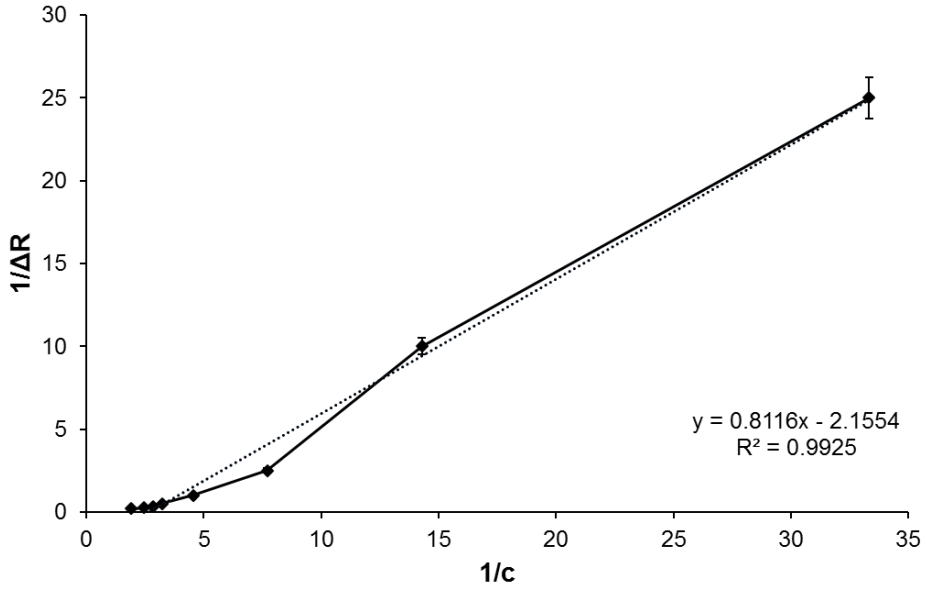
Şekil 4.29: Bağlanma kinetik yaklaşımı.

4.5.2. Adsorpsiyon İzoterm Modelleri

Cu(II)-baskılanmış SPR sensörü ile Cu(II) iyon çözeltisi arasında meydana gelen etkileşimin türünü belirlemek amacıyla iki farklı izoterm modeli (Langmuir ve Freundlich) uygulanmıştır. Şekil 4.30 ve Şekil 4.31'e göre deneyler sonucu olarak elde edilen veriler ile Cu(II) iyonu tayinine en uygun model Langmuir adsorpsiyon izoterm modeli (R^2=0.9925) olduğu

görülmüştür. Bu sonuçlar ışığında, hazırlanan Cu(II)-baskılanmış SPR sensör yüzeyine kaplanan nanofilmin Cu(II) iyonu bağlanma özelliklerinin minimum yanal etkileşimli, homojen dağılımlı, eş enerjili ve tek tabakalı olduğunu göstermektedir.

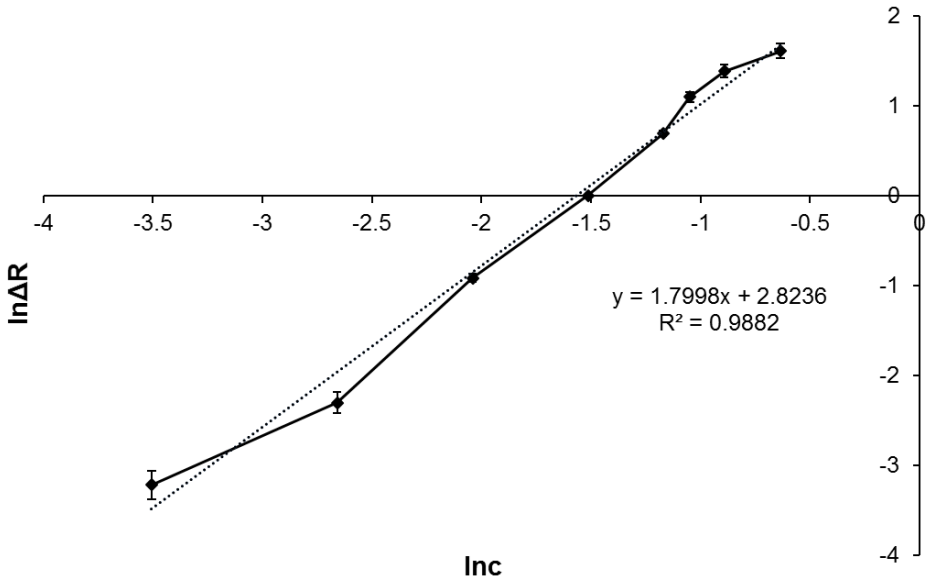
Bu grafiklerden hesaplanan ΔR_{maks}, k_a, k_d, K_A ve K_D kinetik sabitleri Tablo 4.2'de özetlenmiştir. Tablo incelendiğinde de elde edilen sabitler ile Langmuir adsorpsiyon izoterm modelinde hesaplanan teorik ΔR_{maks} değerinin (0,46) deneysel elde edilen ΔR_{maks} değerine (0,53) oldukça yakın olduğu görülmüş, bu da Langmuir modelinin hazırlanan SPR sensöre en uygun adsorpsiyon izoterm modeli olduğunu doğrulamıştır. Ayrıca, matematiksel hesaplamalara göre elde edilen korelasyon katsayıları karşılaştırıldığında Langmuir adsorpsiyon izoterm modelinde Freundlich adsorpsiyon izoterm modeline göre daha yüksek bir korelasyon katsayısına sahip olduğu görülmüştür.



Şekil 4.30: Langmuir adsorpsiyon izoterm modeli.

Tablo 4.2: Kinetik sabitleri.

Denge analiz (Scatchard)		Bağlanma kinetik analizi		Langmuir		Freundlich	
ΔR_{maks}	0.55	k_a, $\mu M^{-1}.s^{-1}$	0.002	ΔR_{maks}	0.46	ΔR_{maks}	16.84
K_A, μM^{-1}	0.65	k_d, s^{-1}	0.002	K_D, μM	0.38	1/n	1.8
K_D, μM	1.55	K_A, μM^{-1}	1.22	K_A, μM^{-1}	2.66	R^2	0.98
R^2	0.96	K_D, μM	0.82	R^2	0.99		
		R^2	0.97				



Şekil 4.31: Freundlich adsorpsiyon izoterm modeli.

4.6. LİTERATÜR KARŞILAŞTIRMASI

İnsan vücudu için önemli metallerden olmasından dolayı bakırın tespiti oldukça önemlidir. Bakırın tespiti için birçok sensör tipi geliştirilmiştir. Son yirmi yılda sensörlere yönelik çalışmaların artmasının nedenlerinden bazıları düşük tespit limiti, seçicilik, tekrar

kullanılabilirlik gibi farklı parametrelere sahip olması ve başka yöntemler ile birleştirilebilir olmasıdır. Tablo 4.3'de farklı sensör tiplerinin, bakır tespiti için kullanılmasından oluşan karşılaştırma tablosu bulunmaktadır.

Tablo 4.3: Bakır tayininde kullanılan sensörler ile bu çalışmanın karşılaştırılması.

Kaynak	Sensör Tipi	Tespit Aralığı	Tayin Limiti	Seçicilik	Tekrar	Gerçek Örnek
[248]	Elektrokimyasal	3×10^{-10}-1.5×10^{-7} M	6.8×10^{-11} M	Ca^{+2}, Mg^{+2}, Zn^{+2}	7	Süt
[249]	Elektrokimyasal	5×10^{-6}-1×10^{-1} M	0,3 ppm	Hg^{+2}, Ag^{+}	>4 ay	-
[250]	Elektrokimyasal	0,02-1 mmol/L	0,02 mmol/L	Ni^{+2}, Zn^{+2}, Co^{+2}, Na^{+2}	10	Su
[251]	Optik	0,1 nM-5 µm	0,082 nM	Hg^{+2},Cd^{+2}, Pb^{+2}, Ni^{+2}, Cr^{+2}	9 gün	Su
[252]	Optik	5×10^{-7} M	0,27 µM	K^{+}, Na^{+}, NH_4^{+}, Hg^{+2}, Ni^{+2}, Ba^{+2}, Cr^{+2},Pb^{+2}, Mn^{+2}, Ag^{+}, Co^{+2}, Al^{+3}, Cd^{+2}, Fe^{+3},Pd^{+2}, Mg^{+2}, Ca^{+2}, Zn^{+2}	5	Atık su
[27]	Optik	-	15 nM	Na^{+}, K^{+}, Li^{+}, Ca^{+2},Mg^{+2}, Ba^{+2}, Ag^{+}, Cd^{+2}, Co^{+2}, Ni^{+2}, Pb^{+2}, Hg^{+2}, Mn^{+2},Zn^{+2}, Fe^{+3}, Cr^{+3}, Al^{+3}	-	Canlı hücre
[253]	Optik	0-1,2×10^{-3} ve 3,9×10^{-3}-47,3 nM	54 nM	Na^{+}, K^{+}, Ca^{+2}, Mn^{+2},Co^{+2}, Fe^{+2}, Fe^{+3}, Zn^{+2}, Al^{+3}, Cr^{+6}, As^{+5}, Cd^{+2}, Zn^{+2}, Pb^{+2}, Hg^{+2}	> 21 gün	Su
[254]	Optik	0,05-30 µM	3,6 nM	K^{+}, Ca^{+2}, Cd^{+2}, Zn^{+2},Mg^{+2},Mn^{+2} Pb^{+2},Hg^{+2}, Fe^{+3}, Cr^{+3}	-	Çay ve tavuk yemi
[255]	Optik	8-200 nM	3,9 nM	Co^{+2}, Ca^{+2}, Fe^{+3}, Ni^{+2},Zn^{+2}, Mn^{+2}, Pb^{+2},Hg^{+2}, Mg^{+2}	10	Su
[256]	Optik	0,1-200 µM	0,1 µM	Fe^{+2}, Na^{+}, K^{+}, Mg^{+2},Mn^{+2},Ca^{+2}	7 gün	Musluk suyu

[257]	Optik	10 nM-7,7 µM	10 nM	K^{+}, Na^{+}, Ca^{+2}, Ag^{+},Mg^{+2}, Co^{+2}, Ni^{+2},Mn^{+2},Zn^{+2}, Cd^{+2}, Pb^{+2}, Cr^{+3}, Hg^{+2}, Al^{+3}, Fe^{+3}	-	Nehir, musluk, göl ve kaynak suyu
[52]	Piezoelektrik	0,001-50 µM	8×10^{-4} µM	Na^{+}, Ca^{+2}, Cd^{+2}, Pb^{+2},Zn^{+2},Mg^{+2}, Cr^{+3}, K^{+}	7 döngü	Kirli su
[258]	Elektrokimyasal	0,5-30 nmol/L	42,4 pmol/L	K^{+}, Na^{+}, Mg^{+2}, Ca^{+2}, Fe^{+3}, Al^{+3}, Cr^{+3},Mn^{+2},Hg^{+2}, Cd^{+2},Ni^{+2},Zn^{+2}, Co^{+2}, Pb^{+2}, Ag^{+}	-	Akan su, limon suyu, yağmur suyu, bira, yiyecek
[259]	Optik	1-100 mg/L	-	Zn^{+2},Mn^{+2},Ni^{+2}, Fe^{+2},Fe^{+3},I,Pb^{+2}, Al^{+3},Mg^{+2},Ca^{+2}, K^{+}, Na^{+}	-	Patates
[260]	Optik	1-100 µM	1 µM	Zn^{2+},Cd^{2+}, Pb^{2+}, Hg^{2+}	-	-
[261]	Optik	0-0,2 mM	0,33 µM	Cr^{+3}, Ba^{+2}, Ca^{+2}, Cd^{+2}, Co^{+2}, K^{+}, Mn^{+2},Ni^{+2}, Pb^{+2}, Zn^{+2}, Fe^{+3}, Ag^{+}, Hg^{+2}	21 gün	Yağmur suyu
[262]	Elektrokimyasal	80 nM-20 µM	12 nM	Pb^{2}, Cd^{2}, Mg^{2}, Co^{2}, Mn^{2}, Ni^{2}, Zn^{2}, Hg^{2}, Dy^{3}, Gd^{3}, Tb^{3}	-	Yağmur suyu
[263]	Piezoelektrik	15,6 -500 µM	3,1 µM	Na^{+}, K^{+}, Mg^{+2}, Ca^{+2},Pb^{+2}, Cd^{+2}, Zn^{+2},Fe^{+2},Mn^{+2}, Hg^{+2},Ni^{+2}, Co^{+2}, Al^{+3}, Fe^{+3}, Cr^{+3}	>1 ay	İçme suyu
[264]	Elektrokimyasal	10^{-14}-10^{-2} M	10^{-14} M	-	-	-
[265]	Optik	0,08-1,44 µM	0,16 µM	Mn^{+2},Mo^{+3},Na^{+}, Cr^{+3},Hg^{+2}, Ni^{+2}, Ca^{+2}, K^{+}, Cs^{+}, Li^{+},As^{+}, PO_4^{-3}, NH_4, NO_3^{-}	-	Musluk ve havuz suyu
Bu çalışma	**Optik**	**0,04-5 µM**	**0,027 µM**	**Fe^{+2},Cd^{+2}, Li^{+2}, Ni^{+2}, Pb^{+2}**	**4 kez**	**Yapay idrar ve plazma**

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

• Fonksiyonel monomer, L-sistein ve metakriloil klorür varlığında sentezlenmiş ve karakterizasyonu yapılmıştır. FTIR-ATR analizi sonucunda monomer 3330 cm^{-1} civarında –NH ve 2987 cm^{-1} civarında –SH bandına sahiptir. 1653 cm^{-1} ve 1521 cm^{-1}'de ise amid I ve amid II bantları gözlenmiştir. Bu sonuçlar literatürdeki sonuçlara uygunluk gösterdiği rapor edilmiştir.

• Kalıp molekül olan Cu(II) iyon kaynağı ve fonksiyonel monomer olan MAC oranı 2.0:1.0 şeklinde UV spektrofotometrik yöntem ile belirlenerek sistemin bu oranda doygunluğa ulaştığı gözlenmiş ve bu orana göre ön-kompleks hazırlanmıştır. Polimerizasyon işleminde, Cu(II)-baskılanmış nanofilmi sentezlemek için HEMA ko-monomer, EGDMA çapraz bağlayıcı ve AIBN başlatıcı olarak kullanılmıştır. Tüm bu işlem basamakları Cu(II) olmadan tekrarlanarak baskılanmamış nanofilm de hazırlanmıştır.

• Hazırlanan SPR sensörlerin yüzeylerindeki nanofilmlerin karakterizasyon çalışmaları, FTIR-ATR, elipsometre, temas açısı ve AFM kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre baskılanmış nanofilmlerin FTIR-ATR spektrum sonuçlarına göre 1716 cm^{-1}'deki bandın sinyal şiddetinin artması ve kayması, 1024 cm^{-1}'deki koordine olmuş –S-Cu bağlarının 1153 cm^{-1}'e kayması polimerleşmenin gerçekleştiğini göstermiştir.

• Elipsometre analizi sonuçlarına göre alil merkantan ile modifiye edilmiş yüzey, Cu(II)-baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensör yüzeylerin kalınlıkları sırasıyla 75.1 ± 2.7 nm, 87.6 ± 2.6 nm ve 82.5 ± 2.9 nm olarak belirlenmiştir. Bu yüzey kalınlığındaki artış polimerleşmenin başarıyla gerçekleştiğini göstermektedir.

• Temas açısı analizlerinde ise modifiye edilmemiş boş yüzeyin temas açısı değeri 76.2° ± 0.3 iken, alil merkaptan ile modifiye edilmiş yüzeyinin temas açısı değeri 66.9° ± 1.2 bulunmuştur. Değerin hidrofilik tiyol modifikasyonuyla azaldığı gözlenmiştir. Cu(II)-baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensör yüzeylerinin temas açısı değerleri sırasıyla 72.8° ± 2.3 ve 69.4° ± 2.1 olarak ölçülmüştür. Temas açısı değerinin düşmesi, polimerizasyon ile yüzeyin hidrofilik karakterininin arttığının göstergesidir.

• Modifiye edilmemiş boş yüzey, alil merkaptan ile modifiye edilmiş yüzey, Cu(II)-baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensör yüzeylerin AFM analizlerindeki ortalama pürüzlülük değerleri sırasıyla 1.4 ± 0.2 nm, 2.2 ± 1.1 nm, 5.8 ± 2.3 nm ve 5.1 ± 1.9 nm olarak ölçülmüştür.

• Hazırlanan nanofilm temelli SPR sensörleri seçicilik, raf ömrü, tekrar kullanılabilirlik, kinetik ve yapay örnek analizleri için kullanılmıştır. Elde edilen kinetik veriler ışığında adsorpsiyon izoterm modelleri ile matematiksel hesaplamalar yapılmıştır.

• Bu amaçla ilk olarak farklı (4.0-8.0) pH aralıklarında Cu(II)-baskılanmış SPR sensörün performansı incelenmiştir. Elde edilen veriler ışığında maksimum kırılmanın (ΔR) pH 8.0 fosfat tamponunda olduğu gözlenmiştir. Bu da, nanofilmin yüzeyindeli sisteinin R grubu olan tiyol grubunun Cu(II) ile kuvvetli ikili koordinasyon yaptığını göstermiştir. Ayrıca pH 8.0, sisteinin izoelektrik noktasının (pI 5.02) üzerinde olduğundan sistein negatif yükleneceğinden pozitif yüklü Cu(II) iyonuyla rahatça bağlanma gerçekleşmiştir.

• Hazırlanan Cu(II)-baskılanmış SPR sensörün 0,04 µM-5 µM derişim aralığında artan Cu(II) derişimi ile birlikte ΔR kırılma değerinin arttığı ve bu aralıktan elde edilen kalibrasyon grafikteki doğrunun y=0.0904x+0.0807 denklemi ile %96 doğrulukta ölçüm yapabildiği rapor edilmiştir. En düşük tayin limiti, 0,027 µM olarak hesaplanmıştır.

• Cu(II)-baskılanmış SPR sensörün tekrar kullanılabilirliğini incelenmek amacıyla iki ayrı analiz yapılmıştır. Birincisinde, 4 µM derişiminde Cu(II) iyonu örneği peşpeşe dört kez SPR sistemine verilmiştir. İkincisinde de 3 µM, 4 µM ve 5 µM olmak üzere artan derişimde Cu(II) örnekleri sırasıyla SPR sistemine verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre bağlanma bölgelerinde herhangi bir bozulma ve dolayısıyla herhangi bir performans kaybı olmaksızın Cu(II)-baskılanmış SPR sensörün tekrar tekrar kullanılabileceği gösterilmiştir.

• Seçicilik çalışmaları için aynı derişimdeki Fe(II), Cd(II), Li(II), Ni(II) ve Pb(II) iyonları Cu(II)-baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensörler ile etkileştirilmiş ve baskılanmamış SPR sensörün Cu(II) iyonu tayininde ΔR değerinin 0,53'ten 0,089'a düştüğü gözlenmiştir.

• Buna ek olarak, Fe(II), Cd(II), Li(II), Ni(II) ve Pb(II) iyonlarının Cu(II)-baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensörler ile verdiği sonuçlara göre bu iyonların Cu(II) kalıp molekülüne göre daha düşük sinyaller verdiği gözlenmiş ve yapılan seçicilik katsayısı (k) hesaplamalarına

göre Cu(II)-baskılanmış SPR sensörünün Fe(II), Cd(II), Li(II), Ni(II) ve Pb(II) iyonlarına göre sırasıyla 3.31, 3.79, 4.82, 5.30 ve 8.83 kat olmak üzere Cu(II) metaline daha seçici olduğu görülmüştür. Yine yapılan bağıl seçicilik katsayısı (k') hesaplarına göre Cu(II)-baskılanmış SPR sensörün baskılanmamış SPR sensöre göre sırasıyla 5.96, 3.08, 2.86, 2.50, 3.03 ve 2.61 kat daha seçici olduğu görülmüştür.

• Hazırlanan Cu(II)-baskılanmış SPR sensörün dayanıklılığını göstermek için raf ömrü analizleri için farklı zamanlarda (1, 3, 24, 36 ay) aynı Cu(II) derişimi (4 μM) ile örnekler hazırlanmış ve sensör ile etkileştirilmiştir. Cu(II)-baskılanmış SPR sensörün yanıtı geçen 36 aylık sürede sadece 0,42'den 0,26'e düştüğü görülmüş ve performans kaybı %38 olarak hesaplanmıştır.. Bu sonuca göre, Cu(II)-baskılanmış SPR sensörü, tolere edilebilir bir performans kaybı ile Cu(II) iyonlarının tayini için uzun süre kullanılabileceği gösterilmiştir.

• Hazırlanan Cu(II)-baskılanmış SPR sensör ile yapay plazma ve yapay idrar örneklerinden Cu(II) tayini gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler ışığında Cu(II)-baskılanmış SPR sensörün sadece sulu çözelti ortamında değil yapay plazma ve/veya yapay idrar gibi kompleks ortamlarda da Cu(II) tayini yapabildiğini göstermiştir. Aynı ortamdaki diğer moleküller Cu(II)-baskılanmış SPR sensörün bağlanma bölgelerinde deformasyon oluşturmadığı ve tayin performansında herhangi bir kayıp olmadığı gözlenmiştir.

• Cu(II)-baskılanmış SPR sensörün farklı Cu(II) derişimlerinin deneysel analizinden elde edilen veriler denge ve bağlanma kinetik analizleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, denge analiz yaklaşımı Scatchard'da hesaplanan teorik ΔR_{maks} değerinin (0,55) deneysel elde edilen ΔRmaks değerine (0,53) oldukça yakın olduğu görülmüştür. Aynı şekilde bağlanma analiz sonucuna göre de Cu(II) iyonunun Cu(II)-baskılanmış SPR sensör yüzeyin %97 doğrulukta bağlandığı görülmüştür.

• Cu(II)-baskılanmış SPR sensörü ile Cu(II) iyon çözeltisi arasındaki etkileşim modelini belirlemek amacıyla iki farklı izoterm modeli kullanılmıştır. Deneysel olarak elde edilen sonuçlar ile Cu(II) iyonu tayinine en uygun adsorpsiyon izoterm modelinin Langmuir adsorpsiyon izoterm modeli (R^2=0.9925) olduğu görülmüştür. Böylece, Cu(II)-baskılanmış SPR sensör yüzeyindeki nanofilmin Cu(II) iyonu bağlanma bölgesi özelliklerinin homojen dağılımlı, eş enerjili, minimum yanal etkileşimli ve tek tabakalı olduğunu göstermektedir. Ayrıca yapılan hesaplamalar ile elde edilen sabitler incelendiğinde Langmuir adsorpsiyon

izoterm modelindeki teorik ΔR_{maks} değerinin (0,46) deneysel elde edilen ΔR_{maks} değerine (0.53) oldukça yakın olduğu görülmüş, bu da Langmuir modelinin hazırlanan SPR sensöre en uygun adsorpsiyon izoterm modeli olduğunu doğrulamıştır.

• Bakır, insan vücudunda eser miktarda olması gereken enzimatik reaksiyonlarda görev alan bir elementtir. Bu denli önemli olmasına rağmen vücutta aşırı birikimine bağlı olarak gelişen çeşitli sağlık problemleri vardır. Wilson hastalığı bakırın aşırı birikimine bağlı olarak gelişen, ilk olarak karaciğeri etkileyen otozamal resesif geçişli genetik bir hastalıktır. Wilson hastalığının erken dönemlerinde tespit edilmesi hastalığın seyrini etkileyen ana faktörlerden biridir. Bu nedenle vücuttaki bakırın fazla miktarının ölçülmesi önem arz etmektedir. Moleküler baskılama yöntemi temelli bakır tayini için sensör geliştirilmesine dayalı literatürde az sayıda çalışma bulunmaktadır.

• Yapılan çalışmanın, idrar ve plazmasında bakır iyonlarının varlığının tespitine bir alternatif olacağı ve böylece gerçek zamanlı ve hızlı tespit ile bu problemin önüne geçilmesine katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Mohr, I. and Weiss, K.H., 2019, Biochemical markers for the diagnosis and monitoring of wilson disease, *Clin biochem rev*,. **40**(2): p. 59-77.

2. Li, Z., et al., 2021, A dicyanomethylene-4H-pyran-based fluorescence probe with high selectivity and sensitivity for detecting copper (II) and its bioimaging in living cells and tissue, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and biomolecular spectroscopy*, **244**: p. 118819.

3. Mi, X., et al., 2020, Activation of HIF-1 signaling ameliorates liver steatosis in zebrafish atp7b deficiency (Wilson's disease) models, *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease,* **1866**(10): p. 165842.

4. Horn, N., et al., 2019, Chelating principles in Menkes and Wilson diseases: Choosing the right compounds in the right combinations at the right time, J*ournal of inorganic biochemistry,* **190**: p. 98-112.

5. Pan, J., et al., 2021, A novel dibenzimidazole-based fluorescent probe with high sensitivity and selectivity for copper ions, *Journal of photochemistry and photobiology a: Chemistry,* **406**: p. 113018.

6. Hong, Y., et al., 2018, High sensitive detection of copper II ions using D-penicillamine-coated gold nanorods based on localized surface plasmon resonance, *Nanotechnology,* **29**(21): p. 215501.

7. Sharma, R., Reiter, R.J., and Ma, Q., 2019, Melatonin: A hypothesis regarding its use to treat Wilson disease, *Med hypotheses*, **133**: p. 109408.

8. Hedera, P., 2019, Wilson's disease: A master of disguise, *Parkinsonism relat disord*, **59**: p. 140-145.

9. Vierling, J.M. and Sussman, N.L., 2019, Wilson disease in adults:Clinical presentations, diagnosis, and medical management, Chapter 16, p. 165-177.

10. Poon, K.-S., et al., 2020, Challenges in molecular diagnosis of Wilson disease: viewpoint from the clinical laboratory. *Journal of clinical pathology,* **73**(4): p. 231-234.

11. Reeve, J.L., Frayling, I.M., and Twomey, P.J., 2020, Challenges in molecular diagnosis of Wilson disease. *Journal of clinical pathology,* **73**(4): p. 181-182.

12. Luong, J.H., Male, K.B., and Glennon, J.D., 2008, Biosensor technology: technology push versus market pull. *Biotechnol adv***, 26**(5): p. 492-500.

13. Percin, I., et al., 2017, Microcontact Imprinted Plasmonic Nanosensors: Powerful Tools in the Detection of Salmonella paratyphi. *Sensors (Basel),* **17**(6).

14. Pandey, S.P. and Singh, P.K., 2020, A polyelectrolyte based ratiometric optical sensor for Arginine and Lysine. *Sensors and actuators b: Chemical,* **303**: p. 127182.

15. Zhang, X., et al., 2021, Effect of laminin, polylysine and cell medium components on the attachment of human hepatocellular carcinoma cells to cellulose nanofibrils analyzed by surface plasmon resonance. *Journal of colloid and interface science,* **584**: p. 310-319.

16. D'Agata, R., et al., 2021, A new ultralow fouling surface for the analysis of human plasma samples with surface plasmon resonance. *Talanta,* **221**: p. 121483.

17. Yu, Y.-L., et al., 2021, Broadband silicon core photonics crystal fiber polarization filter based on surface plasmon resonance effect. *Optics communications,* **482**: p. 126587.

18. Bocková, M., et al., 2019, Advances in surface plasmon resonance imaging and microscopy and their biological applications. *Annual review of analytical chemistry,* **12**(1): p. 151-176.

19. Shin, Y.-B., et al., 2010, A new palm-sized surface plasmon resonance (SPR) biosensor based on modulation of a light source by a rotating mirror. *Sensors and Actuators b: Chemical,* **150**(1): p. 1-6.

20. Gan, S., et al., 2019, Sensitivity enhancement of surface plasmon resonance sensors with 2D franckeite nanosheets. *Results in physics,* **13**: p. 102320.

21. Fauzi, N.I.M., et al., 2020, Nanostructured Chitosan/Maghemite Composites Thin Film for Potential Optical Detection of Mercury Ion by Surface Plasmon Resonance Investigation. *Polymers,* **12**(7): p. 1497.

22. Moczko, E., et al., 2019, Epitope approach in molecular imprinting of antibodies. *J chromatogr b analyt technol biomed life sci,* **1124**: p. 1-6.

23. Motia, S., et al., 2020, Synthesis and characterization of a highly sensitive and selective electrochemical sensor based on molecularly imprinted polymer with gold nanoparticles modified screen-printed electrode for glycerol determination in wastewater. *Talanta,* **216**: p. 120953.

24. 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**: p. 146-154.

25. Yilmaz, E., et al., 2017, Molecular imprinting applications in forensic science, *Sensors (Basel),* **17**(4).

26. Erturk Bergdahl, G., et al., 2019, In vivo detection and absolute quantification of a secreted bacterial factor from skin using molecularly imprinted polymers in a surface plasmon resonance biosensor for improved diagnostic abilities, *ACS sens,* **4**(3): p. 717-725.

27. Karakuş, E., 2021, A rhodamine based fluorescent chemodosimeter for the selective and sensitive detection of copper (II) ions in aqueous media and living cells, *Journal of molecular structure,* **1224**: p. 129037.

28. Wang, R., et al., 2018, Visible-light-driven photoelectrochemical determination of Cu2+ based on CdS sensitized hydrogenated TiO2 nanorod arrays, *Sensors and actuators b: Chemical,* **270**: p. 270-276.

29. Yılmaz, V. and Kartal, Ş., 2015, Preparation of a new Cu(II)-imprinted polymer and its application for the determination of trace copper in water samples by flame atomic absorption spectrometry, *International journal of environmental analytical chemistry,* **95**(2): p. 106-120.

30. Kaykhaii, M., Khajeh. M., and Hashemi, S.H., 2015, Magnetic molecularly imprinted polymer nanoparticles for selective extraction of copper from aqueous solutions prior to its flame atomic absorption determination, *Journal of analytical chemistry,* **70**(11): p. 1325-1329.

31. Duan, J.-X., Li, X., and Zhang, C.-C., 2017, The synthesis and adsorption performance of polyamine Cu2+ imprinted polymer for selective removal of Cu2+, *Polymer bulletin,* **74**(9): p. 3487-3504.

32. Abu-Dalo, M.A., Salam, A.A., Nassory, N.S., 2015, Ion imprinted polymer based electrochemical sensor for environmental monitoring of copper(II). *International journal of electrochemical science,* **10**: p. 6780 - 6793.

33. Sakunkaewkasem, S., et al., 2018, Dual-analyte fluorescent sensor based on [5]helicene derivative with super large stokes shift for the selective determinations of cu(2+) or zn(2+) in buffer solutions and its application in a living cell. *ACS sens,*. **3**(5): p. 1016-1023.

34. Tarnowska, M. and Krawczyk, T., 2020, Click chemistry as a tool in biosensing systems for sensitive copper detection. *Biosensors and bioelectronics,* **169**: p. 112614.

35. Kuras, M.J. and Więckowska, E., 2015, Synthesis and characterization of a new copper(II) ion-imprinted polymer. *Polymer bulletin,* **72**(12): p. 3227-3240.

36. Shen, Y.-J. and Zhang, K., 2021,A bifunctional optical probe based on ESIPT-triggered disalicylaldehyde with ratiometric detection of iron and copper ions. *Polyhedron,*. **193**: p. 114883.

37. Vetrik, M., et al., 2018, Biopolymer strategy for the treatment of Wilson's disease. *Journal of controlled release,* **273**: p. 131-138.

38. Yang, J.-I., Yeh, D.-B., Jen-Min, K., Bonnie S., G.-C, L., and Y.-H, L., and Ying-Jang, L., 2012, Detection of copper ions in liquid foods and beverages based on an enzymatic method. *Journal of food & drug analysis,* **20**: p. 83-87.

39. Zhang, Y., et al., 2019, A cephalometric study in patients with Wilson's disease. *Journal of clinical neuroscience,* **67**.

40. Liu, J., et al., 2019, A cellular model for Wilson's disease using patient-derived induced pluripotent stem cells revealed aberrant β-catenin pathway during osteogenesis. *Biochemical and biophysical research communications,* **513**.

41. Lee, S., et al., 2016, Copper capture in a thioether-functionalized porous polymer applied to the detection of Wilson's disease. *J Am chem soc,* **138**(24): p. 7603-9.

42. Uygun, A., 2003, Wilson hastalığı. *Turkiye klinikleri J microbiol-Infec.,* 2(3): p. 177-83.

43. Hanağası, F., Hanağası, H. A., 2013, Wilson hastalığı. *Türk nöroloji dergisi*, **19**: p. 122-127.

44. Gerosa, C., et al., 2019, Liver pathology in Wilson's disease: From copper overload to cirrhosis. *Journal of ınorganic biochemistry*, **193**.

45. Sapuppo, A., et al., 2020, Genotype-phenotype variable correlation in Wilson disease: clinical history of two sisters with the similar genotype. *BMC medical genetics*, **21**(1): p. 128.

46. Aggarwal, A. and Bhatt, M., 2020, Wilson disease. *Current opinion in neurology*, **33**(4): p. 534-542.

47. Espinós, C. and Ferenci, P., 2020, Are the new genetic tools for diagnosis of Wilson disease helpful in clinical practice? *JHEP reports,* **2**: p. 100114.

48. García-Villarreal, L., et al., 2021, Wilson disease: revision of diagnostic criteria in a clinical series with great genetic homogeneity. *Journal of gastroenterology*, **56**(1): p. 78-89.

49. Çetinkaya, A., 2005, Wilson hastalığında kemik mineralizasyonu, Tıpta uzmanlık tezi Hacettepe Üniversitesi.

50. Sönmez, N., 2003, *Wilson hastalığı'nda oksidan stres, antioksidan vitaminler ve total antioksidan kapasite,* Tıpta uzmanlık tezi, Gazi Üniversitesi.

51. Fieten, H., et al., 2016, The Menkes and Wilson disease genes counteract in copper toxicosis in Labrador retrievers: a new canine model for copper-metabolism disorders. *Dis model mech*, **9**(1): p. 25-38.

52. Yang, Z.-p. and Zhang, C.-j., 2009, Designing of MIP-based QCM sensor for the determination of Cu(II) ions in solution. *Sensors and actuators b: Chemical*, **142**(1): p. 210-215.

53. Normaya, E., Baharu, N.A., and Ahmad, M.N., 2020, Synthesis of thiosemicarbazone-based colorimetric chemosensor for Cu2+ ions' recognition in aqueous medium: Experimental and theoretical studies. *Journal of molecular structure*, **1212**: p. 128094.

54. Adi Narayana Reddy, S., et al., 2016, Evaluation of 2,6-diacetylpyridinebis-4-phenyl-3-thiosemicarbazone as complexing reagent for zinc in food and environmental samples. *Journal of saudi chemical society,* **20**: p. S271-S279.

55. Wannapob, R., et al., 2010, Affinity sensor using 3-aminophenylboronic acid for bacteria detection. *Biosens bioelectron,* **26**(2): p. 357-64.

56. Kong, T., et al., 2010, Synthesis and identification of artificial antigens for cadmium and copper. *Food chemistry,* **123**(4): p. 1204-1209.

57. Wen, T., et al., , 2017, A facile, sensitive, and rapid spectrophotometric method for copper(II) ion detection in aqueous media using polyethyleneimine. *Arabian journal of chemistry,* **10**: p. S1680-S1685.

58. Topcu, C., et al., 2018, Electrochemical determination of copper(II) in water samples using a novel ion-selective electrode based on a graphite oxide–imprinted polymer composite. *Analytical letters,* **51**(12): p. 1890-1910.

59. Członkowska, A., et al., 2018, Wilson disease. *Nat rev dis primers,* **4**(1): p. 21.

60. Basha, M., et al., 2018, Brain Magnetic Resonance Spectroscopy (MRS) as a diagnostic tool for detecting early neurological changes in children with Wilson's disease. *European journal of radiology,* **111**.

61. Ahn, J.H., et al., Atypical brain MRI in neurological Wilson disease. *Parkinsonism & related disorders,* 2020. **78**.

62. Wilson, G.N., 2020, - *Wilson disease,* Rosenberg's molecular and genetic basis of neurological and psychiatric diseaseRosenberg, R.N. and Pascual, J.M., (Ed), *Chapter 44*. Academic Press. p. 601-611.

63. Öcal, R., et al., 2020, Effect of liver transplant on neurologic manifestations and brain magnetic resonance imaging findings in wilson disease. *Experimental and clinical transplantation : Official journal of the Middle East Society for Organ Transplantation,* **18**(Suppl 1): p. 84-87.

64. Dusek, P., et al., 2020, Semiquantitative scale for assessing brain mri abnormalities in wilson disease: A validation study. *Movement disorders,* **35**(6): p. 994-1001.

65. Beluomini, M.A., et al., 2019, Electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymer on nanostructured carbon materials: A review. *Journal of electroanalytical chemistry,* **840**: p. 343-366.

66. Lowdon, J.W., et al., 2020, MIPs for commercial application in low-cost sensors and assays – An overview of the current status quo. *Sensors and actuators b: Chemical,* **325**: p. 128973.

67. Sellergren, B., 2001, Molecularly imprinted polymers. 1 ed. *Elsevier science* vol. 23..

68. Ertürk, G., et al., 2016, Microcontact imprinting based surface plasmon resonance (SPR) biosensor for real-time and ultrasensitive detection of prostate specific antigen (PSA) from clinical samples. *Sensors and actuators b: Chemical*, **224**: p. 823-832.

69. Trotta, F., Biasizzo, M., and Caldera, F., 2012, Molecularly imprinted membranes. *Membranes*, **2**(3): p. 440-477.

70. Tunc, Y.. Hasırcı, N., Yesilada, A., Ulubayram, K., 2006, Comonomer effects on binding performances and morphology of acrylate-based imprinted polymers. *Polymer* **47**: p. 6931-6940.

71. Erturk, G., et al., 2015, Real-time prostate-specific antigen detection with prostate-specific antigen imprinted capacitive biosensors. *Anal chim acta*, **891**: p. 120-9.

72. Göçenoğlu Sarıkaya, A., et al., 2017, Molecularly imprinted surface plasmon resonance (SPR) sensor for uric acid determination. *Sensors and actuators b: Chemical*, **251**: p. 763-772.

73. Sener, G., et al., 2011, Use of molecular imprinted nanoparticles as biorecognition element on surface plasmon resonance sensor. *Sensors and actuators b: Chemical*, **160**(1): p. 791-799.

74. Guoning, C., et al., 2020, A surfactant-mediated sol-gel method for the preparation of molecularly imprinted polymers and its application in a biomimetic immunoassay for the detection of protein. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, **190**: p. 113511.

75. Ahmad, R., et al., 2015, Nanocomposites of gold nanoparticles@molecularly imprinted polymers: Chemistry, processing, and ppplications in pensors. *Chemistry of materials*, **27**(16): p. 5464-5478.

76. Ahmad, O.S., et al., 2019, Molecularly imprinted polymers in electrochemical and optical sensors. *Trends biotechnol*, **37**(3): p. 294-309.

77. Pardeshi Sushma , S.S., 2016, Precipitation polymerization: A versatile tool for preparing molecularly imprinted polymer beads for chromatography applications. *RSC advances*, **47**.

78. Sun, X., Wang, M., Peng, J., Yang, L., Wang, X., Wang, F., Zhang, X., Wu, Q., Chen, R., Chen, J., 2019, Dummy molecularly imprinted solid phase extraction of climbazole from environmental water samples. *Talanta*, **196**: p. 47-53.

79. Domínguez-Renedo, O., et al., 2020, Molecularly imprinted polypyrrole based electrochemical sensor for selective determination of 4-ethylphenol. *Talanta*, **207**: p. 120351.

80. Saylan, Y., 2017, *Preparation of hemoglobin imprinted surface plasmon resonance biosensors*, Doktora tezi, Hacettepe Üniversitesi,

81. Ansari, S. and Masoum, S., 2021, Recent advances and future trends on molecularly imprinted polymer-based fluorescence sensors with luminescent carbon dots. *Talanta,* **223**: p. 121411.

82. Rao, H., et al., 2017, A novel electrochemical sensor based on Au@PANI composites film modified glassy carbon electrode binding molecular imprinting technique for the determination of melamine. *Biosensors and bioelectronics,* **87**: p. 1029-1035.

83. Chen, C., et al., 2018, Molecularly imprinted polymer as an antibody substitution in pseudo-immunoassays for chemical contaminants in food and environmental samples. *Journal of agricultural and food chemistry,* **66**(11): p. 2561-2571.

84. Zhang, X., et al., 2018, Fluorescent molecularly imprinted membranes as biosensor for the detection of target protein. *Sensors and actuators b: Chemical,* **254**: p. 1078-1086.

85. Saylan, Y., et al., Molecularly imprinted polymer based sensors for medical applications. *Sensors,* 2019. **19**(6): p. 1279.

86. Li, S., et al., 2016, Molecularly imprinted polymers for enzyme-like catalysis: principle, design, and applications, *Molecularly imprinted catalysts,* p. 1-17.

87. Sönmezler, M., et al., 2019, Quartz crystal microbalance based histidine sensor. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology,* **47**(1): p. 221-227.

88. Emir Diltemiz, S., 2018, Development of MIP-based QCM sensors for determination of hyaluronic acid (HA). *Hacettepe journal of biology and chemistry,* **2**(46): p. 273-283.

89. Yılmaz, V., 2011, *Yeni baskılı polimer ve şelat yapıcı reçineler kullanarak bazı eser elementlerin alevli atomik absorpsiyon spektrometrik tayini*, Doktora tezi, Erciyes Üniversitesi.

90. Moreira, F.T.C., et al., 2014, Protein-responsive polymers for point-of-care detection of cardiac biomarker. *Sensors and actuators b: Chemical,*. **196**: p. 123-132.

91. Chunta, S., et al., 2021, Direct assessment of very-low-density lipoprotein by mass sensitive sensor with molecularly imprinted polymers. *Talanta,* **221**: p. 121549.

92. Uzun, L., et al., 2009, Production of surface plasmon resonance based assay kit for hepatitis diagnosis. *Biosens bioelectron,* **24**(9): p. 2878-84.

93. Uludag, Y. and Tothill, I.E., 2012, Cancer biomarker detection in serum samples using surface plasmon resonance and quartz crystal microbalance sensors with nanoparticle signal amplification. *Anal chem,* **84**(14): p. 5898-904.

94. Idil, N., et al., 2017, Whole cell based microcontact imprinted capacitive biosensor for the detection of Escherichia coli. *Biosensors and bioelectronics,* **87**: p. 807-815.

95. Wackerlig, J. and Lieberzeit, P.A., 2015, Molecularly imprinted polymer nanoparticles in chemical sensing – Synthesis, characterisation and application. *Sensors and actuators b: Chemical*, **207**: p. 144-157.

96. Sunayama, H., Kitayama, Y. and Takeuchi, T., 2018, Regulation of protein-binding activities of molecularly imprinted polymers via post-imprinting modifications to exchange functional groups within the imprinted cavity. *Journal of molecular recognition*, **31**(3): p. e2633.

97. Osman, B., et al., 2013, Microcontact imprinted surface plasmon resonance sensor for myoglobin detection. *Materials science and engineering:c mater biol appl*, **33**(7): p. 3609-14.

98. Ansari, S. and Karimi, M., 2017, Recent configurations and progressive uses of magnetic molecularly imprinted polymers for drug analysis. *Talanta*, **167**: p. 470-485.

99. Ansari, S. and Karimi, M., 2017, Novel developments and trends of analytical methods for drug analysis in biological and environmental samples by molecularly imprinted polymers. *TrAC trends in Analytical Chemistry*, **89**: p. 146-162.

100. Ansari, S., 2017, Application of magnetic molecularly imprinted polymer as a versatile and highly selective tool in food and environmental analysis: Recent developments and trends. *TrAC trends in analytical chemistry*, **90**: p. 89-106.

101. Saylan, Y., et al., 2017, Molecular imprinting of macromolecules for sensor applications. *Sensors (Basel)*, **17**(4).

102. Ghorbani, A., Ganjali, M.R., Ojani, R., Raoof, J., 2020, Detection of chloridazon in aqueous matrices using a nano-sized chloridazon-imprinted polymer-based voltammetric sensor, *International journal of electrochemical science*, p. 2913-2922.

103. Sadriu, I., et al., 2020, Molecularly imprinted polymer modified glassy carbon electrodes for the electrochemical analysis of isoproturon in water. *Talanta*, **207**: p. 120222.

104. Ayankojo, A.G., et al., 2020, Molecularly imprinted polymer-based sensor for electrochemical detection of erythromycin. *Talanta*, **209**: p. 120502.

105. Özcan, N., et al., 2020, Electrochemical detection of amyloid-β protein by delaminated titanium carbide MXene/multi-walled carbon nanotubes composite with molecularly imprinted polymer. *Materials today communications*, **23**: p. 101097.

106. Del Sole, R., et al., 2009, Experimental and computational studies on non-covalent imprinted microspheres as recognition system for nicotinamide molecules. *Molecules*, **14**(7): p. 2632-49.

107. Yuan, Y., et al., 2011, Development and characterization of molecularly imprinted polymers for the selective enrichment of podophyllotoxin from traditional Chinese medicines. *Anal chim acta*, **695**(1-2): p. 63-72.

108. Wulff, G., 1995, Molecular imprinting in cross-linked materials with the aid of molecular templates— A Way towards artificial antibodies. *angewandte chemie international edition in English*, **34**(17): p. 1812-1832.

109. Yan, H. and Row, K.H., 2006, Characteristic and synthetic approach of molecularly imprinted polymer. *International journal of molecular sciences*, **7**(5): p. 155-178.

110. Wulff, G., 2002, Enzyme-like catalysis by molecularly imprinted polymers. *Chemical reviews*, **102**(1): p. 1-28.

111. BelBruno, J.J., 2019, Molecularly imprinted polymers. *Chem rev*, **119**(1): p. 94-119.

112. Yavuz, H., et al., 2007, Synthesis of cholesterol imprinted polymeric particles. *Int j biol macromol*, **41**(1): p. 8-15.

113. Algieri, C., et al., 2014, Bio-mimetic sensors based on molecularly imprinted membranes. *Sensors (Basel)*, **14**(8): p. 13863-912.

114. Mosbach, K. and Ramström, O., 1996, The emerging technique of molecular imprinting and its future impact on biotechnology. *Bio/Technology*, **14**(2): p. 163-170.

115. Kyzas, G.Z., Bikiaris, D.N., and Lazaridis, N.K., 2009, Selective separation of basic and reactive dyes by molecularly imprinted polymers (MIPs). *Chemical engineering journal*, **149**(1): p. 263-272.

116. Zhang, H., Ye, L. and Mosbach, K., 2006, Non-covalent molecular imprinting with emphasis on its application in separation and drug development. *J Mol recognit*, **19**(4): p. 248-59.

117. Surya, S.G., et al., 2020, A chitosan gold nanoparticles molecularly imprinted polymer based ciprofloxacin sensor. *RSC advances*, **10**(22): p. 12823-12832.

118. Abu-Alsoud, G.F. and Bottaro, C.S., 2021, Porous thin-film molecularly imprinted polymer device for simultaneous determination of phenol, alkylphenol and chlorophenol compounds in water. *Talanta*, **223**: p. 121727.

119. Ikegami, T., et al., 2004, Bisphenol A-recognition polymers prepared by covalent molecular imprinting. *Analytica chimica acta*, **504**(1): p. 131-135.

120. Umpleby Ii, R.J., Bode, M., and Shimizu, K.D., 2000, Measurement of the continuous distribution of binding sites in molecularly imprinted polymers. *Analyst*, **125**(7): p. 1261-1265.

121. Donato, L., Figoli, A. and Drioli, E., 2005, Novel composite poly(4-vinylpyridine)/polypropylene membranes with recognition properties for (S)-naproxen. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, **37**(5): p. 1003-1008.

122. Dias, A.C., et al., 2008, Molecularly imprinted polymer as a solid phase extractor in flow analysis. *Talanta*, **76**(5): p. 988-96.

123. Terzopoulou, Z., et al., 2016, Preparation of molecularly imprinted solid-phase microextraction fiber for the selective removal and extraction of the antiviral drug abacavir in environmental and biological matrices. *Analytica chimica acta,* **913**: p. 63-75.

124. Adumitrăchioaie, A., et al., 2018, Electrochemical methods based on molecularly imprinted polymers for drug detection. A review. *International journal of electrochemical science,* **13**: p. 2556-2576.

125. Akgönüllü, S., Yavuz, H., and Denizli, A., Preparation of imprinted cryogel cartridge for chiral separation of l-phenylalanine. *Artif cells nanomed biotechnol*, 2017. **45**(4): p. 800-807.

126. Battista, E., et al., 2018, Turn-on fluorescence detection of protein by molecularly imprinted hydrogels based on supramolecular assembly of peptide multi-functional blocks. *Journal of materials chemistry b*, **6**(8): p. 1207-1215.

127. Deng, Q., et al., 2013, Highly selective fluorescent sensing of proteins based on a fluorescent molecularly imprinted nanosensor. *Sensors (Basel),* **13**(10): p. 12994-3004.

128. Andaç, M., Galaev, I., and Denizli, A., 2016, *Molecularly Imprinted Cryogels for Protein Purification*. Biomaterials from Nature for advanced devices and therapies, In: Neves, N.M., Reis, R.L., (Ed), Chapter 22, p. 401-428.

129. Zhang, Z., et al., 2017, Molecular imprinting on inorganic nanozymes for hundred-fold enzyme specificity. *Journal of the american chemical society*, **139**(15): p. 5412-5419.

130. Brahmbhatt, H., et al., 2016, Improvement of DNA recognition through molecular imprinting: hybrid oligomer imprinted polymeric nanoparticles (oligoMIP NPs), *Biomater sci*, **4**(2): p. 281-7.

131. Bartold, K., et al., 2018, Oligonucleotide determination via peptide nucleic acid macromolecular imprinting in an electropolymerized CG-Rich artificial oligomer analogue. *ACS applied materials & interfaces*, **10**(33): p. 27562-27569.

132. Pacheco, J.G., et al., 2019, Electrochemical sensing of the thyroid hormone thyronamine (T0AM) via molecular imprinted polymers (MIPs). *Talanta,* **194**: p. 689-696.

133. Moura, S.L., et al., 2018, Theoretical and experimental study for the biomimetic recognition of levothyroxine hormone on magnetic molecularly imprinted polymer. *Biosensors and bioelectronics*, **107**: p. 203-210.

134. Cenci, L., et al., 2015, *Surface plasmon resonance based on molecularly imprinted nanoparticles for the picomolar detection of the iron regulating hormone Hepcidin-25. Journal of nanobiotechnology*, **13**(1): p. 51.

135. Czulak, J., et al., 2016, Formation of target-specific binding sites in enzymes: solid-phase molecular imprinting of HRP. *Nanoscale*, **8**(21): p. 11060-6.

136. Uzun, L., et al., 2009, Hepatitis B surface antibody purification with hepatitis B surface antibody imprinted poly(hydroxyethyl methacrylate-N-methacryloyl-l-tyrosine methyl ester) particles. *Journal of chromatography* B, **877**(3): p. 181-188.

137. Kunath, S., et al., 2015, Cell and tissue imaging with molecularly imprinted polymers as plastic antibody mimics. *Advanced healthcare materials*, **4**(9): p. 1322-1326.

138. Mujahid, A. and Dickert, F.L., 2015, Blood group typing: From classical strategies to the application of synthetic antibodies generated by molecular imprinting. *Sensors (Basel),*. **16**(1).

139. Li, N., et al., 2017, Bio-inspired virus imprinted polymer for prevention of viral infections. *Acta biomaterialia*, **51**: p. 175-183.

140. Yang, B., et al., 2017, A virus resonance light scattering sensor based on mussel-inspired molecularly imprinted polymers for high sensitive and high selective detection of Hepatitis A Virus. *Biosensors and bioelectronics*, **87**: p. 679-685.

141. He, K., et al., 2016, Highly selective recognition and fluorescent detection of JEV via virus-imprinted magnetic silicon microspheres. *Sensors and actuators b: Chemical*, **233**: p. 607-614.

142. Erdem, O., et al., 2019, Molecularly imprinted nanoparticles based plasmonic sensors for real-time Enterococcus faecalis detection. *Biosens bioelectron*, **126**: p. 608-614.

143. Monier, M., Shafik A.L. and Abdel-Latif, D.A., 2018, Synthesis of azo-functionalized ion-imprinted polymeric resin for selective extraction of nickel(II) ions. *Polymer International*, **67**(8): p. 1035-1045.

144. Zhou, Z., et al., 2018, Preparation and adsorption characteristics of an ion-imprinted polymer for fast removal of Ni(II) ions from aqueous solution. *Journal of hazardous materials*, **341**: p. 355-364.

145. Sebastian, M. and Mathew, B., 2018, Carbon nanotube-based ion imprinted polymer as electrochemical sensor and sorbent for Zn(II) ion from paint industry wastewater. *International journal of polymer analysis and characterization*, **23**(1): p. 18-28.

146. Dar, K.K., et al., 2020, Molecularly imprinted polymers for the selective recognition of microorganisms. *Biotechnology advances*, **45**: p. 107640.

147. Sönmezler, M., 2011, *Kuartz kristal mikroterazi (QCM) temelli histidin sensörler*, Yüksek lisans tezi, Hacettepe Üniversitesi.

148. Li, J., et al., 2020, A novel electrochemical sensor based on molecularly imprinted polymer with binary functional monomers at Fe-doped porous carbon decorated Au electrode for the sensitive detection of lomefloxacin. *Ionics*, **26**(8): p. 4183-4192.

149. Krishnan, H., et al., 2019, A novel molecular imprint polymer synthesis for solid phase extraction of andrographolide. *Indonesian journal of chemistry,* **19**: p. 219-230.

150. Takeuchi, T. and Haginaka, J., 1999, Separation and sensing based on molecular recognition using molecularly imprinted polymers. *Journal of chromatography b: biomedical sciences and applications,* **728**(1): p. 1-20.

151. Cormack, P.A. and Elorza, A.Z., 2004, Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation. *J chromatogr b analyt technol biomed life sci,* **804**(1): p. 173-82.

152. Kandimalla, V. and Ju, H., 2004, Molecular Imprinting: A Dynamic Technique for Diverse Applications in Analytical Chemistry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, **380**: p. 587-605.

153. Zouaoui, F., et al., 2020, Electrochemical impedance spectroscopy determination of glyphosate using a molecularly imprinted chitosan. *Sensors and actuators b: Chemical,* **309**: p. 127753.

154. Irena, Y. and Srebnik, S., 2006, Factors contributing to binding-site imperfections in imprinted polymers. *Chemistry of Materials*, **18**.

155. Okutucu, B., 2020, *Wastewater treatment using imprinted polymeric adsorbents* Waste in textile and leather sectors, In: Körlü, A.,(Ed), Chapter 9, p.236-247.

156. Chapuis, F., Pichon, V. and Hennion, M.-C., 2004, Molecularly imprinted polymers : Developments and applications of new selective solid-phase extraction materials. *LC-GC Europe,*. **17**.

157. Pichon, V. and Chapuis-Hugon, F., 2008, Role of molecularly imprinted polymers for selective determination of environmental pollutants—A review. *Analytica chimica acta,* **622**(1): p. 48-61.

158. Al Kobaisi, M., et al., 2007, The effect of molecular imprinting on the pore size distribution of polymers. *Adsorption,* **13**(3): p. 315-321.

159. Ye, L., AG, Cormack P., and Mosbach, K., 2001, Molecular imprinting on microgel spheres. *Analytica chimica acta,* **435**(1): p. 187-196.

160. Komiyama, M., Takeuchi, T., Mukawa, T. and Asanuma, H., 2002, *Experimental methods, Procedures of molecular imprinting*, in *molecular imprinting*, Molecular imprinting: From fundamentals to applications, Chapter 3, p. 21-45.

161. Maria, G. and Grzegorz, S., 2017, The Molecularly imprinted polymers. Influence of monomers on the properties of polymers - A review. *World journal of research and review,* **5**(6).

162. Chen, L., et al., 2016, Molecular imprinting: perspectives and applications. *Chem soc rev,* **45**(8): p. 2137-211.

163. Panagiotopoulou, M., et al., 2015, Initiator-free synthesis of molecularly imprinted polymers by polymerization of self-initiated monomers. *Polymer,* **66**.

164. Majidi, D., Özgür, E., Yılmaz, E., Denizli, A., 2016, *Mikrobiyal afinite sensörler* Afinite temelli biyosensörler, in, A. Denizli, (Ed), Ankara. p. 125-142.

165. Tüylek, Z., 2017, Biyosensörler ve nanoteknolojik Etkileşim. *Bitlis Eren Üniversitesi fen bilimleri dergisi,*. **6**: p. 71-80.

166. Uygun, Z.O., Ertuğrul Uygun, H.D., Ermiş, N., Canbay, E., 2015, *Molecularly imprinted sensors — new sensing technologies*, Biosensors-micro and nanoscale applications, In: Rinken,T. (ed), Chapter 3, p. 85-108.

167. Rodríguez-Sevilla, E., et al., 2014, Electrochemical quantification of the antioxidant capacity of medicinal plants using biosensors. *Sensors*, **14**(8): p. 14423-14439.

168. Altıntaş, Z., Tothill, İ., 2013, Biomarkers and biosensors for the early diagnosis of lung cancer. *Sensors and actuators b chemical*, **188**: p. 988-998.

169. Baryeh, K., et al., 2017, *1 - Introduction to medical biosensors for point of care applications*, Medical biosensors for point of care (POC) Applications, In: Narayan. R.J. (Ed). Woodhead Publishing. p. 3-25.

170. Marazuela, M. and Moreno-Bondi, M. 2002, Fiber-optic biosensors – an overview. *Analytical and bioanalytical chemistry*, **372**(5): p. 664-682.

171. Healy, D.A., et al., 2007, Biosensor developments: application to prostate-specific antigen detection. *Trends in Biotechnology*, **25**(3): p. 125-131.

172. Motaharian, A., et al., 2020, .Electrochemical determination of atypical antipsychotic drug quetiapine using nano-molecularly imprinted polymer modified carbon paste electrode. *Analytica Chimica Acta,* **1097**: p. 214-221.

173. Grieshaber, D., et al., 2008, Electrochemical biosensors - sensor principles and architectures. *Sensors*, **8**(3): p. 1400-1458.

174. Purohit, B., et al., 2020, Biosensor nanoengineering: Design, operation, and implementation for biomolecular analysis. *Sensors international*, **1**: p. 100040.

175. Grazon, C., et al., 2020, A progesterone biosensor derived from microbial screening. *Nature communications*, **11**(1): p. 1276.

176. Muguruma, H., 2018, *Biosensors: Enzyme Immobilization Chemistry*, Encyclopedia of Interfacial Chemistry, In:K. Wandelt, Editor. Elsevier: Oxford. p. 64-71.

177. Akolpoglu, M.B., et al., 2019, - *Biosensing–Drug Delivery Systems for In Vivo Applications*, Advanced Biosensors for Health Care Applications, In: Inamuddin, et al. (Ed), Chapter 9, Elsevier. p. 249-262.

178. Guth, U., Vonau, W. and Zosel, J., Recent developments in electrochemical sensor application and technology—a review. *Measurement science and technology,* 2009. **20**(4): p. 042002.

179. Alqarni, S.A., et al., 2020, Composite material–based conducting polymers for electrochemical sensor applications: A mini review. *BioNanoScience,* **10**(1): p. 351-364.

180. Piletsky, S.A. and Turner, A.P.F. 2002, Electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymers. *Electroanalysis,* **14**(5): p. 317-323.

181. Srivastava, K.R., et al., 2020, *Biosensors/molecular tools for detection of waterborne pathogens,* Waterborne pathogens, In: Prasad, M.N.V., and Grobelak, A. (Ed), Chapter 13, Butterworth-Heinemann. p. 237-277.

182. Dehdashtian, S. and Hashemi, B. 2020, Voltammetric sensing of minoxidil using a molecularly imprinted polymer (MIP)-modified carbon paste electrode. *Chemical papers*, **74**(1): p. 157-165.

183. Wu, Y., et al., 2020, Rapid recognition and determination of tryptophan by carbon nanotubes and molecularly imprinted polymer-modified glassy carbon electrode. *Bioelectrochemistry,* **131**: p. 107393.

184. Dibekkaya, H., 2015, *CCP antikorlarının tayini için yüzey plazmon rezonans temelli biyosensörlerin hazırlanması,* Yüksek lisans tezi, Hacettepe Üniversitesi.

185. Uludağ, Y. and Tothill, I.E., 2010, Development of a sensitive detection method of cancer biomarkers in human serum (75%) using a quartz crystal microbalance sensor and nanoparticles amplification system. *Talanta,* **82**(1): p. 277-282.

186. Kisovec, M., et al., 2020, In-line detection of monoclonal antibodies in the effluent of protein A chromatography with QCM sensor. *Analytical Biochemistry,* **608**: p. 113899.

187. Hao, R., et al., 2009, Rapid detection of Bacillus anthracis using monoclonal antibody functionalized QCM sensor. *Biosens bioelectron*, **24**(5): p. 1330-5.

188. Fulgione, A., et al., 2018, QCM-based immunosensor for rapid detection of Salmonella Typhimurium in food. *Scientific Reports*, **8**(1): p. 16137.

189. Wu, T.Z., et al., 2005, Piezoelectric immunochip for the detection of dengue fever in viremia phase. *Biosens bioelectron*, **21**(5): p. 689-95.

190. Kurosawa, S., et al., 2002, Adsorption of Anti-C-Reactive protein monoclonal antibody and F(ab') fragment on plasma-polymerized styrene, allylamine and acrylic acid coated with quartz crystal microbalance. *Journal of photopolymer science and technology,* **15**(2): p. 323-329.

191. Alev, O., et al., 2020, Cu-doped ZnO nanorods based QCM sensor for hazardous gases. *Journal of alloys and compounds*, **826**: p. 154177.

192. Marx, K.A., 2003, Quartz crystal microbalance: a useful tool for studying thin polymer films and complex biomolecular systems at the solution−surface interface. *Biomacromolecules*, **4**(5): p. 1099-1120.

193. Wegener, J., Janshoff, A. and Steinem, C., 2001, The quartz crystal microbalance as a novel means to study cell-substrate interactions In situ. *Cell biochemistry and biophysics*, **34**(1): p. 121-151.

194. Muharramah, A., et al., 2020, Detection of gelatin in ice cream using QCM sensor. *IOP conference series: Earth and environmental science*, **493**: p. 012028.

195. Zhao, L., et al., 2020, A porphyrin-based optical sensor membrane prepared by electrostatic self-assembled technique for online detection of cadmium(II). *Chemosphere*, **238**: p. 124552.

196. Bener, M., Şen. F.B. and Apak, R., 2020, Novel pararosaniline based optical sensor for the determination of sulfite in food extracts. *Spectrochimica acta part a: molecular and biomolecular spectroscopy*, **226**: p. 117643.

197. Pirzada, M. and Altintas, Z., 2020, Recent progress in optical sensors for biomedical diagnostics. *Micromachines*, **11**(4): p. 356.

198. Damborský, P., Švitel, J. and Katrlík, J. , 2016, Optical biosensors. *Essays Biochem*, **60**(1): p. 91-100.

199. Zhang, H. and Miller, B.L., 2019, Immunosensor-based label-free and multiplex detection of influenza viruses: State of the art. *Biosens bioelectron*, **141**: p. 111476.

200. Gesellchen, F., Zimmermann, B. and Herberg, F.W., 2005, Direct optical detection of protein-ligand interactions. *Methods mol biol*, **305**: p. 17-46.

201. Miotke, L., Barducci, M.C. and Astakhova, K., 2015, Novel signal-enhancing approaches for optical detection of nucleic acids—going beyond target amplification. *Chemosensors*, **3**(3): p. 224-240.

202. Ulber, R., Frerichs, J.-G. and Beutel, S., 2003, Optical sensor systems for bioprocess monitoring. *Analytical and bioanalytical chemistry*, **376**(3): p. 342-348.

203. Zeng, S., et al., 2013, Size dependence of Au NP-enhanced surface plasmon resonance based on differential phase measurement. *Sensors and actuators b: Chemical*, **176**: p. 1128-1133.

204. Homola, J., Yee, S.S., Gauglitz, G., 1999, Surface plasmon resonance sensors: review. *Sensors and actuators b: Chemical*, **54**(1-2): p. 3-15.

205. Wang, D., et al., 2019, Recent advances in surface plasmon resonance imaging sensors. *Sensors (Basel)*, **19**(6).

206. Singh, P., 2016, SPR biosensors: Historical perspectives and current challenges. *Sensors and actuators B:* Chemical, 2016. **229**: p. 110-130.

207. Omar, N.A.S., et al., 2020, Experimental evaluation on surface plasmon resonance sensor performance based on sensitive hyperbranched polymer nanocomposite thin films. *Sensors and actuators A: Physical*, **303**: p. 111830.

208. Özgür, E., Topçu, A.A., Yılmaz.E., Denizli, A., 2020, Surface plasmon resonance based biomimetic sensor for urinary tract infections. *Talanta.* **212**: p. 120778.

209. Rebe Raz, S., et al., 2012, Development of surface plasmon resonance-based sensor for detection of silver nanoparticles in food and the environment. *Analytical and bioanalytical chemistry*, **403**(10): p. 2843-2850.

210. Singh, S., et al., 2020, 2D nanomaterial-based surface plasmon resonance sensors for biosensing applications. *Micromachines*, **11**(8): p. 779.

211. Liu, Q., et al., 2015, Broadband single-polarization photonic crystal fiber based on surface plasmon resonance for polarization filter. *Plasmonics*, **10**.

212. Hou, W. and Cronin, S.B., 2013, A review of surface plasmon resonance-enhanced photocatalysis. *Advanced functional materials*,. **23**(13): p. 1612-1619.

213. Advincula, R., Cyago, A., 2014, *Surface plasmon resonance spectroscopy and molecularly imprinted polymer (MIP) sensors*, Handbook of Spectroscopy, In: Gauglitz, G., Moore,S.D., (Ed), Chapter 33, 2014. p. 1229-1258.

214. Das, C.M., et al., 2020, Augmenting sensitivity of surface plasmon resonance (SPR) sensors with the aid of anti-reflective coatings (ARCs). *Photonics and nanostructures - fundamentals and applications*, **38**: p. 100760.

215. Homola, J., 2003, Present and future of surface plasmon resonance biosensors. *Anal bioanal chem*, **377**(3): p. 528-39.

216. Zhou, X.-L., et al., 2020, Surface plasmon resonance microscopy: from single-molecule sensing to single-cell imaging. *Angewandte chemie international edition*, **59**(5): p. 1776-1785.

217. Tang, Y., Zeng, X. and Liang, J., 2010, Surface plasmon resonance: an introduction to a surface spectroscopy technique. *J chem educ*, **87**(7): p. 742-746.

218. Kretschmann, E. and Raether, H.,1968, Notizen: Radiative Decay of Non Radiative Surface Plasmons Excited by Light. *Zeitschrift für naturforschung a,* **23**(12): p. 2135-2136.

219. Das, C.M., et al., 2020, A theoretical insight into the use of anti-reflective coatings for the upliftment of sensitivity of surface plasmon resonance sensors. *Optics communications*, **458**: p. 124748.

220. Abdulkhaleq Alwahib, A., et al., 2020, Surface plasmon resonance sensor based on D-shaped optical fiber using fiberbench rotating wave plate for sensing pb ions. *Optik*, **202**: p. 163724.

221. Rahim, N., Ahmed, S. and Faaiz, M., 2020, Optical fiber biomedical sensor based on surface plasmon resonance. *Iraqi journal of science,* p. 1650-1656.

222. Shrivastav, A.M., Mishra, S.K., and Gupta, B.D., 2015, Fiber optic SPR sensor for the detection of melamine using molecular imprinting. *Sensors and actuators b: Chemical,*. **212**: p. 404-410.

223. Zeng, S., et al., 2014, Nanomaterials enhanced surface plasmon resonance for biological and chemical sensing applications. *Chemical society reviews,* **43**(10): p. 3426-3452.

224. Yılmaz, F., et al., 2017, *Surface plasmon resonance based nanosensors for detection of triazinic pesticides in agricultural foods,* New pesticides and soil sensors, Grumezescu, A.M., (Ed) , Academic Press. p. 679-718.

225. Ordal, M.A., et al., 1983, Optical properties of the metals Al, Co, Cu, Au, Fe, Pb, Ni, Pd, Pt, Ag, Ti, and W in the infrared and far infrared. *Applied Optics,* **22**(7): p. 1099-1119.

226. Rizal, C., et al., 2018, Microstructure and magneto-optical surface plasmon resonance of Co/Au multilayers. *Journal of physics communications*, **2**(5): p. 055010.

227. Zakaria, R., et al., 2020, Sensitivity comparison of refractive index transducer optical fiber based on surface plasmon resonance using Ag, Cu, and bimetallic Ag–Cu layer. *Micromachines,* **11**: p. 77.

228. Srivastava, A., Das, R., and Prajapati, Y.K., 2020, Effect of Perovskite material on performance of surface plasmon resonance biosensor. *IET Optoelectronics*, **14**(5): p. 256-265.

229. Kim, N.H., et al., 2019, Sensitivity and stability enhancement of surface plasmon resonance biosensors based on a large-area Ag/MoS(2) substrate. *Sensors (Basel),* **19**(8).

230. Sun, R.-J., et al., 2020, Reusable TiN substrate for surface plasmon resonance heterodyne phase interrogation sensor. *Nanomaterials*, **10**: p. 1325.

231. Ramsay, G., 1998, Commercial Biosensors: Applications to Clinical, Bioprocess, and Environmental Samples, In: Winefordne, J.D.,(Ed): Wiley.

232. Nurrohman, D.T., Wang,Y.H., and Chiu, N.F., 2020, Exploring graphene and mos(2) chips based surface plasmon resonance biosensors for diagnostic applications. *Front chem,*. **8**: p. 728.

233. Sari, E., et al., 2016, Fabrication of surface plasmon resonance nanosensor for the selective determination of erythromycin via molecular imprinted nanoparticles. *Talanta,* **150**: p. 607-14.

234. Atar, N., Eren, T., and Yola, M.L., 2015, A molecular imprinted SPR biosensor for sensitive determination of citrinin in red yeast rice. *Food Chem*, **184**: p. 7-11.

235. Maleki, S., et al., 2020, Surface plasmon resonance, fluorescence, and molecular docking studies of bovine serum albumin interactions with natural coumarin diversin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **230**: p. 118063.

236. Wang, X., et al., 2017, Impact of SPR biosensor assay configuration on antibody: Neonatal Fc receptor binding data. *MAbs*, **9**(2): p. 319-332.

237. Wang, W., et al., 2017, A label-free fiber optic SPR biosensor for specific detection of C-reactive protein. *Scientific Reports*, **7**(1): p. 16904.

238. Figueira, T.N., et al., 2017, Quantitative analysis of molecular partition towards lipid membranes using surface plasmon resonance. *Scientific reports*, **7**(1): p. 45647.

239. Yoo, H., et al., 2020, Reusable surface plasmon resonance biosensor chip for the detection of H1N1 influenza virus. *Biosensors and bioelectronics*, **168**: p. 112561.

240. Jadhav, G.P., Prathipati, P.K. and Chauhan, H., 2020, Surface plasmon resonance, Orbitrap mass spectrometry and Raman advancements: exciting new techniques in drug discovery. *Expert opinion on drug discovery*, **15**(7): p. 739-743.

241. Erturk, G., et al., 2011, Fab fragments imprinted SPR biosensor for real-time human immunoglobulin G detection. *Biosens Bioelectron*, **28**(1): p. 97-104.

242. Springer, T., et al., 2014, Enhancing sensitivity of surface plasmon resonance biosensors by functionalized gold nanoparticles: size matters. *Anal Chem*, **86**(20): p. 10350-6.

243. Fathi, F., Rashidi, M.-R., and Omidi, Y., 2019, Ultra-sensitive detection by metal nanoparticles-mediated enhanced SPR biosensors. *Talanta*, **192**: p. 118-127.

244. Dibekkaya, H., et al., 2016, Surface plasmon resonance sensors for real-time detection of cyclic citrullinated peptide antibodies. *Journal of macromolecular science, part a*, **53**(9): p. 585-594.

245. Sun, D., et al., 2021, Investigation of the recognition interaction between glycated hemoglobin and its aptamer by using surface plasmon resonance. *Talanta*, **222**: p. 121466.

246. Pattnaik, P., 2005, Surface plasmon resonance: applications in understanding receptor-ligand interaction. *Appl biochem biotechnol*, **126**(2): p. 79-92.

247. Peng, D., et al.,2020, Surface plasmon resonance biosensor for the determination of 3-methyl-quinoxaline-2-carboxylic acid, the marker residue of olaquindox, in swine tissues. *Food chemistry*, **302**: p. 124623.

248. Shibayama, J., et al., 2021, Kretschmann- and Otto-type surface plasmon resonance waveguide sensors in the terahertz regime. *Microwave and optical technology Letters,*. **63**(1): p. 103-106.

249. Wei, T., et al., 2019, Simultaneous detection of aflatoxin B1, ochratoxin A, zearalenone and deoxynivalenol in corn and wheat using surface plasmon resonance. *Food chemistry*, **300**: p. 125176.

250. Dong, J., et al., 2012, Surface plasmon resonance sensor for profenofos detection using molecularly imprinted thin film as recognition element. *Food control*, **25**(2): p. 543-549.

251. Mohammadzadeh-Asl, S., et al., 2021, Surface plasmon resonance signal enhancement based on erlotinib loaded magnetic nanoparticles for evaluation of its interaction with human lung cancer cells. *Optics & laser technology*, **133**: p. 106521.

252. Zhou, J., et al., 2019, Surface plasmon resonance (SPR) biosensors for food allergen detection in food matrices. *Biosensors and bioelectronics,*. **142**: p. 111449.

253. Zeni, L., et al., 2020, A portable optical-fibre-based surface plasmon resonance biosensor for the detection of therapeutic antibodies in human serum. *Scientific reports*, **10**(1): p. 11154.

254. Liu, C., et al., 2020, Surface plasmon resonance (SPR) infrared sensor based on D-shape photonic crystal fibers with ITO coatings. *Optics communications*, **464**: p. 125496.

255. Horchani, R., 2020, Localized surface plasmon resonance sensing of nanoparticles. *Acta physica polonica series a*, **137**.

256. Fauzi, N., et al., 2020, Nanostructured chitosan/maghemite composites thin film for potential optical detection of mercury ion by surface plasmon resonance investigation. *Polymers*, **12**: p. 1497.

257. Esentürk, M.K., 2017, *Mikroalbümin tayini için spr temelli nanosensörlerin hazırlanması,* Yüksek lisans tezi, Hacettepe Üniversitesi.

258. Denizli, A., et al., 2002, Heavy metal ion adsorption properties of methacrylamidocysteine-containing porous poly(hydroxyethyl methacrylate) chelating beads. *Adsorption science & technology,*. **20**(7): p. 607-617.

259. Li, J., et al., 2014, A strategy for improving the sensitivity of molecularly imprinted electrochemical sensors based on catalytic copper deposition. *Anal chim acta*, **817**: p. 17-22.

260. Singh, L.P. and Bhatnagar, J.M. 2004, Copper(II) selective electrochemical sensor based on Schiff Base complexes. *Talanta*, **64**(2): p. 313-9.

261. Bajwa, S.Z., Dumler, R. and Lieberzeit, P.A., 2014, Molecularly imprinted polymers for conductance sensing of Cu^{2+} in aqueous solutions. *Sensors and actuators b: Chemical*, **192**: p. 522-528.

262. Dou, Z., et al., 2020, An in-situ plasmonic spectroscopy based biosensor for detection of copper (II) ions highlighting analytical specifications. *Sensors and actuators b: Chemical*, p. 129103.

263. Isaad, J. and Achari, A.E., 2021, A novel sugar pyrazolin-5-one based optical chemosensor for sequential detection of copper (II) and cyanide ions in real samples. Experimental and theoretical studies. *Journal of molecular structure,*. **1228**: p. 129771.

264. Awad, F.S., et al., 2020, Highly fluorescent hematoporphyrin modified graphene oxide for selective detection of copper ions in aqueous solutions. *Analytica chimica acta,* **1140**: p. 111-121.

265. Qiu, S., et al., 2020, Triazole-stabilized fluorescence sensor for highly selective detection of copper in tea and animal feed. *Food chemistry,* **317**: p. 126434.

266. Li, H., et al., 2013, Label-Free detection of Cu2+ and Hg2+ ions using reconstructed Cu2+-specific DNAzyme and G-quadruplex DNAzyme. *PloS one,* **8**: p. e73012.

267. Hwang, J., et al., 2016, Sensitive detection of copper ions via ion-responsive fluorescence quenching of engineered porous silicon nanoparticles. *Scientific reports,* **6**(1): p. 35565.

268. Cai, N., et al., 2014, Sensitive and selective detection of copper ions with highly stable polyethyleneimine-protected silver nanoclusters. *Analytical chemistry,* **86**: p. 419-426.

269. Li, J., et al., 2015, Highly sensitive and doubly orientated selective molecularly imprinted electrochemical sensor for Cu(2.). *Biosens bioelectron,* **69**: p. 316-20.

270. Wang, S., et al.,2021, Preparation and mechanism investigation of CdS quantum dots applied for copper ion rapid detection. *Journal of Alloys and Compounds,*. **854**: p. 157195.

271. Tang, W., et al., 2015, Selective and quantitative detection of trace amounts of mercury(II) ion (Hg2+) and copper(II) ion (Cu2+) using surface-enhanced raman scattering (SERS). *Applied spectroscopy*, **69**(7): p. 843-849.

272. Liu, X., et al., 2014, Pristine graphene quantum dots for detection of copper ions. *Journal of materials research,* **29**(13): p. 1401-1407.

273. Guo, Y., Jian, F. and Kang, X., 2017, Nanopore sensor for copper ion detection using a polyamine decorated β-cyclodextrin as the recognition element. *RSC advances,* **7**(25): p. 15315-15320.

274. Jin, Y., et al., 2013, Gold nanoparticle-sensitized quartz crystal microbalance sensor for rapid and highly selective determination of Cu(II) ions. *Analyst,* **138**(18): p. 5479-5485.

275. Synhaivska, O., et al., 2019, Detection of Cu(2+) Ions with GGH peptide realized with Si-nanoribbon ISFET. *Sensors (Basel, Switzerland),* **19**(18): p. 4022.

276. Ghodake, G.S., et al., 2018, Colorimetric detection of Cu(2+) based on the formation of peptide-copper complexes on silver nanoparticle surfaces. *Beilstein journal of nanotechnology*, **9**: p. 1414-1422.