

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

ANTİBİYOTİK TAYİNİ İÇİN MOLEKÜLER BASKILANMIŞ POLİMER TEMELLİ FOSFORESANS SENSÖRÜ GELİŞTİRİLMESİ

HÜMA YILMAZ

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

TEMMUZ 2020


GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Gazi
1926

ANTİBİYOTİK TAYİNİ İÇİN MOLEKÜLER BASKILANMIŞ POLİMER TEMELLİ FOSFORESANS SENSÖRÜ GELİŞTİRİLMESİ

Hüma YILMAZ

DOKTORA TEZİ
ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEMMUZ 2020

Hüma YILMAZ tarafından hazırlanan "ANTİBİYOTİK TAYİNİ İÇİN MOLEKÜLER BASKILANMIŞ POLİMER TEMELLİ FOSFORESANS SENSÖRÜ GELİŞTİRİLMESİ" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile Gazi Üniversitesi Analitik Kimya Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Hasan Basan
Analitik Kimya, Gazi Üniversitesi



Tez Savunma Tarihi: 27/07/2020

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Hüma YILMAZ tarafından hazırlanan "ANTİBİYOTİK TAYİNİ İÇİN MOLEKÜLER BASKILANMIŞ POLİMER TEMELLİ FOSFORESANS SENSÖRÜ GELİŞTİRİLMESİ" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile Gazi Üniversitesi Analitik Kimya Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Sacide ALTINÖZ

Analitik Kimya, Hacettepe Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~ .....

Tez Savunma Tarihi: 27/07/2020

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Hüma YILMAZ tarafından hazırlanan "ANTİBİYOTİK TAYİNİ İÇİN MOLEKÜLER BASKILANMIŞ POLİMER TEMELLİ FOSFORESANS SENSÖRÜ GELİŞTİRİLMESİ" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Analitik Kimya Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyesi: Prof. Dr. Sibel Ayşıl Özkan

Analitik Kimya, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Tez Savunma Tarihi: 27/07/2020

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Hüma YILMAZ tarafından hazırlanan "ANTİBİYOTİK TAYİNİ İÇİN MOLEKÜLER BASKILANMIŞ POLİMER TEMELLİ FOSFORESANS SENSÖRÜ GELİŞTİRİLMESİ" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile Gazi Üniversitesi Analitik Kimya Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyesi: Prof. Dr. Nilgün Günden Göğer

Analitik Kimya, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~ .....

Tez Savunma Tarihi: 27/07/2020

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN

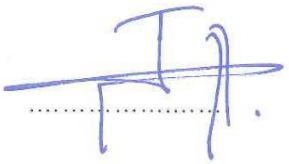
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Hüma YILMAZ tarafından hazırlanan "ANTİBİYOTİK TAYİNİ İÇİN MOLEKÜLER BASKILANMIŞ POLİMER TEMELLİ FOSFORESANS SENSÖRÜ GELİŞTİRİLMESİ" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile Gazi Üniversitesi Analitik Kimya Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyesi: Prof. Dr. Uğur Tamer

Analitik Kimya, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~ .....



Tez Savunma Tarihi: 27/07/2020

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Hüma YILMAZ tarafından hazırlanan "ANTİBİYOTİK TAYİNİ İÇİN MOLEKÜLER BASKILANMIŞ POLİMER TEMELLİ FOSFORESANS SENSÖRÜ GELİŞTİRİLMESİ" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Analitik Kimya Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyesi: Prof. Dr. Hayriye Eda Şatana Kara

Analitik Kimya, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum .....

Tez Savunma Tarihi: 27/07/2020

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

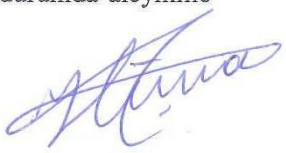
Prof. Dr. Mustafa ASLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.



Hüma YILMAZ

27/07/2020

ANTİBİYOTİK TAYİNİ İÇİN MOLEKÜLER BASKILANMIŞ POLİMER TEMELLİ FOSFORESANS SENSÖRÜ GELİŞTİRİLMESİ

(Doktora Tezi)

Hüma YILMAZ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Temmuz 2020

ÖZET

Doktora çalışmasının öncelikli hedefi, ilaç molekülü olarak seçilen Tobramisin'in (TOB) tayini için yüzeyi moleküler baskılanmış polimer temelli fosforesans sensör geliştirilmesidir. Sentezlenen ZnS kuantum noktalarının (KN) yüzeyinde TOB'un şekil, büyüklük ve fonksiyonel gruplarının açısal duruşları bakımından ona özgü boşluklar bulunmaktadır. İlaç molekülü bu boşluklara bağlandığında Mn katkılı ZnS KN'ların enerji transferi sonucunda fosforesans sinyalinde azalma gözlenmiştir. Fosforesans sinyalindeki azalma ile polimer yüzeyine bağlanan TOB derişimi arasında doğrusal bir ilişki bulunmaktadır. Bu cevaptan yararlanarak insan serumu ve inek sütünden TOB tayini gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda LOD ve LOQ değerleri 0,0009 – 0,0027 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Geri kazanım değeri süt matriksinde %77,17 ile %103,50 ve insan serumu matriksinde %88,5 ile %100,47 değerleri arasında hesaplanmıştır. Geliştirilen fosforesans sensör ilaç tayini için seçici, duyarlı ve tekrarlanabilirdir.

Bilim Kodu : 1004

Anahtar Kalimeler : Fosforesans sensör, Moleküler Baskılanmış Polimer Kuantum Nokta

Sayfa Adedi : 115

Danışman : Prof. Dr. Hasan BASAN

DEVELOPMENT OF MOLECULARLY IMPRINTED POLYMER BASED PHOSPHORESCENCE SENSOR FOR ANTIBIOTIC DETERMINATION

(Ph.D. Thesis)

Hüma YILMAZ

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

July 2020

ABSTRACT

The essential purpose of the PhD study is to develop a surface imprinted polymer-based phosphorescence sensor for the determination of Tobramycin (TOB), which is selected as the drug molecule. On the surface of the synthesized ZnS quantum dots (QD), there are specific cavities for TOB in terms of its shape, size and angular position. When the drug molecule is interacted to the specific surface imprinted cavities, a decrease in the phosphorescence signal has been observed as a result of the energy transfer of Mn-doped ZnS QD. There is a linear relationship between the decrease in phosphorescence signal and the TOB concentration bound to the polymer surface. Based on this technique, TOB determination was performed from human serum and cow milk. As a result of the study, LOD and LOQ values were calculated as 0.0009 - 0.0027 μg / mL. The recovery value was calculated between 77.17% and 103.50% in the milk and 88.5% and 100.47% in the human serum. The developed phosphorescence sensor is selective, sensitive and reproducible for drug determination.

Science Code : 1004

Keywords : Phosphorescent Sensor, Molecularly Imprinted Polymers, Quantum Dots

Number of Pages : 115

Supervisor : Prof. Dr. Hasan BASAN

TEŞEKKÜR

Bu tezin planlanmasında ve uygulanmasında, birikiminden yararlandığım, sabırla tüm süreçte tecrübesinden faydalanmamı sağlayan, yol göstericiliği ve desteği ile tüm katkılarından dolayı danışman hocam Sn. Prof. Dr. Hasan BASAN'a

Çalışma sürecimde değerli bilgisini ve ilgisini esirgemeyen kıymetli hocalarım Sn. Prof. Dr. Nusret ERTAŞ'a ve Prof. Dr. Eda ŞATANA KARA'ya

Tez sürecimde ilgisi ve yardımlarıyla bana destek veren Sn. Prof Dr. Nilgün GÜNDEN GÖĞER'e, Prof. Dr. Uğur TAMER'e, Doç. Dr. Aysel BERKKAN'a, öğretim üyesi yardımcıları arkadaşlarıma ve lisansüstü öğrenci arkadaşlarıma

Projemizi desteklediği için Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (Proje No: 215Z207)'na

Pozitif enerjileriyle simülasyonda can toplayıp devam etmeme yardımcı olan emekli öğretim üyesi Prof. Dr. M. Tevfik ORBEY'e, Doç. Dr. Orkun ALP'e, Doç. Dr. Emre DURMAZ'a, Dr. Öğr. Gör. Onur Kenan ULUTAŞ'a, Arş. Gör. Beril ALTUN'a, Dr. Onur PARLAK'a ve Kimyager Damla ÜVEZ'e

Doktora sürecime güler yüzüyle ve iyi niyetiyle ferah bir nefes olan değerli Gül AVŞAR YÜCE'ye ve tanık olduğum çoğu şeyi parlatan kıymetli Bülent ÖZTÜRK'e

Bana hep inanan, yol gösteren ve örnek olan kıymetli hocam Sn. Prof. Dr. Münevver SÖKMEN, akademideki dâimi yoldaşlarım Melek KOÇ, Vildan SERDAROĞLU ve Ezgi DEMİR'e

Her şeye rağmen devam etmenin bir sanat olduğunu öğrendiğim çok değerli resim hocam Hüseyin ARICI ve atölyesindeki arkadaşlarıma, zihin odalarımı doldurup taşıran Onur BEHRAMOĞLU'na

Her zaman destekleyen, sevgilerini ve saygılarını hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli annem emekli matematik öğretmeni Sevtap YILMAZ, babam emekli öğretim üyesi Prof. Dr. Cemil YILMAZ ve yeryüzünün benzersiz avukatı olan, hayatı bir baş dönmesi gibi yaşamasına hep imrendiğim kardeşim Av. Raif Nabi YILMAZ'a saygı, sevgi ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hata varsa, tümü bana aittir.

“Benim manevî mirasım, bilim ve akıldır.” Mustafa Kemal Atatürk.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET iv

ABSTRACT v

TEŞEKKÜR vi

İÇİNDEKİLER viii

ÇİZELGELERİN LİSTESİ xi

ŞEKİLLERİN LİSTESİ xiii

SİMGELER VE KISALTMALAR xv

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 3

2.1. Moleküler Baskılamaya Giriş 3

2.2. Moleküler Baskılama Nedir? 5

2.2.1. Kalıp molekül 6

2.2.2. Monomer 7

2.2.3. Çapraz bağlayıcı 8

2.2.4. Başlatıcı 9

2.2.5. Çözücü 9

2.3. Moleküler Baskılama Tekniğine Yaklaşımlar 10

2.3.1. Yüzey baskılama 12

2.4. Moleküler Baskılamada Son Gelişmeler 14

2.5. Lüminesans 17

2.5.1. Fotolüminesans 17

2.6. Floresans 18

2.6.1. Elektron spini 20

2.6.2. Singlet ve triplet uyarılmış haller 20

Sayfa

2.6.3. Titreşimsel durulma 20
2.6.4. İç dönüşüm ve dış dönüşüm 21
2.6.5. Sistemler arası geçiş 21
2.6.6. Ayrışma ve ön ayrışma 21
2.7. Spektroflorimetre ve Cihaz Şeması 22
2.8. Fosforesans 23
2.9. Kuantum Noktalar 26
2.9.1. KN hakkında genel bilgiler 26
2.9.2. Sulu ve organik ortam sentez yöntemleri 29
2.10. Katkılı KN'lerin Lüminesans Özellikleri 32
2.10.1. Mn-katkılı kuantum noktaların emisyonu 34
2.11. Katkılanmış KN'lerin Lüminesans Sensör Alanındaki Kullanımı 36
2.12. Aminoglikozid Antibiyotikler 39
2.12.1. Tobramisin 43
2.12.2. Tobramisin fiziksel ve kimyasal özellikleri 44
2.12.3. Tobramisin tayin yöntemleri 46
3. GEREÇ VE YÖNTEM 49
3.1. Cihazlar 49
3.2. Kimyasal Maddeler 50
3.3. Tamponlar ve Çözeltilerin Hazırlanmas 51
3.4. Partiküllerin Sentezi ve Optimizasyonları 53
3.4.1. KN partikülleri sentezi 53
3.4.2. MPTS:ZnS modifikasyonu ve IMIP:ZnS sensörün sentezi 53
3.5. TOB Ekstraksiyonu İşlemi 56
3.6. Partiküllerin Sinyal Ölçümleri 57
3.7. Yeniden Bağlanma Çalışmaları 57

Sayfa

3.7.1. Kalibrasyon standartlarının hazırlanması ve ölçümleri 58
3.8. Süt Matriksi ve Serum Matriksinde Çalışmalar 58
3.8.1. Süt matriksinde bağlanma çalışmaları 58
3.8.2. Serum matriksinde bağlanma çalışmaları 59
3.9. Analitik Performans Çalışmaları 59
3.9.1. Seçicilik çalışması için çözeltilerin hazırlanması 60
4. BULGULAR 61
4.1. Sentez Parametreleri Çalışmaları ve Karakterizasyon 61
4.1.1. Sentez parametreleri optimizasyonu 61
4.2. Analitik Performans Parametreleri 75
5. TARTIŞMA 78
5.1. Karakterizasyon ve Sentez Parametreleri Çalışmaları 78
5.1.1. Ekstraksiyon 83
5.1.2. pH çalışması 84
5.1.3. Kararlılık 84
5.1.4. Seçicilik 85
5.2. Sensörün Analitik Performans Değerlendirmesi 87
5.2.1. Süt matriksinde sensörün uygulanması 88
5.2.2. Serum matriksinde sensörün uygulanması 89
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 92
KAYNAKLAR 94
ÖZGEÇMİŞ 114

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 2.1. Antikor ve MIP'lerin karşılaştırılması 12

Çizelge 2.2. MIP'lerin elektrokimyasal sensör olarak kullanıldığı analitler listesi 15

Çizelge 2.3. MIP'lerin optik sensör olarak kullanıldığı analitler listesi 16

Çizelge 2.4. Katkılanmış KN'lerin optik özellikleri 32

Çizelge 2.5. Boyalar ve KN'lerin özelliklerinin karşılaştırılması 35

Çizelge 2.6. Katkılanmış KN'lerin floresans ve fosforesans özelliklerinin sensor alanındaki uygulamaları 38

Çizelge 3.1. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar 49

Çizelge 3.2. Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler 50

Çizelge 4.1. Farklı MPTS hacimleri ile partiküllerin polimerizasyon ve ekstraksiyon sonrası sinyalleri 63

Çizelge 4.2. Farklı miktarlardaki MPTS'nin yeniden bağlanma çalışmalarında fosforesans sinyali üzerindeki etkisi 63

Çizelge 4.3. APTES miktarının baskılama ve ekstraksiyon sonrası fosforesans sinyallerine etkisi 65

Çizelge 4.4. Farklı miktarlarda APTES'in yeniden bağlanma çalışmalarında fosforesans sinyali üzerindeki etkisi 65

Çizelge 4.5. TEOS miktarının baskılama ve ekstraksiyon sonrası fosforesans sinyallerine etisi 67

Çizelge 4.6. Farklı miktarlarda TEOS'un yeniden bağlanma çalışmalarında fosforesans sinyali üzerindeki etkisi 67

Çizelge 4.7. TOB miktarının baskılama ve ekstraksiyon sonrası fosforesans sinyallerine etkisi 67

Çizelge 4.8. Farklı miktarlarda TOB'un yeniden bağlanma çalışmalarında fosforesans sinyali üzerindeki etkisi 68

Çizelge 4.9. Tobramisin sensörü için baskılama faktörü 74

Çizelge 4.10. Tobramisinin organik ve sulu ortamdaki analitik performans çalışması 75

Çizelge 4.11. Gün içi ve günler arası bağıl standart sapma değerleri 76

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 4.12. Süt matriksinde geri kazanım çalışması 76

Çizelge 4.13. Serum matriksinde analitik performans ve geri kazanım çalışması 77

Çizelge 5.1. KN yüzeyi modifikasyonu ve baskılama işlemi için optimum sensör bileşen miktarları 83

Çizelge 5.2. Önerilen yöntemin yapılan çalışmalar ile karşılaştırılması 90

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil **Sayfa**

Şekil 2.1. Metakrilik asitin kimyasal yapısı 7

Şekil 2.2. 2-Triflorometakrilik asitin kimyasal yapısı 8

Şekil 2.3. Etilenglikol dimetakrilat kimyasal yapısı 8

Şekil 2.4. Trimetilpropan trimetakrilat kimyasal yapısı 9

Şekil 2.5. Dimetilformamid kimyasal yapısı 10

Şekil 2.6. Kovalent ve kovalent olmayan baskılama gösterimi 11

Şekil 2.7. Yüzey baskılamanın genel gösterimi 13

Şekil 2.8. Absorpsiyon, floresans ve fosforesans sinyallerinin dalga boylarına göre dizilimi 17

Şekil 2.9. Fotolüminesans sistemlerin enerji diyagramı: Jablonski diyagramı 18

Şekil 2.10. Bir spektroflorimetrenin bileşenleri ve dizilimi 23

Şekil 2.11. Fosforesansın, ışıma başlayıp dedektöre ulaşmasına kadar zamana bağlı diyagramı 24

Şekil 2.12. İletken, yalıtkan ve yarı iletkene ait bant enerji seviyeleri 26

Şekil 2.13. Kuantum noktacıkların boyutlarına göre renk değişimleri 29

Şekil 2.14. KN'lerin sentez yöntemleri 31

Şekil 2.15. Mn katkılı KN'lerde gözlenen fotolüminesansının, çeşitli enerji seviyelerdeki gerçekleşme mekanizması 33

Şekil 2.16. Uyarma ve Emisyon spektrumları 36

Şekil 3.1. MPTS modifiye Mn:ZnS partiküllerin sentezi gösterimi 54

Şekil 3.2. MPTS kimyasal yapısı 54

Şekil 3.3. TOB kimyasal yapısı 54

Şekil 3.4. APTES kimyasal yapısı 55

Şekil 3.5. TEOS kimyasal yapısı 55

Şekil 3.6. Yüzeyi TOB baskılanmış MIP sentezi şematik gösterimi 56

Şekil 4.1. Mn:ZnS KN'lerine ait uyarma ve fosforesans emisyon spektrumu. 62

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.2. Mn:ZnS KN'lerin FTIR spektrumu 62

Şekil 4.3. MPTS modifiye edilmiş Mn:ZnS KN'lerin TEM görüntüsü 64

Şekil 4.4. MPTS modifiye edilmiş Mn:ZnS KN'lerin FTIR spektrumu 64

Şekil 4.5. MPTS modifiye edilmiş Mn:ZnS KN'lerin XPS spektrumu..... 65

Şekil 4.6. Yüzeyi IMIP ile kaplanmış Mn:ZnS KN'lerin TEM görüntüsü 68

Şekil 4.7. Yüzeyi IMIP ile kaplı Mn:ZnS KN'lerin XPS spektrumu..... 69

Şekil 4.8. INIP - Mn:ZnS KN'lerin XPS spektrumu 69

Şekil 4.9. Yeniden bağlanma çalışması için çözücü optimizasyonu. 70

Şekil 4.10. Farklı çözücü ortamında partikül miktarı optimizasyon çalışması. 70

Şekil 4.11. Farklı pH ortamlarında Stern-Volmer kalibrasyon çalışması..... 71

Şekil 4.12. IMIP/INIP partiküllerin stabilite çalışması..... 72

Şekil 4.13. TOB'a yeniden bağlanma çalışmalarında sürenin etkisi 72

Şekil 4.14. TOB'a yeniden bağlanma çalışmalarında sürenin etkisi 73

Şekil 4.15. Hazırlanan IMIP ve INIP partiküllerin seçicilik çalışması..... 74

Şekil 4.16. Stern-Volmer sulu ortam kalibrasyon doğrusu..... 75

Şekil 4.17. Stern-Volmer organik ortam kalibrasyon doğrusu 76

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Kısaltmalar	Açıklamalar
°C	Santigrat derece
APTES	3-aminopropiltrietoksi silan
CEF	Sefdinir
DCE	Dikloroetan
DMF	Dimetil Formamid
DMSO	Dimetilsülfoksit
FTIR	Fouirer Transfer Infrared Spectroscopy (Fourier Dönüşümlü Kızıl Ötesi Spektrometresi)
XPS	X-Ray Photoelectron Spectroscopy (X Işınları Fotoelektron Spektrometresi)
TEM	Transmission Electron Microscopy (Geçirimli Elektron Mikroskobu)
LOD	Limit of Detection (Teşhis Sınırı)
LOQ	Limit of Quantification (Tayin Sınırı)
GEN	Gentamisin
IMIP	Inorganic Molecularly Imprinted Polymer (İnorganik Moleküler Baskılanmış Polimer)
INIP	Inorganic Non-Imprinted Polymer (İnorganik Moleküler Baskılanmamış Polimer)
KN	Kuantum Noktacık
MIP	Molecularly Imprinted Polymer (Moleküler Baskılanmış Polimer)
MPTS	3-merkaptopropiltrietoksisilan
NIP	Non-Imprinted Polymer (Moleküler Baskılanmamış Polimer)
TCA	Trikloroasetik Asit
TEOS	Tetraetoksisilan
TOB	Tobramisin
VDW	Van-Der Waals
Ksv	Sönümlenme katsayısı
PMT	Photon Multiplier Tube (Foton çoğaltıcı Tüp)

1. GİRİŞ

Bu doktora tezinin amacı, yüzeyi, moleküler baskılanmış inorganik polimerle kaplanmış fosforesant ZnS kuantum noktalarından (KN) oluşan bir sensör geliştirmek ve bu sensörün hedef molekülü olarak seçilen bir antibiyotik olan Tobramisin'in (TOB) insan serumundan ve inek sütünden tayininde kullanılmasıdır.

Böylelikle, kromofor ve florofor bir grup içermediği için absorbans ve floresans yapma özelliği olmayan ve bu nedenle spektrofotometri, spektroflorimetri ve yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC) gibi klasik yöntemlerle direkt tayini mümkün olmayan bir ilaç etken maddesinin tayini, geliştirilen yüzeyi inorganik moleküler baskılanmış polimer (IMIP) - bazlı Mn:ZnS KN'den oluşan fosforesans sensörünün kullanılmasıyla, diğer yöntemlere göre oldukça ucuz bir cihaz olan spektroflorimetre ile, mümkün hale gelmiştir.

Floresans tabanlı sensörlerde, biyolojik sıvılarda bulunabilen doğal floresant moleküllerin neden olduğu yüksek zemin sinyali veya aynı dalga boyunda floresans emisyonu yapmaları nedeniyle, spektral seçicilikte sorunlar ortaya çıkmaktadır. Mn:ZnS kuantum noktalarının oda sıcaklığında ve herhangi bir ağır atom, yüzey aktif madde gibi kimyasal ilavesi gerektirmeden fosforesant özellik göstermesi, zemin sinyali problemi tamamen ortadan kalkmaktığı için eşsiz bir spektral seçicilik ve yüksek duyarlılık sağlamaktadır. Bu özellik, moleküler baskılanmış polimerlerin en önemli avantajı olan moleküler seçicilik ile birleştirildiğinde, biyolojik sıvılardan ve hayvansal ürünlerden tayinlerinde ciddi sorunlar (matriks etki veya kromofor/florofor grup yokluğundan kaynaklanan) yaşanan analitlerle ilgili önemli bir sorun çözülmüş olacaktır. Ayrıca, analit olarak seçilen, florofor ve kromofor grup içermeyen TOB'un direkt tayini ile ilgili önemli bir sorun da aşılmış olacaktır. Böylece, fosforesans'a dayalı sensörlerin, floresans'a dayalı sensörlere karşı üstünlükleri de vurgulanmış olacaktır. Dolayısıyla, kararlı bir fosforesans sinyaline ve kararlı baskılanmış bağlanma bölgelerine sahip olan, literatürdeki örneklerinden farklı bir MIP-Mn:ZnS KN fosforesans sensörünün geliştirilmesi sunulan doktora tezinin en önemli hedefi olarak kabul edilmektedir.

Bu amaçla, doktora çalışmasının hedefi geliştirilen sensörün analit olarak belirlenen TOB'un farklı numunlerdeki tayininde başarılı bir şekilde uygulanmasıdır. ZnS kuantum noktalarının yüzeyinde şekil, büyüklük ve fonksiyonel grupların açısal duruşları bakımından TOB'a özgü

boşluklara analit molekülü bağlandığında, Mn:ZnS KN'lerden yayılan fosforesans sinyalinde, enerji transferi sonucunda, bir azalma beklenmektedir. Fosforesans sinyalindeki azalma ile, baskılanmış bölgeye bağlanan TOB derişimi arasındaki ilişkiden yararlanarak kalibrasyon eğrisi oluşturulacak ve sonra da insan serumu ve inek sütünden TOB tayini yapılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Moleküler Baskılamaya Giriş

«Τα πάντα ρει και ουδέν μένει»; “Her şey hareket halinde, hiçbir şey sabit değil” [1]. Bu sözleri ünlü Yunan filozof Heraklitos (M.Ö 6. Y.Y.) etrafımızdaki dünyanın devamlı değiştiğiyle ilgili gözlemini yansıtmak için söylemişti. Bundan yüzyıllar sonra, 1859’da, Charles R. Darwin modern dünyaya ve yaşama bakış açımızı şekillendiren, gelmiş geçmiş en tartışmalı ama aynı zamanda en etkileyici kitaplardan birini yayımladı. Darwin, “Türlerin kökeni” isimli bu kitapta doğanın evrimle devamlı değişen ve mükemmele ulaşmaya çalışan dinamik bir sistem olduğu fikrini ortaya koydu. Evrimin, yani yaşamın kendisinin temeli, Darwin’in “doğal seçilim” olarak adlandırdığı, çevredeki koşullara devamlı olarak uyum sağlamaya çalışma sürecidir [2]. Bu süreç, moleküler düzeyde, biyomoleküller arası etkileşimlerdir. Bu etkileşimlerde ana rolü oynayan moleküller arası birbirini tanıma, aynı zamanda bizim var oluşumuzun da sebebidir. Başka bir deyişle, moleküler tanıma, moleküller arası iletişim ve bu tanıma işlemini takip eden sonuçlar bildiğimiz yaşamın en gerekli parçasıdır. Hücre zarının oluşumunun temeli, fosfolipid ve proteinler arasındaki etkileşimdir. Bu zar, hücre içi ortamı korurken çift yönlü bilgi geçişine de müsaade edecek yapıda oluşmuştur [3]. 1953’te J.D. Watson ve F.H.C. Crick tarafından keşfedilen çift sarmal DNA, yaşamımızın temel yapı taşları arasındaki etkileşimin öneminin altını çizen bir başka müthiş örnektir. Tek moleküller varoluşlarını kuvvetli kovalent bağlarla sağlarken, yukarıda bahsedilen türde karmaşık yapılar genelde daha zayıf bağlayıcı kuvvetler tarafından bir arada tutulur. Bu sayede daha dinamik ve esnek olan bu yapılar, farklı birimler arası hızlı organizasyon, doğal süreçlerin çoğu için temel gereklilik olan DNA replikasyonu, enzimatik kataliz, protein biyosentezi ve evrimin kendisi için olanak yaratır [4].

Doğanın sunduğu bu harika moleküler tanıma örneklerinden ilham alan bilim insanları, kendilerini doğal sistemlerin bu özelliğini taklit etmeye ve bunları yapay reseptör sentezi, spesifik katalizör ve ilaç geliştirme süreçlerinde kullanmaya adamışlardır. Bu da supramoleküler kimya denilen alanın ve terimin doğmasına sebep olmuştur. 19. Yüzyılda bilim insanları bu alanda yoğun olarak aynı molekül ya da atom içinde gerçekleşen etkileşimlerden ziyade, farklı ama birbirine yakın moleküller arasında araştırmalarını sürdürdü.

Geleneksel organik kimya, daha çok molekülleri bir arada tutan kuvvet olan kovalent bağların oluşumu ve bozuluşu üzerine çalışmaktadır. Ancak, bu bağların dirençleri ve yüksek enerji bariyerleri yüzünden oluşmaları ve kırılmaları fazlasıyla güç olduğundan, doğanın ihtiyaç duyduğu esnek, geri dönüşümlü ve dinamik sistemler için pek kullanışlı değillerdir. İşte bu yüzden doğa, varoluşunu hidrojen bağları, iyon çiftleri ve hidrofobik etkileşimler gibi moleküller arası zayıf etkileşimlerle temellendirir [5]. Bu etkileşimler, birer birer düşünüldüğünde zayıf olsa da hücre zarı ya da enzim gibi kompleks sistemlerde birleşerek etkisel olarak kovalent bağlara benzer şekilde güçlenir. Kompleks sistemlerdeki ayarlanabilme ve düzeltilebilme olanağı da hesaba katıldığında bu tip sistemlerin avantajları daha net görülebilir.

Bu tür materyallere nasıl ulaşırız ve araştırmamız için yararlanırız? Başka alanlardaki bilim insanları, kendi uzmanlıklarına göre, kendi ihtiyaçlarını karşılayan farklı metotlar geliştirmiştir. Bunlardan ilki, biyolojide bağışıklık sisteminden faydalanarak söz konusu bileşik için antikor üretimidir. Bu yöntem, antikorlar hala kimya endüstrisinde uygulanmak için oldukça pahalı olsa da artık birçok şirket tarafından makul bir ücret karşılığında sıklıkla uygulanmaktadır. Ayrıca, hayvan koruma dernekleri ve çevre ajanslarının itirazları da araştırmanın hayvanlar üzerinde yapılmasını zorlaştırmaktadır. İkincisi ise, reseptör molekülün baştan tasarlanıp üretilmesidir. Kimyacılar erişilebilir olan maddeden sentez yoluyla kafes ve taç gibi çeşitli yapılar üretmişlerdir [6-9]. Ancak, bu tip yapay reseptörlerin sentezlenme süresi, maddi kaynaklı problemler ve sentez zorluğu, bilim insanlarını seçici moleküler tanıma ihtiyaçları için alternatif çözümler aramaya zorlamaktadır. Bu alternatif çözümlerden biri de sentetik türlerin ekonomik, dayanıklılık ve dirençlilik özelliklerini doğal reseptörlerin moleküler tanıma özellikleri ile birleştiren moleküler baskılanmış polimerleri meydana getirmiştir (MIP) [10, 11].

Hedef molekül için çapraz bağlı, yalnızca ilgili türe özgü polimerik yapılar oluşturma işlemine moleküler baskılama denir. Moleküler baskılama işlemi için öncelikle fonksiyonel monomer ve analit etkileşerek bir ön polimerizasyon kompleksi oluşur. Sonrasında, çapraz bağlayıcının eklenmesi ile polimerizasyon başlatılır. Çapraz bağlayıcının aşırısı sayesinde, fonksiyonel monomerin ve analitin fonksiyonel grupları dondurulur. Analitin yapıdan uzaklaştırılması sonucunda tamamen analite özgü şekil ve boyutta bir tanıma bölgesi elde edilir. Bu kavitedeki fonksiyonel grupların açısal yönlenimi analitin fonksiyonel grupları ile etkileşmeye hazır haldedir. MIP, analite özgü moleküler tanıma bölgelerine sahip olmakta ve yüksek ilgi ile etkileşim sağlamaya hazır hale gelmiş olmaktadır. Moleküler baskılamanın ortaya çıkışında enzim-substrat, antijen-antikor, hormon-reseptör, anahtar-kilit mekanizması yatar. Bundan

dolayı MIP'ler baskılama teknolojisi kullanılarak elde edilen yapay reseptörler veya plastik antikorlar olarak nitelendirilirler. Tanıma ve taklit yeteneğine sahiptirler. Bu özellikleri sayesinde biyolojik sıvılardan ve karmaşık numunelerden ayrıştırılıp analiz edilebilirler. Bahsedildiği gibi, MIP'ler analiti tanıma özelliğine sahip olan yapay reseptörlerdir. Çalışma konusu olarak seçilmesinin birçok avantajı mevcuttur. Bunlardan en önemlisi, ilgili analite gösterdikleri yüksek afinite ve seçicilikleridir. Hedef molekülün kısa sürede kendisine özgü kaviteye yerleşmesini sağlar. Çevresel faktörlere, yüksek sıcaklık, basınç, asidik ve bazik pH ortamlarına ve organik çözücülere dayanıklıdır. Ek olarak, düşük maliyetle kolayca hazırlanabilen yapılardır. Fiziksel ve kimyasal olarak sağlam yapıdadırlar. Diğer bir avantajı ise moleküler tanıma özelliklerini kaybetmeden uzun süre, oda sıcaklığında saklanabilirler.

Hazırlanışlarında gelişmiş sentetik işlemlere gerek duyulmayışını da göz önüne aldığımızda, son 20 yılda moleküler baskılama üzerinde çalışan bilim insanı sayısının neden hızla arttığı da anlaşılabilmektedir.

2.2. Moleküler Baskılama Nedir?

Moleküler baskılama metodu, analit için oldukça seçici ve spesifik tanıma bölgelerine sahip olan, polimerik yapıyı farklı matrikslerde bir ayırma ve saflaştırma olarak kullanma tekniğidir [11].

MIP'ler yalnızca bir kalıp moleküle (hedef moleküle, analite) özgü bağlanma bölgelerine sahiptirler. Bu bölgeler, polimerizasyon gerçekleşirken kalıp molekül ile seçilen monomere ait fonksiyonel gruplar arasındaki etkileşim sayesinde oluşur. Oluşan bu kavitelerin üç boyutlu yapısı; şekli, büyüklükleri, fonksiyonel gruplarının türleri ve uzaydaki yönelimleri bakımından kalıp molekül ile birbirinin tamamlayıcısıdır [11]. Bu sayede sahip oldukları yüksek seçicilik, MIP'lerin dayanıklılık ve yeniden defalarca performans kaybı olmadan kullanım özellikleri ile birleşince oldukça ilgi çekici bir yöntem olmuştur. Son zamanlarda özellikle yapay antikor ve sensör alanında oldukça yaygın bir kullanıma sahiptirler [11].

MIP'ler genellikle, belirli bir derişimdeki kalıp molekülü içeren çözeltiye, fonksiyonel monomerin ilâvesi ile hazırlanır. Bu aşama ön-polimerizasyon olarak adlandırılır ve fonksiyonel monomer-kalıp molekül arasında kararlı bir kompleks oluşur. Bu işlem uygun çözücü içinde yapılmalıdır. Çözücü; kalıp molekül, fonksiyonel monomerler, çapraz bağlayıcı, başlatıcı ve tüm

bileşenlerin hepsinin bir araya gelmesini sağlamaktadır. Gözenekli yapılar elde edilmesini sağlaması da bir diğer önemli özelliğidir. Bu nedenle "çözücü" kelimesi yerine genellikle "porojen" kelimesi kullanılmaktadır. Polimerizasyon anında, çözücü molekülleri polimer yapı içinde dağılır ve polimerizasyon sonrasında çözücünün uzaklaşmasıyla elde edilen polimerik yapıda gözenekler oluşur. Porojenin özellikleri, polimerin morfolojisinin ve toplam gözenek hacminin kontrol edilmesinde kullanılabilir. Uygun porojen kullanıldığında, düzgün gözenek oluşumu ve yüksek spesifik yüzey alanı oluşumunu sağlanır. Çözücünün hacminin arttırılması, gözenek hacminin de arttırılmasını sağlar. Oluşan gözenekler, kalıp molekülün yapıdan uzaklaştırılmasında ve tekrar spesifik bağlanmayı sağlamada önemli ölçüde etkindirler. Çözücü seçimi kalıp ve fonksiyonel monomer arasındaki etkileşim ve ön polimerizsasyon kompleksinin oluşumunda kritik bir rol oynar. Çözücünün bu oluşumu desteklemesi ve dolayısıyla baskılamanın etkisini arttırıcı rol oynaması beklenir. Devamında elde edilecek yapıya, yapısal olarak sertlik kazandırıp bir ağ örgüsü oluşturmak için çapraz bağlayıcı eklenir. Polimerizasyon başlatıcı eşliğinde bir tetikleyici ile (sıcaklık veya UV ışığı) başlatılır. Polimerizasyon sonrasında kalıp molekül, uygun olarak seçilen bir ekstraksiyon çözücüsü ile detaylıca yıkama işlemine tabii tutularak ekstrakte edilir. Yapıda kalan kavite tamamen kalıp moleküle özgüdür ve kalıp molekülü içeren farklı matriks ortamlarında seçici olarak analite yeniden bağlanır [12].

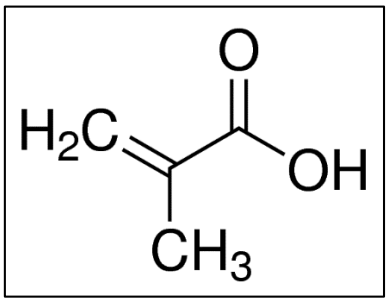
2.2.1. Kalıp molekül

Molekül baskılanmış polimer alanında kalıp molekül terimi potansiyel hedef molekülleri tanımlamaktadır. Literatürler incelendiğinde çok sayıda farklı türün kalıp molekül olarak kullanıldığı görülmektedir. Bu amaçla kullanılan moleküllerin arasında, ilaç etken maddeleri, amino asitler, hormonlar, metal iyonları, peptitler ve proteinler yer almaktadır [13-28]. Kalıp molekülün başarılı bir baskılama işlemi gerçekleştirebilmek boyutu ve şeklinden bağımsız olarak monomer ile etkileşecek en az bir fonksiyonel gruba sahip olması gerekmektedir. Bu sayede etkileşim polimerizasyon süresi boyunca kararlı olur ve uygun ekstraksiyon çözücüsü ile analit yapıdan kolaylıkla uzaklaşabilmektedir. Bu şekilde sentezlenen polimer çok sayıda seçici kavite şekil, boyut ve yönlenim bakımından tamamen kalıp moleküle özgü olacaktır [29].

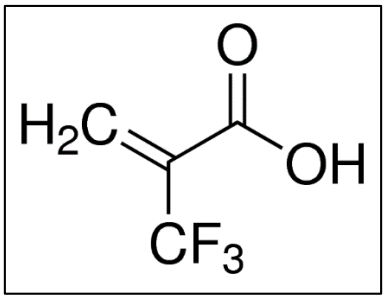
2.2.2. Monomer

Yüksek verimli bir baskılama işlemi için fonksiyonel monomer ve kalıp molekül arasındaki kendiliğinden birleşme ve etkileşim kritik bir öneme sahiptir [11]. Monomerin ve kalıp molekülün fonksiyonel grupları birbiri ile kararlı bir etkileşim oluşturacak şekilde seçilmelidir [30-32]. Eğer kalıp molekül karboksilik asit veya sülfonik asit grupları içeriyor ise, fonksiyonel monomerin bunlardan en az biri ile etkileşecek amin grubu içermesi beklenir [11]. Bu sayede kalıp molekül ve fonksiyonel monomer arsında güçlü iyonik etkileşimler sağlanabilir. Monomer ve kalıp molekül arasında oluşacak hidrojen bağları da verimli bir baskılama için oldukça önemlidir. Tüm bu bilgilerin ışığında kalıp molekülün yönlenimi ve baskılama süreci sırasındaki konformasyonunun bozulmadan kalmasında seçilecek fonksiyonel monomerin katkısı oldukça fazladır [11].

Genellikle fonksiyonel monomer olarak Şekil 2.1'de gösterilen metakrilik asit (MAA) seçilmektedir. Bunun yanısıra, en sık kullanılan monomerlerden olan Şekil 2.2'de gösterimi yapılan 2-triflorometakrilik asit (TFMAA) yapısında bulunan flor elementi nedeniyle yapıya elektronegativite kazandırmakta ve daha kuvvetli asidik özelliğe sahip olmaktadır. Bu özellikler TFMAA bileşiğinin daha güçlü iyonik etkileşim yapmasını sağladığından son zamanlarda sıklıkla tercih edilmektedir [33].



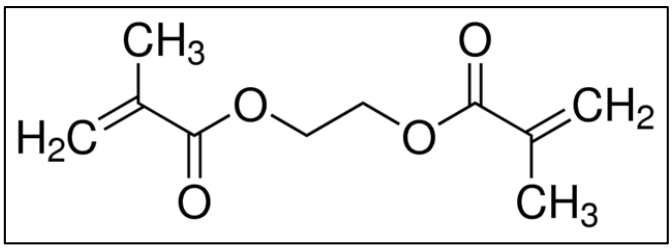
Şekil 2.1. Metakrilik asitin kimyasal yapısı



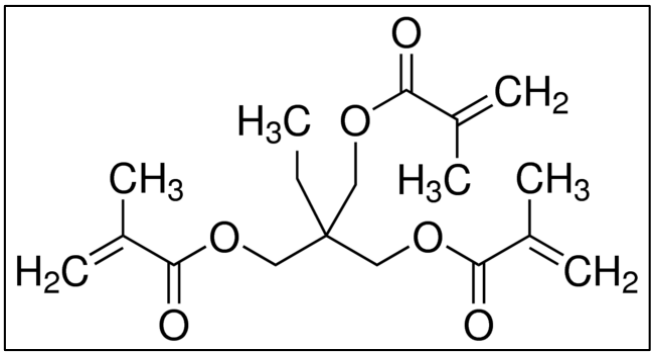
Şekil 2.2. 2-Triflorometakrilik asitin kimyasal yapısı

2.2.3. Çapraz bağlayıcı

Çapraz bağlayıcının baskılama işlemindeki görevi, kararlı bağlanma kaviteleri üretmek için fonksiyonel monomeri ağ örgüsüne sabitlemek ve polimerik yapının sağlamlığının sağlanmasıdır. Çapraz bağlayıcı miktar olarak diğer bileşenlere göre daha fazla miktarda kullanılmaktadır. MIP'lerin morfolojisi çapraz bağlayıcı seçimine göre şekillenmektedir, bu nedenle çapraz bağlayıcı seçilirken dikkat edilmelidir [11]. Çapraz bağlayıcıların seçici olmayan adsorpsiyona sebep olmaması için kalıp molekül ile etkileşime girmemesi gerekir [34-36]. Sıkça kullanılan çapraz bağlayıcılar, sırasıyla Şekil 2.3 ve Şekil 2.4'te gösterimleri yapılan etilenglikol dimetakrilat (EGDMA) ve trimetilpropan trimetakrilattır (TRIM). EGDMA iki adet akrilat grubuna sahipken, TRIM üç adet akrilat grubuna sahiptir. Bu özellik TRIM kullanıldığında daha sağlam yapıda bir polimerik yapı oluşturulabileceğini göstermektedir [37]. Bunun bir sonucu olarak da daha yüksek kapasiteye sahip ve daha seçici MIP'ler oluşmaktadır. Optimum çapraz bağlayıcı kalıp moleküle ve çözücüye de bağlıdır. Proteinleri baskılarken, metilenbisakrilamid gibi suda çözünebilen bir çapraz bağlayıcıya ihtiyaç duyulur [11].



Şekil 2.3. Etilenglikol dimetakrilat kimyasal yapısı



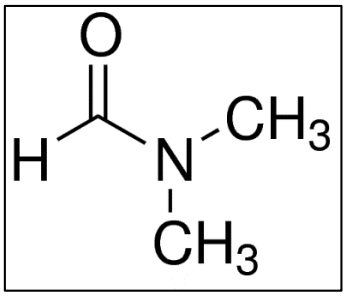
Şekil 2.4. Trimetilpropan trimetakrilat kimyasal yapısı

2.2.4. Başlatıcı

Başlatıcının görevi, serbest radikal polimerizasyonunu başlatmaktır. UV ışık kaynağı, ısı veya bir kimyasal ile etken ile tetiklendiğinde karbon merkezli serbest radikaller oluşur. Eşleşmemiş elektronlar, monomer ve çapraz bağlayıcı yapısındaki çifte bağlarla etkileşip polimerizasyon başlar ve iki radikal birbiri ile reaksiyona girdiği an sonlanır. Polimerizasyon ortamına eklenecek miktarı göreceli olarak en düşük olan bileşendir.

2.2.5. Çözücü

Çözücü seçimi, iyi bir baskılama işleminin gerçekleştirilmesi ve yeniden bağlanma çalışmalarının başarı ile yapılması için kritik bir öneme sahiptir [11]. Öncelikle seçilen çözücü, ön-polimerizasyon karışımındaki tüm bileşenleri çözmeli, yüksek verimde kalıp molekül-fonksiyonel monomer etkileşimine izin vermeli ve gözenekli bir polimerik yapının hazırlanması için yardımcı olmalıdır [38-41]. Kalıp molekül-fonksiyonel monomer kompleksinin yeterince etkileşebilmesi için, düşük polaritede aprotik organik çözücüler tercih edilmelidir. Dimetilformamid (DMF) gibi yüksek polaritedeki aprotik çözücüler kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki komplekse Van Der Waals (VDW) kuvvetleri ve iyonik etkileşimler ile girişim yapma eğilimindedirler, kimyasal yapısı Şekil 2.5'te gösterilmiştir [11, 42]. Metanol ve su gibi protik çözücülere ise ön polimerizasyon kompleksine hidrojen bağları ile girişim yapabilirler. Uygun çözücü veya çözücü karışımı kullanılması yüksek bağlanma kapasitesine ve iyi seçiciliğe sahip MIP'lerin hazırlanmasında önemlidir [41].

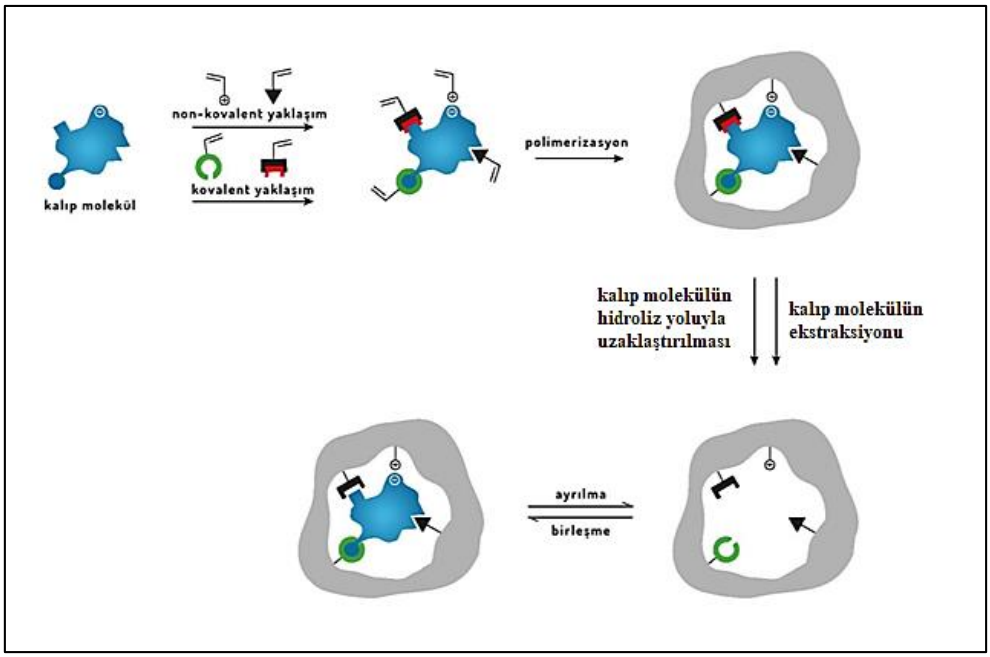


Şekil 2.5. Dimetilformamid kimyasal yapısı

2.3. Moleküler Baskılama Tekniğine Yaklaşımlar

Moleküler baskılama işlemi şimdiye kadar fonksiyonel monomer ve kalıp molekül arasındaki etkileşime göre sınıflandırılmaktadır [11]. G. Wullf ve arkadaşları tarafından geliştirilen kovalent baskılama yönteminde ön-polimerizasyon kompleksini oluşturan kalıp molekül ve fonksiyonel monomer arasındaki etkileşim sitokiyometrik olarak kovalent bağlanma sonucu oluşmuştur ve Şekil 2.6'da gösterimi sunulmuştur [43]. Bu yöntemin avantajı yalnızca ön polimerizasyon kompleksi çok kararlı bir şekilde oluşması, sitokiyometrik oranda gerçekleşmesi ve bunun bir sonucu olarak homojen bağlanma bölgelerinin oluşmasıdır. Diğer taraftan bu yöntem için uygun çok fazla kimyasal yoktur ve fonksiyonel monomerin reaksiyona girmeden önce türevlendirilmesi gerekebilir. Kalıp molekülün yapıdan uzaklaştırılması kolay olmamaktadır, kovalent bağların kırılması gerekmektedir bu da asit hidrolizi ile gerçekleştirilebilmektedir. Analitin baskılanmış polimere yeniden bağlanması, bağ oluşumu nedeniyle yavaştır ve bağlanma bölgeleri sınırlı sayıdadır [11].

Bir diğer yaklaşım kovalent olmayan etkileşime dayalıdır ve Şekil 2.6'da gösterimi sunulmuştur. Bu yaklaşım Mosbach ve arkadaşları tarafından ön-polimerizasyon kompleksinin, hidrojen-bağı, π - π etkileşimleri, iyon-iyon, iyon–dipol, dipol-dipol, hidrofobik ve Van der Waals etkileşimleri gibi moleküller-arası etkileşimlerin sonucu olarak etkileşimlerle olduğunu ortaya koymaktadır. Bu teknikte zayıf etkileşimler rol aldığından, fonksiyonel monomerin aşırısı ön-polimerizasyon kompleksini kararlı kılması için kullanılmaktadır [44-49]. Kovalent olmayan yaklaşım, heterojen bağlanma bölgelerin elde edilmesine rağmen, daha kolay ve hızlıdır. Polimerizasyon sonrası kalıp molekülün yapıdan uzaklaştırılması basit bir ekstraksiyon işlemi ile tamamlanabilir [11, 44]. Ancak, fonksiyonel monomer-analit etkileşimi sitokiyometrik olmadığından, aralarındakiğ etkileşimi arttırmak amacıyla monomer fazlaca kullanılır ve spesifik olmayan bölgeler ortaya çıkabilir.



Şekil 2.6. Kovalent ve kovalent olmayan baskılama gösterimi

Üçüncü olarak M. Whitcombe tarafından ortaya atılan hibrit yaklaşımı geliştirilmiştir. Bu teknik yarı kovalent yaklaşım olarak da adlandırılmaktadır [50]. Yukarıda söz edilen iki tekniğin avantajlarını ele alan bir tekniktir. Yöntem, baskılama aşamasında güçlü kovalent bağların oluşmasını sağlarken, kalıp molekül yapıdan uzaklaştırıldıktan sonra yeniden bağlanma veya tanıma aşamasında kovalent olmayan yaklaşım üzerine kurulmuştur [11].

MIP‘ler Bölüm 2.1’de bahsedildiği gibi, moleküler baskılama yöntemi kullanılarak elde edilen, plastik antikorlar gibi çeşitli analitleri tanıma özelliğine sahip yapılardır. Bu nedenle yapay reseptörler olarak adlandırılmaktadırlar. MIP’lerin, antikorlara olan üstünlükleri ve karşılaştırmaları Çizelge 2.1’de sunulmuştur. Bu çizelgeye göre MIP’lerin ömürleri, kullanım süreleri, yeniden kullanılabilirlikleri antikorlara kıyasla daha fazladır. Antikorların maliyeti 1000 dolara kadar çıkarken MIP’lerin üretimi oldukça ekonomiktir. Optimizasyon sürelerinin kısa olması ve organik ortamda da çalışabilme avantajı sayesinde antikorlara göre MIP’ler tercih sebebi olmaktadır.

Çizelge 2.1. Antikor ve MIP'lerin karşılaştırılması

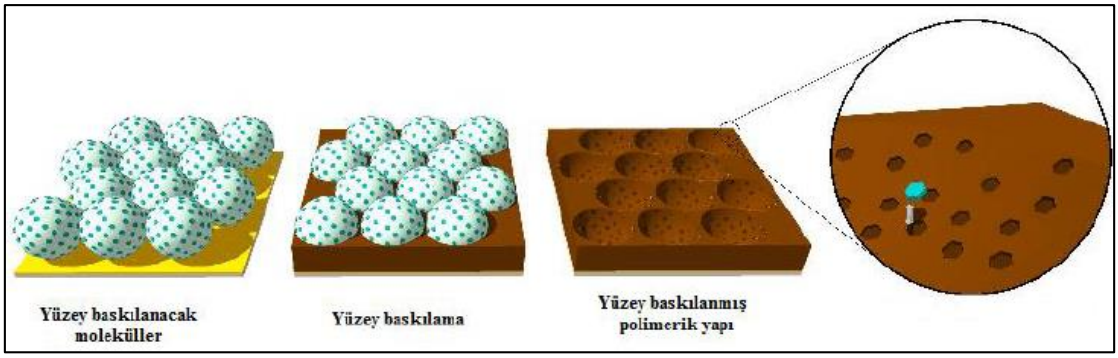
Parametre	Antikor	MIP
Kullanım süresi	Ömürleri 6-12 ay.	Ömürleri birkaç yıl.
Üretim	Kompleks işlem basamakları içerir.	Hızlı ve kolaydır.
Saklama Koşulları	Dondurucuda saklanmak zorunda.	140 °C'a kadar saklanabilirler.
Yeniden Kullanılabilirlik	Yeniden kullanılabilirliği çok düşük.	Yeniden defalarca kullanılabilirler.
Maliyet	Bedeli 1-1000 $/mg	Bedeli 0.25-5 $/mg
Optimizasyon Süreleri	Geliştirilme ve optimizasynları uzun süreli olabilir.	Geliştirilme ve optimizasyon süresi göreceli olarak daha kısadır.
Çalışma Ortamı	Organik ortamda çalışma zorluğu vardır ve denatüre olurlar. Yalnızca sulu ortamda çalışılabilir.	Organik Ortamda yüksek performans gösterirler. Sulu ortamda sınırlı performansları vardır.

2.3.1. Yüzey baskılama

Geleneksel olarak hazırlanan MIP'ler bir takım eksiklikler göstermektedir. Polimerik ağın içine yerleşen kalıp molekül yapıdan tam olarak uzaklaştırılamadığında, zayıf bağlanma kapasitesi ve düşük bağlanma kinetiği gözlenmesi kaçınılmazdır. Bunun üstesinden gelebilmek için yüzey baskılama yöntemi önerilmiştir. Yüzey baskılama yöntemi ile analit yüzeyde ve yüzeye yakın bölgelerde baskılanmaktadır. Bu yöntem ile analit yapının içine sıkışıp kalmaz dolayısıyla polimerik yapıdan ekstraksiyon ile kolaylıkla uzaklaştırılır. Yeniden bağlanma kinetiği ve kütle transferi daha hızlı gerçekleşir.

Yüzey baskılama metodunda öncelikle, polimer ince bir film tabakası olarak sentezlendikten sonra hedef molekül bir polimere baskılanır. Bundan ayrı olarak da protein molekülleri genelde küresel bir substratın yüzeyine modifiye edilir ve bu türün etrafında daha sonra bir polimerleşme meydana gelir [51-53]. Bu baskılama yonteminde, kalıp molekülün bağlanma bölgeleri polimer tabakasının yüzeyine yakın bölgelerde bulunmalıdır. Böylece, kütle transferi ve seçimli tanıma bölgelerinin hedef molekülden ayrılması sırasında gerçekleşen problemler aşılabilmektedir [54-56]. Özellikle nanoboyuttaki küresel türler için uygun bir yöntemdir. Birçok molekül, yüzey baskılamada destek maddesi olarak başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Örneklendirecek

olursak bunlar; silika partiküller [57-59], Fe_3O_4 manyetik partiküller [60-66], nano tüpler [67-70], polistiren partiküller [71] ve kuantum noktalar (KN)'dır [72]. Bununla beraber, bahsedilen bu partiküllerin yüzeylerinin işlevsellik kazanabilmesi bir takım modifikasyon işlemlerinin yapılması gerekmektedir. Modifikasyon sonrasında elde edilen partiküller son derece uygun mekanik yapıda ve kararlılıktadır [73]. KN'ler kullanılarak yapılan yüzey baskılama çekirdek/kabuk yaklaşımına göre gerçekleşmektedir. Bu modifikasyon sayesinde çekirdeğin fotokararlılığı ve kuantum verimi artmaktadır. Kabuk, yani yüzey baskılama sol-jel yöntemine göre gerçekleştirilir. MIP ve NIP çözelti içinde sentezlenmektedir. Bu yöntem ile yapılan sentezde, KN partiküllerin yüzeyi TOB ile baskılanarak sensöre ait kabuk kısmı elde edilmiş olur. Yöntem sayesinde yüzey morfolojisi kontrol edilebilir, göreceli olarak daha ekonomik bir sentez gerçekleştirilir. Çözeltide sentezlenen partiküllerin boyutları 2 nm ile 0,2 µm arasındadır. İnorganik polimerizasyon olarak adlandırılabilecek sol-jel yöntemi hidroliz ve kondenzasyon reaksiyonları olmak üzere iki ana basamaktan oluşmaktadır. Hidroliz reaksiyonu, oda sıcaklığında bir suyla ve asidik, bazik veya nükleofilik katalizörün varlığında reaktif grupların hidroksil gruplarına dönüşmesidir. Hidroliz reaksiyonunda, pH ve çözücü değiştirilerek sentezlenecek partikül kontrol edilebilir. Asidik ortam hidrolizinde bir alkoksit grubu protonlanır. Protonlu oksijen, silikayı suya karşı daha duyarlı hale getirir. Bazik ortam hidrolizinde ise, silikanın hidroksil anyonunun mükleofilik saldırısı ve sonucunda bir alkoksit anyonunun yer değiştirmesi gerçekleşir. Kondenzasyon reaksiyonlarında, hidroliz sonucu meydana gelen silanollerin (Si – OH) birbirleri ile reaksiyona girip Si – O – Si bağlarını oluşturmasını sağlar. Kondenzasyon mekanizması ile monomer-analit kompleksinin, çapraz bağlı bir yapı meydana getirmesi ile kabukta yüzey baskılama işlemi gerçekleştirilir. Hidroliz reaksiyonundaki gibi, kondenzasyon reaksiyonlarında da pH, reaksiyon hızı elde edilecek partikül morfolojisini birincil etkileyen etmenlerdendir.



Şekil 2.7. Yüzey baskılamanın genel gösterimi

2.4. Moleküler Baskılamada Son Gelişmeler

Son zamanlarda KN'ler, optik sensör uygulama alanında MIP'ler ile birlikte çalışılmaktadır. Örneğin, Liu ve arkadaşları 4-nitrofenol'ün (4-NP) seçici olarak tayini için çekirdek kabuk sistemi üzerine bir yüzeyi baskılanmış fosforesans sensör geliştirmiştir. Bu sensör, CdSe kuantum noktağıcı üzerine yapılan modifikasyon ve yüzeyi 4-NP ile baskılanma üzerine oluşturulmuş bir sistemdir. Optik sensörün çalışma prensibine göre, analit ile etkileşen KN'nin sinyal düşüşü analitin derişim ile doğrusaldır. Sensörün, mikromolar derişim düzeyinde duyarlı olduğu sonucuna ulaşılmıştır [74].

KN'lerin optik sensör alanındaki kullanımı, ilerleyen bölümlerde detaylıca bahsedileceği üzere, geniş bir absorpsiyon ve dar bir emisyon spektrumuna sahip olmasından ileri gelmektedir ki bu özellik çeşitli analitler için KN'yi umut vaadeden bir sensör adayı yapmaktadır [75, 76]. KN'lerin yüzeyinin modifiye edilmeye uygun oluşu, bunların kullanım alanlarını genişletmiştir. Bunun yanında, KN-MIP kombinasyonuna dayalı sensörlerin KN-imünosensörlere göre temel avantajı kimyasal kararlılıkları, daha düşük maliyetli olmaları ve küçük molekülleri tayin edebilmeleridir. Bahsedilen bu özelliklere dayanarak KN-MIP sensörlerin, biyoanalizlerde, çevresel analizlerde ve farmasötik alanlarda yüksek seçicilikte sensör olarak yaygın bir şekilde kullanımaya başlandığı söylenebilir [77].

Baskılanmış polimerler teorik olarak istenilen her analit için sentezlenebilmektedir. 10000'den fazla molekül ve biyolojik yapı için başarılı baskılama işlemleri literatüre girmiştir [77]. Bu çalışmalarda kalıp molekül olarak kullanılan analitler, anorganik iyonlar, nükleik asitler, proteinler, virüsler hatta hücreler bile kullanılmıştır. Duyarlılık anlamında, piko ve femtomolar derişimlerine inilerek önemli gelişmeler gösterilmiştir. Günümüzdeki popüler konularını daha çok, hayatı kolaylaştırabilen ve biyolojik sıvılar ile hızlı tayin yöntemleri üzerine sensör çalışmaları oluşturmaktadır. Birçok araştırmacıyı geniş bir aralıkta sensör araçlarının geliştirilmesi için disiplinler arası çalışılması konusunda motive etmektedir. Özet olarak hem elektrokimyasal hem de optik sensörlere ait literatür çalışmaları Çizelge 2.2 ve 2.3'te verilmiştir.

Çizelge 2.2. MIP'lerin elektrokimyasal sensör olarak kullanıldığı analitler listesi

Analit	Tayin Yöntemi	LOD (M)	Referans
Farmasötik Türler			
Asetaminofen	Voltametri	$2{,}30 \times 10^{-9}$	[78]
Parasetamol	Amperometri	$4{,}30 \times 10^{-8}$	[79]
Gansiklovir	Amperometri	$1{,}50 \times 19^{-9}$	[80]
Klorambusil	Voltametri	$1{,}18 \times 10^{-9}$	[81]
Dekstrometorfan	Potansiyometri	$1{,}00 \times 10^{-6}$	[82]
Salbutamol	Voltametri	$7{,}00 \times 10^{-9}$	[83]
İfosfamid	Voltametri	$4{,}20 \times 10^{-10}$	[84]
Digoksin	Empedans	$6{,}95 \times 10^{-11}$	[85]
Antibiyotikler			
Norfloksasin	Amperometri	$4{,}60 \times 10^{-8}$	[86]
Kanamisin	Amperometri	$1{,}20 \times 10^{-8}$	[87]
Seftazidim	Voltametri	$5{,}50 \times 10^{-10}$	[88]
Metronidazol	Voltametri	$9{,}10 \times 10^{-8}$	[89]
Biyobelirteçler			
Tetrahidrokannabinol ve tripsin	Kapasitif	$1{,}00 \times 10^{-14}$	[90]
Dopamin	Voltametri	$3{,}30 \times 10^{-8}$	[91]
L-Dopa	Voltametri	$1{,}20 \times 10^{-8}$	[92]
Norepinefrin	Voltametri	$1{,}00 \times 10^{-7}$	[93]
Melatonin	Amperometri	$6{,}00 \times 10^{-9}$	[94]
L-Fenilalanin	Voltamertri	$1{,}00 \times 10^{-9}$	[95]
Oksitosin	Empedans	$6{,}00 \times 10^{-5}$	[96]
Okside glutatyon	Amperometri	$1{,}80 \times 10^{-9}$	[97]

Çizelge 2.3. MIP'lerin optik sensör olarak kullanıldığı analitler listesi

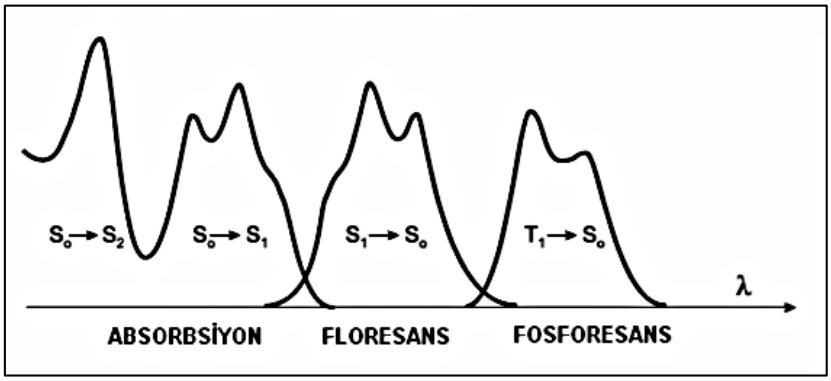
Analit	Tayin Yöntemi	LOD (M)	Referans
Farmasötikler			
Parasetamol	Floresans	$1{,}00 \times 10^{-6}$	[98]
Diklofenak	Yüzey Plazmon Rezonans	$4{,}14 \times 10^{-9}$	[99]
Klenbuterol	Floresans	$3{,}80 \times 10^{-10}$	[100]
Metoprolol	Yüzey Plazmon Rezonans	$7{,}11 \times 10^{-9}$	[101]
Prednizolon	Yüzey Plazmon Rezonans	$1{,}50 \times 10^{-8}$	[102]
Antibiyotikler			
Doksisiklin	Elektrokemilüminesans	$5{,}17 \times 10^{-11}$	[103]
Penisilin	Reflektometrik girişim spektroskopisi	$4{,}32 \times 10^{-3}$	[104]
Metronidazol	Floresans	$1{,}50 \times 10^{-7}$	[105]
Biyobelirteçler			
Dopamin	Kemilüminesans	$9{,}79 \times 10^{-9}$	[106]
Sarkozin	Reflektometri	$4{,}50 \times 10^{-8}$	[107]
Tirozin Fosfopeptit	Floresans	$3{,}70 \times 10^{-7}$	[108]
Lizozim	Floresans	$1{,}02 \times 10^{-8}$	[109]
Kreatinin	Yüzey Plazmon Rezonans	$1{,}17 \times 10^{-6}$	[110]
Sığır serum albumin	Kombine İnterferometri Sistem	$1{,}20 \times 10^{-16}$	[111]
Galektin-3	Yüzey Plazmon Rezonans	$6{,}66 \times 10^{-11}$	[112]
17b-Estradiol	Yüzeyi Güçlendirilmiş Raman Spektroskopi	$5{,}00 \times 10^{-14}$	[113]
Ribonükleaz A	Kemilüminesans	$2{,}35 \times 10^{-14}$	[114]
Sitokrom C	Floresans	$1{,}10 \times 10^{-7}$	[115]
Fikosiyanin	Floresans	$7{,}50 \times 10^{-8}$	[116]
Metamidofos	Floresans	$9{,}16 \times 10^{-8}$	[117]
Ürik Asit	Yüzey Plazmon Rezonans	$2{,}96 \times 10^{-6}$	[118]

2.5. Lüminesans

Lüminesans, farklı uyarım yolları ile uyarılmış molekül ya da atomların yaptığı emisyona verilen isimdir. Lüminesans; fotolüminesans, kemilüminesans, biyolüminesans, tribolüminesans, katotlüminesans ve termolüminesans gibi farklı uyarma biçimlerine göre farklı şekillerde isimlendirilirler. Bunlardan fotolüminesans; floresans ve fosforesans olacak şekilde iki ayrı başlıkta incelenir [119].

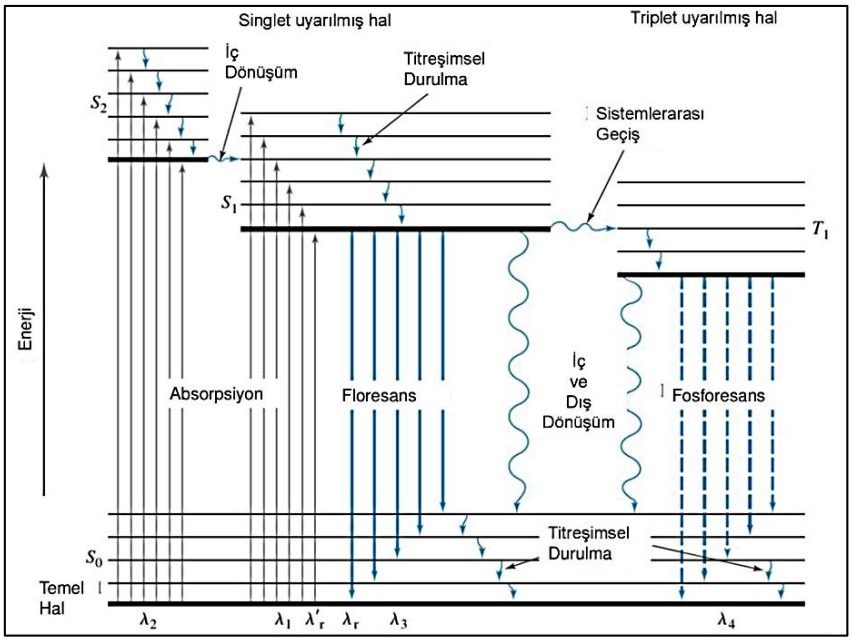
2.5.1. Fotolüminesans

Floresans ve fosforesans, uyarılma işleminin fotonların absorbe edilmesi ile gerçekleşmesinden dolayı benzerlik göstermektedir. Floresans, uyarılan elektronun elektronik enerji aktarım sürecinde spininde bir değişiklik olmaması özelliği ile fosforesanstan ayrılır. Bu özellik floresansın hemen gerçekleşip yok olan bir ışıma olması ile sonuçlanır. Buna karşın, fosforesansın emisyonundan sorumlu elektron spinindeki değişim, ışınlamanın bitmesinden sonra kolaylıkla belirlenebilir bir süre, genelde birkaç saniye veya daha fazla, ışımanın sürmesi ile sonuçlanır (10^{-3} - 10^{0} s). Hatta daha uzun sürmesi de olasıdır buna örnek olarak karanlıkta parlayan oyuncaklar verilebilir. Floresans ve fosforesans emisyonu, uyarılma için kullanılan ışığın dalga boyundan daha uzun dalga boyunda gerçekleşir. Şekil 2.8'de absorpsiyon, floresans ve fosforesans spektrumlarının dalga boylarına göre dizilimi gösterilmiştir [120, 121].



Şekil 2.8. Absorpsiyon, floresans ve fosforesans sinyallerinin dalga boylarına göre dizilimi

Fotolüminesans bir moleküler yapı için, elektromanyetik radyasyonun absorpsiyonu ve emisyonu arasında gerçekleşen işlemlerdir ve Jablonski diyagramı ile ifade edilir. Uyarılmış halde bulunan fotolüminesant yapıda oluşabilecek çeşitli süreçleri göstermek için başvurulan bir enerji seviyesi diyagramıdır ve Şekil 2.9'da gösterilmiştir [121].



Şekil 2.9. Fotolüminesans sistemlerin enerji diyagramı: Jablonski diyagramı

Oda sıcaklığındaki termal enerji temel singlet halde bulunan elektronu titreşim enerji seviyesine uyarmak için yeterli değildir. Absorpsiyon ve emisyon çoğunlukla moleküllerin en düşük enerjili titreşim enerji seviyelerinde iken gerçekleşir. Temel singlet hal ile uyarılmış singlet halin titreşim enerji seviyeleri arasındaki enerji farkı termal yolla uyarılmak için oldukça geniştir. Isı enerjisi yetemediği için termal yolla değil değil ışık ile uyarma tercih edilmektedir. Diyagramdaki terimler aşağıdaki açıklanmaktadır [121].

2.6. Floresans

En düşük uyarılmış elektronik haldeki elektronun temel singlet halin titreşim enerji seviyelerine dönerken yaptığı ışımaya verilen isimdir [122].

Süre ölçeği 10^{-5} – 10^{-8} s arasındadır. Genelde fotonları yayılmasında S1 den S0'a olan geçişler floresans olarak adlandırılmaktadır [121].

Stokes ilkesine göre floresans sinyalinin dalga boyu, absorbsiyon sinyalinin dalga boyundan daha fazla olmalıdır. Absorbsiyon sinyalinin maksimumu ile floresansın maksimumu arasındaki fark Stokes Kayması olarak adlandırılmaktadır [121]. Eğer uyarılmış tür sistemler arası geçiş ile T1 senerji seviyesine geçtiyse ve uyarılmış hal ömrü yeterince uzunsa bazen T1'den tekrar S1'e geçiş gözlenebilir. Buradan da temel hale dönerken ışıma yaparsa bu ışımaya gecikmiş floresans denir [121]. Floresans ışımasında, yayılan ışığın frekansı ile

sistemi uyaran ışığın frekansı birbirine eşitse buna Rezonans Floresans denmektedir. Atomlarda ve katı haldeki moleküllerde daha çok gözlenmektedir [120].

Floresans yönteminde seçiciliği attırmak için senkronize floresans, türev alma, Süpersonik Jet Lüminesans ve Shopolski yöntemleri de uygulanmaktadır. Senkronize floresans metodu, çok bileşenli karışımları ayırmak için uygulanabilir. Normal floresans yönteminde tarama sırasında sadece bir dalgaboyu seçicisi tarama yaparken senkronize floresans yönteminde her iki monokromatör de tarama yapmaktadır. Senkronize floresans yöntemi ile birbirine yakınlaşmış ve neredeyse iç içe girmiş pikleri daha dar bantlı şekilde ayırabilmek mümkün hale gelmektedir. Bunun yanısıra, sinyal/gürültü oranının ve dinamik aralığın artmasını sağlayabilir. Rayleigh ve raman saçılmaları da bu sayede yok edilebilir. Sonuç olarak yöntem daha seçici ve duyarlı bir hale gelir.

Türev floresans spektroskopi yöntemi yine seçiciliği arttırmaya yönelik çalışmalardan biridir. Ancak türev alabilmek için spektrumda türlerin maksimum sinyalleri arasında farklar olmalıdır. Yöntem, minör spektral özelliklerin belirlenmesinde yardımcı olur. Bu yöntem ile bazı spektral örtüşmelerin sonucunda oluşabilecek hatalar minimuma indirilmektedir.

Süpersonik jet lüminesans yönteminde, analit molekülü yüksek sıcaklık ve basınçlı olduğu bölgeden birkaç kelvin sıcaklığa soğutulduğu ve daha düşük basınçlı bölgeye aktarılır. Bu olay süpersonik jet genişlemesi olarak adlandırılır. Bu şekilde moleküllerin titreşim ve dönme hareketleri en aza indirilir ve böylece ultraviyole-görünür bölge spektrumlarda keskin bir çizgi şeklinde pik yapısı sağlar. Elektronik geçişlere özgü spektrumlar elde edilir genelde rezonans floresans bu sistemlerde görülmektedir. Bu yöntemin dezavantajı ise doğrusal aralıklarının çok dar olmasıdır.

Shopolski yönteminde ise sıvı He (-250 °C) ortamında çalışılması gerekmektedir. Bu yöntemde de süpersonik jet yönteminde olduğu gibi düşük sıcaklıkta moleküllerin titreşim ve dönme enerjileri kısıtlanacağından sadece elektronik geçişler gözlenecektir. Atomik düzeye yakın çizgiler elde edilir ancak su ve alkolde çalışılamamaktadır. Burada kullanılacak çözeltiler, n-bütanol ve n-propanol gibi organik çözücüler olmalıdır.

2.6.1. Elektron spini

Pauli dışarlama ilkesine göre bir atomda ancak iki elektron bulunabilir ve bu iki elektronun spinlerinin farklı yönlerde olması gerekmektedir (+1/2, -1/2). Bu sayede spinler eşleşmiştir, moleküller manyetik alan göstermemektedir ve diamanyetik olarak adlandırılmaktadırlar. Bunun yanında, eşleşmemiş elektron içeren radikaller manyetik alan tarafından çekilebilirler bu nedenle paramanyetik olarak adlandırılmaktadırlar [123].

2.6.2. Singlet ve triplet uyarılmış haller

Elektron spinleri eşleşmiş bir elektronik hal, singlet hal olarak nitelendirilir ve manyetik alan etkisine bırakıldığında elektronik enerji seviyelerinde herhangi bir değişiklik olmaz. Bir orbitaldeki eşleşmiş elektronlardan bir tanesi üst enerji seviyesine uyarıldığında bir uyarılmış singlet veya triplet halden bahsedilebilir. Uyarılmış singlet hal söz konusu ise, uyarılan elektronun spini hala temel haldeki elektron spini ile eşleşmiş durumdadır. Ancak, uyarılmış triplet halde iki elektronun spinleri aynı yönde, eşleşmemiş durumdadır. Jablonski diyagramı incelenirse, burada dikkat edilmesi gereken, uyarılmış triplet hale karşılık gelen enerji seviyesinin uyarılmış singlet halin enerji seviyesinden daha düşük olmasıdır. Diyagrama göre, uyarılmış türler triplet halde paramanyetik iken, singlet halde diyamanyetiktir. Bu bilgiye dayanarak, singlet-triplet geçişinin, singlet-singlet geçişine göre daha az ihtimalle gerçekleşecek olmasıdır. Yukarıda bahsedilen floresans ve fosforesans ışıma sürelerinin farklı olma sebepleri bunlardır [121, 124].

2.6.3. Titreşimsel durulma

Uyarılma sonucu elektron, uyarılmış singlet hal olan S2'ye veya S2'nin titreşim enerji seviyelerine yerleşir. Uyarılmış türler ve çözücü molekülleri arasındaki etkileşimler sonucu uyarılmış yüksek enerjili elektron, titreşim enerji seviyelerinde ışımasız geçişler yaparak enerjisini harcar. Bu işleme titreşimsel durulma denir [120, 121]. Spektroflorimetrik spektrumlara Jablonski diyagramı bilgisi ışığında bakıldığında, stokes kaymasının sebeplerinden olduğu görülmektedir.

2.6.4. İç dönüşüm ve dış dönüşüm

Uyarılmış singlet haldeki (S2, S1) titreşim enerji seviyeleri örtüştüğünde, iç dönüşüm için uygun şart sağlanmış olur ve elektron daha düşük enerji seviyesine sahip uyarılmış singlet halin titreşim enerji seviyesine geçişi tercih eder. Bu geçiş ışımasızdır, elektronun enerji kaybına neden olur [121].

Uyarılmış haldeki analit moleküllerinin diğer moleküllerle veya çözücü ile çarpışması sonucunda molekülün temel hale foton emisyonu yapmadan dönmesi işlemi ise dış dönüşüm olarak tanımlanmaktadır.

2.6.5. Sistemler arası geçiş

En düşük uyarılmış singlet hal titreşim enerji seviyesi ile uyarılmış triplet hal titreşim enerji seviyeleri arasında elektron spininin ters dönerek yaptığı geçişin adıdır. Bu geçiş ışımasız geçişlerdendir [121].

2.6.6. Ayrışma ve ön ayrışma

Işık ile etkileşen türün elektronu doğrudan iyonlaşma enerjisi seviyesine uyarılabilir ve bu seviyeden iyonlaşma sağlanabilir. Bu olaya ayrışma denir. Ancak elektron uyarıldıktan sonra, enerjisini titreşimsel durulma hareketleriyle kaybederek bir alt enerji seviyesine inebilir. Bu seviye iyonlaşma enerjisine denk gelebilir ve elektron türden kopabilir. Buna ön ayrışma işlemi denir [121].

<u>Floresansı etkileyen faktörler</u>

Moleküler yapı floresans olayını etkileyen en önemli parametrelerden biridir. Alkan yapısındaki ve düz zincirli yapılar floresans özellik göstermemektedir. Floresans özellik gösteren moleküller genellikle yapılarında ortaklanmamış elektron içeren yapıların ve π bağlarının bulunduğu aromatik yapıdaki bileşiklerdir. Bu türlerdeki π-π* ve n-π* geçişlerinin molar absorptivite değerlerinin yüksek olması floresans ihtimalini arttırır [120, 121].

Moleküllerde düzlemsellik, dönmenin engellenmiş olması, konjugasyon ve halka sayısının artması genellikle floresans verimini arttırmaktadır [125].

Sıcaklık artışı ise, moleküllerde floresansın azalmasına sebep olmaktadır. Yüksek sıcaklıkta türlere kinetik enerji sağlanmaktadır ve bunun bir sonucu olarak moleküllerin birbirleri ile çarpışma olasılığı artmaktadır. Uyarılmış moleküller ışımasız bir şekilde temel hale dönmektedir. Yine benzer bir şekilde, viskozitenin azalması çarpışmayı arttırdığından floresansı azaltmaktadır [121].

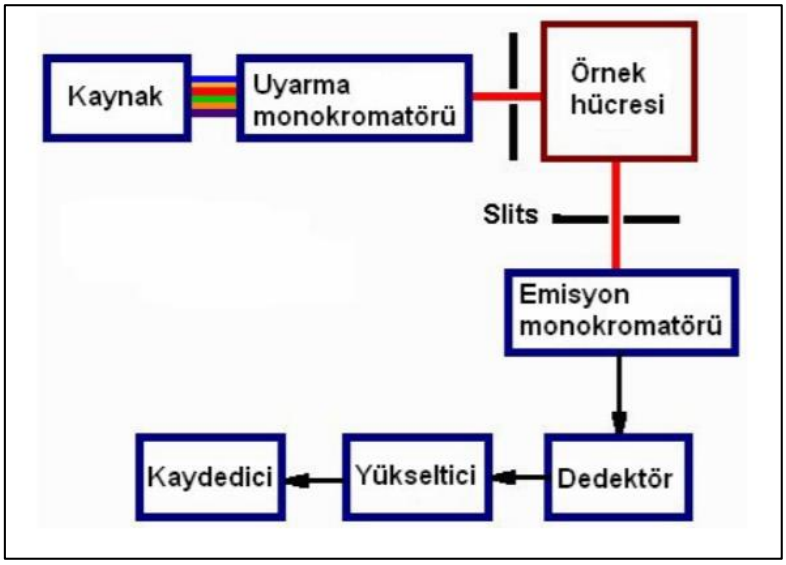
Molekülün bünyesinde veya molekülün çözündüğü çözücüde bulunan bir ağır atom (I veya Br gibi) molekülün floresans verimini azalatıp triplet hal oluşumu verimini arttırmaktadır. Bu nedenle ışıma ihtimali triplet sisteme dolayısı ile fosforesansa doğru kayacaktır [121].

Ortamın pH'ındaki değişimler, hem temel hem de uyarılmış molekülleri etkileyebileceğinden bu parametre de floresansın verimini etkileyen bir faktördür. Çözücüsü ile H bağı yapabilen moleküllerde çözücünün türü de floresans verimini etkiler. Ortamda bulunan çözünmüş oksijen ile molekülün yaydığı ışığı absorplayabilecek başka bir madde, lüminesans verimini önemli ölçüde azaltır. Özellikle fosforesans çalışmalarında çözünmüş oksijenin ortamdan uzaklaştırılması gerekmektedir [120].

2.7. Spektroflorimetre ve Cihaz Şeması

Floresans veya fosforesans ölçümlerinde kullanılan cihaz olan Şekil 2.10'da gösterimi yapılan spektroflorimetrede ışık kaynağı olarak UV ve görünür bölgede ışık yayabilen bir kaynak tercih edilmektedir. Bu amaçla her iki bölgede de sürekli ışıma yapan Ksenon lambalar tercih edilir. Kaynaktan gelen ışık bir uyarma monokromatöründen geçtikten sonra örneğe gönderilir. Örnekten kaynaklanan lüminesans genelde uyaran ışığa 90°' lik bir açıdan toplanarak dedektöre ulaşır. Böylece numuneyi uyaran ışığın, yani ışık kaynağından gelen ışığın dedektöre ulaşması önlenmiş olur [120]. Lüminesans spektrumun elde edilebilmesi için ikinci bir monokromatör olan emisyon monokromatörünün örnek ile dedektör arasına yerleştirilmesi gerekmektedir. Daha basit cihazlarda monokromatörler yerine filtreler kullanılmaktadır. Filtreli cihazlara florimetre veya fosforimetre, monokromatörlü cihazlara ise spekftroflorimetre denmektedir. Numune kabı olarak dört tarafı da geçirgen kuvartz küvetler ve dedektör olarak foton çoğaltıcı tüpler kullanılmaktadır. Spektroflorimetrede

kullanılan dedektörün geniş dalga boyu aralıklarında ve hızlı cevap vermesi, ışık yokken sinyalin sıfır olması ve sinyal/gürültü oranının yüksek olması gerekmektedir [120, 121].

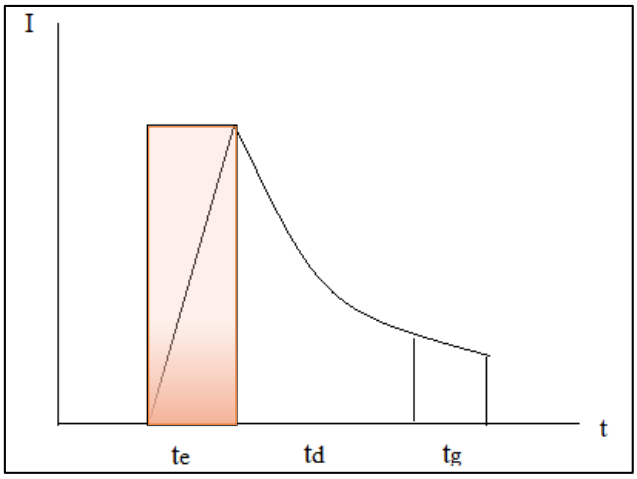


Şekil 2.10. Bir spektroflorimetrenin bileşenleri ve dizilimi

2.8. Fosforesans

Fosforimetri, nükleik asitler, amino asitler; pirin ve pirimidin, enzimler, petrol hidrokarbonları ve pestisitler gibi maddeleri de kapsayan çok çeşitli organik ve biyokimyasal türlerin tayini için kullanılmıştır. Bununla beraber, bu yöntem, florometri kadar yaygın kullanım alanı bulamamıştır. Bunun sebebi, düşük sıcaklıklara ihtiyaç duyulması ve fosforesans ölçmelerindeki daha zayıf kesinlik olabilir. Diğer taraftan, fosforesans işlemlerinin potansiyel olarak daha yüksek seçiciliği cezbedicidir [125].

Süre ölçeği 10^{-6} - 1 sn arasındadır. Fosforesans ölçümleri floresans ölçümlerinden farklı olarak belli bir maruziyet zamanı sonrası gerçekleştirilmektedir. Şekil 2.11'de fosforesans ölçümü için kullanılan diyagram gösterilmiştir. Maruziyet zamanı (te) analitle ışık kaynağından gönderilen ışığın temas süresi olarak tanımlanabilir. Işıkla uyarılan molekülde hem floresans hem fosforesans kaynaklı ışıma gerçekleşebilir. Bundan dolayı hemen ölçüm alınmaz. Belli bir gecikme süresi (td) sonrasında emisyon ölçümü yapılır. Grafikte tg ile gösterilen ölçüm süresi boyunca dedektör emisyon sinyalini takip eder.



Şekil 2.11. Fosforesansın, ışıma başlayıp dedektöre ulaşmasına kadar zamana bağlı diyagramı (te= maruziyet zamanı, td= gecikme zamanı, tg= ölçüm zamanı)

Fosforesans, düşük sıcaklıkta fosforesans ve oda sıcaklığında fosforesans olmak üzere iki alt ana başlıkta incelenmektedir.

Düşük sıcaklıkta fosforesans

İlk geliştirilen yöntem düşük sıcaklıkta fosforesans yöntemi olarak bilinmektedir. Oda sıcaklığında fosforesans veren moleküllerin sayısının az olması nedeni ile nicel analizde kullanılması pek yaygın değildir [120]. Fosforesans ölçümleri genelde Dewar kabında yapılır. Dewar kabının uyaran ve yayılan ışığı geçiren pencereleri olması gerekmektedir. Organik çözelti içerisinde hazırlanmış numune homojen şekilde donabilmesi için iç çapı 1-3 mm olan hücreler içine konur [120]. Kullanılan hücrenin çapı daha geniş olursa homojen donma gerçekleşmezken daha dar olursa da sinyal/gürültü oranı düşmektedir. Yöntemi kısıtlayan noktalardan biri çalışılacak numunenin organik çözücüde çözünmesi gerekliliğidir. Organik çözelti olarak numune polar ise etanol nonpolar ise etanol-izopentan-dietileter (EPA) karışımı kullanılır. Numune organik çözücüde tam olarak çözünmeli ve süspansiyon halinde olmamalıdır. Bunun yanında, numune 77 °K'de camsı bir yapıda olmalıdır [120].

Oda sıcaklığında fosforesans

Oda sıcaklığında fosforesans yöntemi katı ortam ve çözelti ortamı olmak üzere iki kısımda incelenebilir. Katı yüzey fosforesans yönteminde numune katı bir yüzeye adsorbe edilmelidir. Bunu için alümina, selülozik destek yüzeyler, filtre kâğıtları ve silika kulanılabilir, ayrıca pelet

basılıp elde edilen pelet ölçüm sistemine yerleştirilebilir. Moleküler baskılama ile hazırlanan türler de yüzeye adsorbe edilebilir. Bu sistemin avantajı, termal olarak kararlılığı, şişmeye karşı dayanıklılığı ve moleküle özgü yani daha seçici olarak hazırlanabilir olmasıdır. Ancak yöntemin dezavantajları arasında her seferinde aynı yüzeyin hazırlanamaması, pelet tekniğinde kırılma olması ve kullanılan materyalden kaynaklı zemin sinyallerinin gözlenmesi olabilmektedir [120].

Çözelti ortamında fosforesansa yöntemleri ise kimyasal koruyuculu ve koruyucusuz olmak üzere iki ana başlık altında inceleyebilliriz.

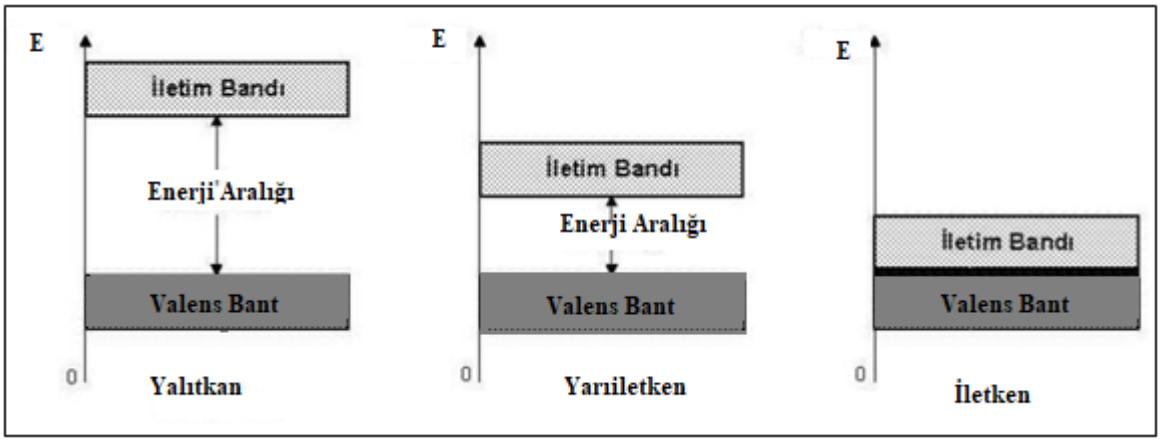
Koruyucu ajan olarak misel ve siklodekstrin kullanılmaktadır. Miseller yüzey aktif türlerdir. Hidrofobik ve hidrofilik uçları sayesinde içinde bulunduğu çözeltinin polaritesine bağlı olarak misel ve ters misel şeklinde bulunabilirler. Analizi yapılacak molekül misel içerisindeki boşluklara hapsolduğundan moleküllerin birbirleri ve çözücü molekülleri ile çarpışması böylelikle fosforesans sinyalinin düşmesi engellenir. Ancak misel ajanı olarak Sodyum dodesil sülfat veya sodyum lauril sülfat kullanıldığında analiz ortamında sodyum miktarı yüksek olursa numunenin yerine Na^+ bağlanması söz konusu olabilmektedir. Bu durum yüksek oranda tuz içeren kan ve idrar gibi matrikslerde dezavantaj olmaktadır. Siklodekstrin 6 (α), 7 (β) ve 8 (γ) glikoz molekülünün bağlanması ile oluşmuş siklik şeker yapısıdır. Siklodektrin yapısında taç eterlerde olduğu gibi belli bir kavite bulunmaktadır ve moleküller bu bölgelere hapsolur. Bu kavite göreceli olrak hidrofobik yapıdadır ve etkileşim Van Der Waals kuvvetleri veya hidrojen bağları ile gerçekleşmektedir. Molekül içeride hapsedilir ve daha sağlam bir yapı oluşur. Çarpışmalar olabildiğince azalır ve fosforesans şiddeti arttırılabilir [121].

Kimyasal koruyucusuz sistemlerde ortamda herhangi bir koruyucu reaktif bulunmaz. Bu teknikte ortama sadece ağır iyon veya sodyum sülfit eklenir. Ağır iyon kaynağı olarak $TlNO_3$, KI, NaI, KBr, TlHCOOH, $AgNO_3$ ve $Pb(NO_3)_2$ kullanılabilir. Bu reaktifler içinde en yaygın olarak tercih edilen $TlNO_3$ 25-250 mM, KI veya KBr 1-2 M derişiminde kullanılmaktadır. Bunun yanısıra ortamdaki çözünmüş oksijeni uzaklaştırmak için Na_2S 1-15 mM derişim aralığında kullanılmaktadır. Yüksek derişimlerdeki Na_2S sülfit kaynaklı baskılama nedeniyle sinyali bastırmakta iken düşük derişimde stabilzasyon süresinin uzamasına neden olmaktadır. Ağır iyon etkili fosforesans yönteminde siklodekstrin ve misel oluşumlu sistemlerinin aksine çökelek ve köpük oluşumu gözlenmez, yalancı faz oluşturmaz ve yüksek oranda tuz içeren ortamlarda da uygulanabilir [121].

2.9. Kuantum Noktalar

2.9.1. KN hakkında genel bilgiler

Kuantum noktaların daha iyi anlaşılabilmesi için gerekli terimler aşağıda açıklanmıştır. Bu terimler Şekil 2.12'deki gösterimin ışığında aşağıda irdelenecektir [126].



Şekil 2.12. İletken, yalıtkan ve yarı iletkene ait bant enerji seviyeleri

Değerlik (Valens) bandı

Materyaller bu bantlar arasında bulunan enerji boşluğuyla sınıflandırılır. İletken maddelerde değerlik bandı ve iletkenlik bandı birbirine bitişik durumda iken, yalıtkanlarda iki bant arasında oldukça büyük bir enerji farkı vardır. Yarı iletkenlerde bu bant aralığı yalıtkanlara göre daha azdır [126]. Elektronların değerlik bandından iletkenlik bandına geçmesi termal, elektriksel veya ışık gibi bir dış etken sayesinde gerçekleşir [127].

İletim (İletkenlik) bandı

Değerlik bandının üstünde bulunan bir elektrik alan uygulandığı zaman elektronları uyarıp hızlandırabilen yarı iletken ve yalıtkanlar için bir elektron enerji düzeyidir [126]. İletkenlerde valens ve iletkenlik bandı üstüste çakışmaktadır, yasak bant aralığı yoktur. Yasak bant olarak adlandırılmasının sebebi de elektronların bu enerji seviyesine çıkacak enerjiye sahip olmadıklarındandır [127].

Boşluklar

KN'ler yarı-iletkenler türlerdir. Valens bantta bulunan elektronlar dışarıdan bir uyarıcı sayesinde iletkenlik bandına geçebilir [126]. Elektronların valens banttan iletim bandına geçtiğinde geride bıraktığı alan boşluk olarak ifade edilmektedir [128]. İletim bandındaki bu elektronlar bir süre sonra valens banda geri dönerler. KN'lerde uyarılmış atom ile boşluk (değerlilik bandındaki yeri) arasındaki uzaklığa eksiton Bohr yarıçapı (Exciton Bohr Radius) ve elektron boşluk çiftine eksiton (Exciton) denir ve bu mesafe her KN için farklıdır [127].

Kuantum noktacık

Kuantum noktalara yapay atom da denmektedir. Bunun nedeni, iletim ve valens bantları arasındaki bant boşluğunun değiştirilebilir olmasındandır. Yani KN'lerde boyut isteğe göre değiştirilebilen bir parametredir. Bu özelliğin adı literatürde kuantum sınırlaması (quantum confinement) olarak geçmektedir [127]. Kuantum sınırlama etkisi sebebi ile KN'lerin boyutlarının değişimi ile ışıma rengi de değişmektedir. Bu özellikler KN'lere çok avantajlı optik ve elektriksel özellikler katmaktadır. En küçük KN boyutuna sahip ışıma rengi mavi iken, boyut büyüdükçe renk kırmızıya kaymaktadır. Şekil 2.13'te boyutların renge göre dağılımı görülmektedir [129].

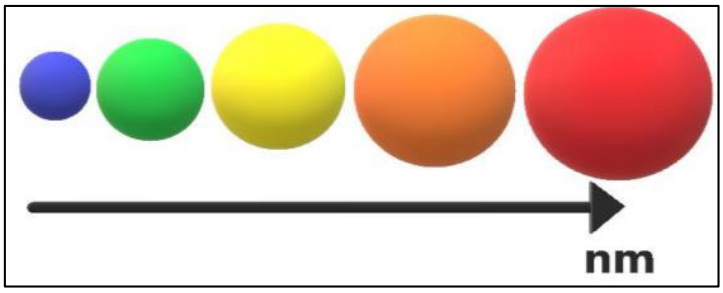
Kuantum noktalar, güneş pilleri, lüminesant biyoetiketler, biyo-sensörler ve biyo-görüntüleme cihazları gibi geniş bir uygulama çeşitliliği vaat etmektedir [128-131]. Ayrıca yenilenebilir güneş pilleri, spektroskopik ve elektrolüminesans cihazlar için de iyi bir tamamlayıcıdırlar [132].

Katkılama, istenilen özellikte ve fonksiyonda materyal sağlayabilmek için uygun elementlerin atomlarının ve iyonlarının katkılanacak türlerin içine modifiye edilmesini de kapsayan, malzeme biliminde oldukça geniş bir kullanım alanına sahip teknolojik bir uygulamadır [133]. Katkı malzemeleri, KN'lerin optik davranışlarını güçlü bir şekilde etkiler. Bu yüzden, katkılı KN'ler, lüminesant malzemelerin yeni bir sınıfı olarak kabul edilir [134]. Katkılanmamış KN'ler, geleneksel organik emisyon yapabilen malzemeler, organik boyalar ve inorganik fosfor materyallerine kıyasla oldukça ayırt edici özellikte avantajlar sunar. Bunlara örnek olarak ayarlanabilir renklerle dar ve simetrik emisyon, geniş ve güçlü emilim, düşük saçılım, yüksek bir kararlılık gösterilebilir [135]. Ancak molekül içi temel haldeki dimer kompleksler veya

bitişik KN'ler arasındaki enerji transferinden dolayı meydana gelen kendiliğinden sönümlenme durumu, katkılanmamış KN'lerin biyoanalizdeki uygulamalarına engel olabilir. Katkılanmış KN'ler ise yukarıdaki avantajların çoğunu barındırmanın yanı sıra, önemli miktardaki Stokes kayması sayesinde bu kendiliğinden sönümlenme problemini de önlerler. Katkılanmış KN'lerdeki büyük Stokes kayması, katkılanmamış KN'lere göre enerji seviyelerindeki daha küçük bir bant boşluğu sayesindedir [126].

Bugüne kadar Mn^{2+}, Cu^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Ag^{+}, Pb^{2+}, Cr^{3+}, Eu^{3+}, Tb^{3+}, Sm^{3+} ve Er^{3+} gibi pek çok geçiş metali ve lantan dizisi iyonu II–VI kuantum noktalara katıldı ve katkılanmış KN'leri pek çok uygulama için cezbedici hale getirdi [136-142]. Bu katkılanmış KN'ler -özellikle Mn-katkılı ve Cu-katkılı olanlar- sistematik bir şekilde çalışıldı [143] Son zamanlarda, Cu^{2+}–Co^{2+}, Cu^{2+}–Mn^{2+}, Cu^{2+}–Pb^{2+}, Cu^{2+}- lantan dizisi iyonları (Ce^{3+}, Er^{3+}, Tb^{3+}, Nd^{3+}) ve Mn^{2+}–Eu^{3+} gibi ikili katkılanmış (dual-doped) kuantum noktalara ise çok daha fazla ilgi gösterildi. Yukarıdaki safsızlıklar için katkılanan konak kuantum noktalar çoğunlukla ZnS (Eg ~3,6 eV), ZnSe (Eg ~2,7 eV), ZnO (Eg ~3,2 eV), CdS (Eg~2,42 eV) ve CdSe (Eg ~1,73 eV) gibi geniş bant boşluk enerjilerine sahip yarı iletkenlerdir. Bu konakların arasında en çok ZnS ile çalışılmıştır [136-141].

Katkılanmış KN'ler (özellikle katkılanmış ZnS KN), CdSe ve CdTe kuantum noktalara kıyasla iki belirgin avantaja sahiptir: bunlar, katkı malzemesi için daha uzun emisyon ömürlü olması ve daha düşük toksisite potansiyeli göstermesidir. Geçiş metali ve lantan dizisi iyonu katkılı kuantum noktaların, katkı malzemesi emisyonu ömrü genel olarak katkılanacak KN'nin bant boşluğu, hata kaynaklı bir emisyondan veya biyolojik arka plan floresansından daha uzun ömürlüdür [126-128]. Bu da biyo-görüntüleme ve biyo-algılamada arka plan floresansını yok etmede büyük olanak sağlar. Lüminesant katkı malzemeleri, şu an kullanılandan daha az zararlı elementlerden oluşan nanokristallerde, görünür veya kızılötesi emisyona sebep olduğundan, biyo-görüntüleme uygulamalarındaki toksisite problemlerini azaltabilir [127]. Yine de CdS ve CdSe KN'ler de katkılı kuantum noktaların konağı olarak kullanılmasına rağmen, katkılı kuantum noktaların esas konağı ZnS ve ZnO KN'lerdir ve toksik metal içermemelerinden dolayı biyo-analiz ve biyo-görüntülemede umut verici uygulamalar vaat etmektedirler [133, 144-147].



Şekil 2.13. Kuantum noktacıkların boyutlarına göre renk değişimleri

2.9.2. Sulu ve organik ortam sentez yöntemleri

Sulu ortam sentezleri

Katkılı kuantum noktaların sulu ortamdaki sentezleri, sulu çözeltide meydana gelen basit bir çökelme reaksiyonuna dayanır. Tipik olarak sentez, katkı malzemesi iyon ve katyon reaktiflerinin (Zn^{2+} ya da Cd^{2+}, asetat, sülfat, nitrat veya perklorat bulunan ortamda) uygun yüzey ligandı varlığında S^{2-} ile (genellikle Na_2S) beraber çökmesiyle gerçekleştirilir. Yüzey ligandları sonraki modifikasyonlar için katkılı KN'lerde büyük öneme sahiptir. Tiyoller, polimerler, fosfatlar ve hatta proteinler bile ligand olarak kullanılmıştır [148-154]. Bu ligandlar bu katkılı KN'lerin sonraki uygulamaları için çok büyük bir potansiyel sağlamaktadır. Ham malzemeler, reaksiyon sıcaklığı ve çözelti pH'ı, katkılı KN'lerin parçacık boyutu, dağılımı ve emisyon performansı gibi özellikleri önemli derecede etkilemektedir. Sulu yöntemlerde, sentez sıcaklığı (<100 °C) yüzey kusurlarını bertaraf etmede pek etkili değildir. Bu yüzden, sulu sentezlenmiş katkılı KN'ler olarak düşük lüminesans verimine sahip olabilirler [126].

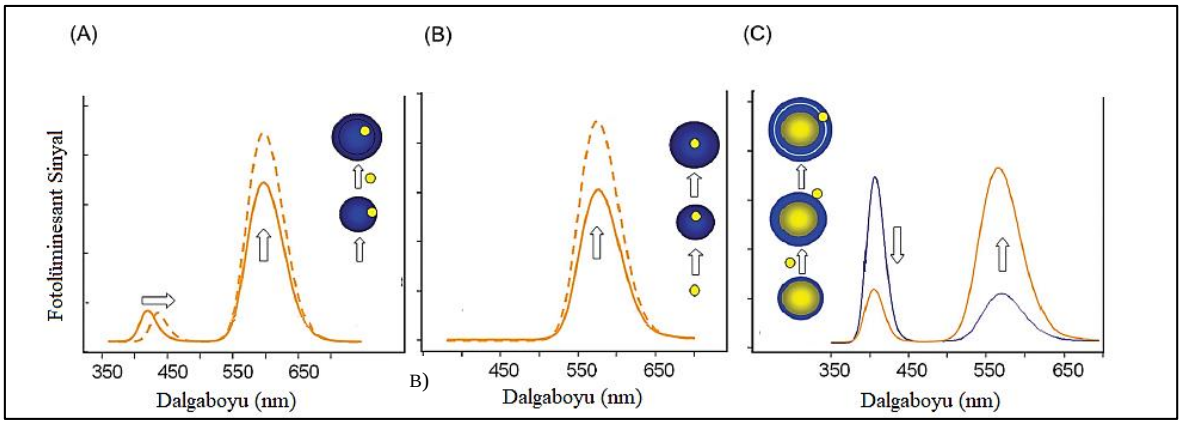
Doğrudan sulu ortam sentez yöntemine ek olarak, katkılı KN'lerin hazırlanması için bir de ters misel yöntemi sunulmuştur. Tipik bir Mn-katkılı CdS KN sentezi sürecinde, bütün reaktifler suda çözünür ve sonrasında misel çözelti oluşturmak üzere misellerle karıştırılır. Cd^{2+} ve Mn^{2+} içeren miseller, sonrasında S^{2-} içeren misellerle karıştırılıp yaklaşık 15 dakika içerisinde Mn-katkılı CdS kuantum noktalar oluşturur. Bu aşamada, elde edilen Mn-katkılı CdS kuantum noktalar, yüzeydeki yönlenimi değişebilen bağlar (dangling bounds) yüzünden düşük lüminesans verimine sahip olurlar (genellikle %5'ten daha az) [155]. ZnS kabuğunun yüzeyinin kaplanması (yine ters misel yöntemle) lüminesans verimini oldukça arttırır [156, 157]. Suda çözünebilen Mn-katkılı CdS veya ZnS kuantum noktalar silika kaplama

metoduyla elde edilebilir [154]. Tetraetil ortosilikatın (TEOS), damla damla ilâve edilen NH_4OH varlığındaki hidrolizini takiben, hidroksil gruplarının (-OH) içinde yoğunlaşmasıyla silika kabuk oluşur [126, 127]. Kuantum noktaları biyokonjügasyona uygun hale getirmek için, TEOS ile 3-(aminopropil)-trietoksisilan (APTES) arasında ikili yoğunlaşma ile amin modifikayonları yapılması gereklidir [127].

Organik ortam sentezleri

KN'lere katkılama amaçlı iyonları modifiye edebilmek için için üç strateji vardır; KN çekirdeklenmesinden önce ve KN sırasında. Birinci strateji Şekil 2.14A'da belirtilmiştir. Genellikle tipik bir sulu sentezle aynıdır, yani hem KN'nin hem de katkılanacak türün bir reaksiyon sistemine eşzamanlı olarak sokulması ile gerçekleşir [158-162]. Ne yazık ki, sonuçta elde edilen katkılı KN'lerin yanında katkılanamamış KN'ler de ortamda bulunur [163, 164]. Ayrıca, katkılama verimliliği büyük ölçüde Mn^{2+} kaynağının saflığına ve partikül boyutuna bağlıdır [165, 166].

İkinci ve üçüncü sentez yöntemleri ise, çekirdeklenme-katkılama ve büyüme-katkılama, katkılama işleminin KN çekirdeklenmesinden ve/veya büyümesinden ayrılmasına dayanır ve Şekil 2.14B, Şekil 2.14C'de gösterilmiştir [160-162, 167]. Çekirdek-katkılama işlemi, çekirdekleşme boyunca KN'nin ve katkılanacak türün karıştırılmasıyla gerçekleştirilmektedir. Çekirdekleşmeden sonra, reaksiyon koşulları, katkı maddesinin aktivitesini azaltmak için uygun olacak olacak şekilde ayarlanır ve KN'nin büyümesi asıl işlem haline gelir. Bu işlem ile de katkı materyali, Şekil 2.14B'deki gibi KN'nin neredeyse tam ortasında kalacak şekilde modifiye edilmiş olur. Üçüncü yöntem ise Şekil 2.14C'de gösterilmiştir. Büyüme –katkılama için, uygun şartlar altında öncelikle KN sentezlenir. Sıcaklık düşürülür ve devamında katkılanacak tür, bir KN büyütme işlemi meydana gelmeden modifiye edilir. Katkılanacak türün büyümesinden sonra KN'nin yeni yüzey tabakası, yüzeyi katkılanmış materyali kaplar. Bu sayede üçüncü sentez gerçekleşmiş olur [168-171].



Şekil 2.14. KN'lerin sentez yöntemleri [127]

Yukarıda sözü edilen organik sentez yaklaşımları için, Zn ve Mn kaynaklarının hazırlanması için hava ile temas ettiğinde bozunmayan kararlı kimyasalların kullanılması gerekmektedir. Bununla birlikte, Se kaynağının ilâvesi hala toksik, pahalı ve piroforik çözücüler gerektirir [160, 161].

Yeşil kimya ve endüstriyel uygulamalar açısından, piroforik ve organofosfat reaktiflerinin kullanımını oldukça zararlıdır [172]. Bu nedenlerden dolayı, Se'nin oda sıcaklığında çözünmesine yardımcı olmak için selenoüre veya $NaBH_4$ kullanılır [173, 174]. Se tozunun bazik koşullar altında çözünürlüğü ve reaktivitesini düşünecek olursak, 220 C'de kullanılmak üzere oleylamin ve oktadesen, organofosfata iyi birer alternatiflerdir.

Suda çözünen katkılı KN'ler, biyosensör ve biyogörüntüleme uygulamaları için oldukça gereklidir. Katkılı KN'lerin suda çözünür hale getirilmesi için, merkaptopropiyonik asit (MPA) gibi küçük moleküller ile modifikasyon önerilir [175-177]. Katkılı KN'lerin MPA ile muamelesi için sentezlenmiş katkılı KN'ler, standart bir çöktürme-çözünme prosedürü kullanılarak saflaştırılır. Mümkün olan en düşük hacimde kloroform içerisinde çözündürülür ve MPA ile modifiye edilir [175]. Ardından 20 dakika boyunca sonike edilir, MPA kaplı katkılı KN süspansiyonu, santrifüjleme ve dekantasyon yoluyla toplanır. MPA'nın fazlası kloroform ile çöktürülür ve yıkanır. Katkılı KN'leri sulu çözelti haline getirmek için ortama $NaHC0_3$ çözeltisi eklenir [127].

Yarı iletken türlerin oluşumunda sentez basamağı çok önemlidir. Çözücü seçimi yalnızca kristal yapının oluşumunu kontrol etmekle kalmaz, polaritesini, suda ya da organik ortamdaki çözünürlüğü, işlevselliğini ve deneysel uygulamaları üzerinde de büyük rolü vardır. Yukarıda

bahsedildiği gibi KN'ler ve katkılı KN'ler sulu ve organik ortamda sentezlenebilmektedir. Sulu ortamda yapılan sentezler daha az toksik, biyolojik uygulamar için kullanışlı ve daha az maliyetli olduğundan genellikle sulu ortam sentezleri tercih edilmektedir [127].

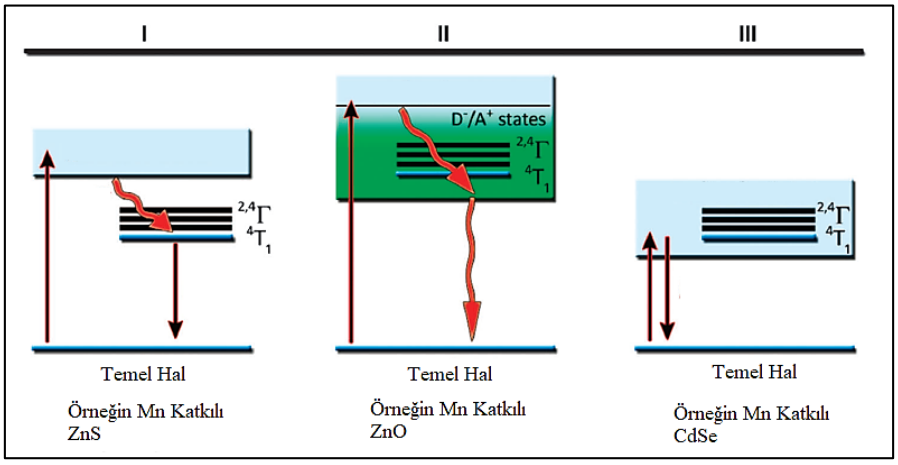
2.10. Katkılı KN'lerin Lüminesans Özellikleri

Mn katkılı KN'lerin hazırlanması için bir takım metodolojilerin ortaya çıkması, bu malzeme sınıfının özellikleri üzerinde yeni ilgi uyandırmıştır. Literatürde yer alan derleme makaleleri Mn katkılı KN'lerin lüminesans özelliklerini özetlemiştir [127]. Çizelge 2.4'te de katkılanan KN'lerin optik özellikleri karşılaştırılmalı olarak sunulmuştur. Ligand alan teorisi ile açıklandığı gibi, Mn^{2+}'nin temel haldeki enerji seviye düzeyi 6A1 ve ilk uyarılmış hali 4T1 ile gösterilmiştir [178]. Temel halden (6A1'den) uyarılmış duruma geçiş 4T1 yasaklı bir geçiştir. Bu geçişin, tipik II – VI yarı iletken KN'lere göre absorpsiyon katsayısı (ε_{Mn2+}) 4-5 kat daha düşüktür [178-184].

Çizelge 2.4. Katkılanmış KN'lerin optik özellikleri

Katkılanan Tür	Konakçı KN	Katkılanmış KN Emisyon aralığı	Görünür Bölge Emisyonu	Fotokararlılık	Bant Genişliği	Referans
Mn^{+2}	ZnS, ZnSe, CdS, CdSe, CuInS2, AgInS2	560-620 nm arasında değişebilir, ancak çoğunlukla 590 nm	Bant boşluğu emisyonu ile değiştirilebilir	Çok iyi	Yaklaşık 50 nm	[160, 162, 166]
Cu^{+}, Cu^{+2}	ZnS, ZnSe, CdS, InP, ZnCdS, ZnInSe	Görünür bölge ile yakın IR arasında değişebilir.	Araştırmalar devam ediyor	Çok iyi değil	70-90 nm	[185-188]
Ag^{+}	ZnS, CdS, CdSe	KN'ye bağlı olarak 490-630 nm aralığında	Araştırmalar devam ediyor	Belirtilmemiş	100 nm	[189, 190]
Ni^{+2}	ZnS, CdS, ZnO, ZnSe, CdZnS	Görünür bölge ile yakın IR arasında değişebilir	Araştırmalar devam ediyor	Belirtilmemiş	>100 nm	[191, 192]
Pb^{+2}	ZnS	650 nm	Araştırmalar devam ediyor	Belirtilmemiş	Belirtilmemiş	[193, 194]

Konak kuantum noktaların katkılanması, 4T1→6A1 geçişinin yüksek verimde gerçekleşmesine izin vererek, 4T1→6A1'in geniş bant boşluk enerjisinin ve çoğu II – VI yarıiletken türler (ZnS, ZnSe ve CdS) tarafından sağlanan düşük foton enerjisinin birleşmesine sebep olur. Mn^{2+} katkılama işlemi sonrasında, Mn^{2+} iyonunun d-elektron seviyesi ile yarı iletken KN'lerin s-p elektronik seviyeleri ile güçlü bir şekilde etkileşir ve lüminesan merkezler olarak hareket eder. Mn^{+2} ile katkılı kolloidal KN'ler, elektronik yapılarına göre üç genel gruba ayrılabilir ve bu üç durum Şekil 2.15'te gösterilmiştir [178, 195, 196].



Şekil 2.15. Mn katkılı KN'lerde gözlenen fotolüminesansının, çeşitli enerji seviyelerdeki gerçekleşme mekanizması [127]

İlk grup esas olarak ZnS, ZnSe ve CdS'yi ve son zamanlarda $CuInS_2$ ve $AgInS_2$ içerir, burada Mn^{2+} enerjisi katkılandığı yarı iletkenin optik bant enerji aralığı içinde bulunur [197]. İkinci grup, Mn^{2+} katkılı ZnO KN'ler gibi geniş bant boşluğuna sahip yarı iletkenlerde nadir bulunan bir durumdur. Burada boşluk içindeki donor tipi veya alıcı tipi fotoiyonizasyon durumları nanokristal emisyonu büyük ölçüde veya tamamen sönümlenmeye yol açan elektronik durumları anlatmaktadır (Şekil 2.15 resim II). Üçüncü grup, katkılanacak yarı iletken enerji boşluğu içinde herhangi bir safsızlık durumu olmadığında tanımlanabilecek niteliksel olarak farklı bir senaryodur (Şekil 2.15 resim III) [127].

Birinci Mn katkılı KN grubu, yarı iletken türün uyarılması üzerine Mn^{2+}'ye hızlı enerji transferi ve yüksek kuantum verimleri sayesinde, foto- veya elektro-lüminesan uygulamalar için son zamanlarda ilgi çekici olmaya başlamıştır. Örneğin, Mn katkılı ZnS KN'ler için 420 ve 590 nm merkezli iki emisyon bandı gözlenenebilir. 590 nm civarındaki pik, Mn^{2+} iyonlarının 4T1 → 6A1 geçişine atfedilir ve göreceli olarak daha seyrek gözlenen 420 nm

civarındaki emisyon kükürtün orbitallerindeki bir elektron çiftinin alış-verişine dayanmaktadır [126, 129]. KN'den, Mn^{2+}'ye doğru gerçekleşen hızlı enerji transferi, kükürtteki elektronun geçişinin sönümlenmesine sebep olur ve 590 nm merkezli yeni bir lüminesans özelliğine yol açar. Mn katkılı ZnS ve CdS KN'lerin çoğu sulu yollarla sentezlendiğinden, bu KN'lerin kristal yapısının kararlılığı tipik olarak yüksek sıcaklık ve organik yollarıyla hazırlanan Mn katkılı ZnSe KN'lerden daha düşüktür.

ZnS, ZnSe veya CdS KN'leri için, katkılanacak türe ait olan emisyonun enerjisi, konağın KN'nin bant aralığının enerjisine göre kırmızıya kaydırılır. Bu nedenle, katkılanacak türün emisyonu KN materyali, tarafından absorbe olmaz, böylece kendi kendine absorpsiyon sorununu en aza indirilir.

Mn katkılı KN'ler için diğer iki grup tamamiyle, ilk resimden farklıdır. İkinci grupta, alıcı-verici tipi enerji geçişleri bant boşluğu içinde yer almaktadır. Bu da durulmalar gibi ışımasız geçişlere yol açmaktadır. 4T1 → 6A1 geçişine ait bir emisyon gözlenmez [198].

Üçüncü resimde, katkılanacak türe ait enerji hali, ilgili KN'nin enerji boşluğu arasında bulunmamaktadır. Katkı materyali olan Mn^{+2}'ye düzenli bir enerji transferi aktarım yolu bulunmamaktadır [127]. Çünkü katkılanacak türün en düşük uyarılmış hali, Mn^{+2}'ye ait tüm d-d uyarılmış hallerinin altında kalmaktadır. Bununla beraber, kuantum sınırlama etkisi ve CdSe enerji boşluğu Mn^{+2} ligand alan geçişi arasında küçük farklılıklar bulunmaktadır. Bu fark göz önüne alındığında Gamelin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre, KN boyutu 3,3 nm'den daha düşük tutulduğunda emisyonun mümkün olabileceğini göstermişlerdir [195].

2.10.1. Mn-katkılı kuantum noktaların emisyonu

Genellikle, Mn-katkılı kuantum noktaların Mn^{2+} emisyonları 590 nm civarında ve KN'nin (ZnS, CdS ve ZnSe) büyüklüğünden, şeklinden ve doğasından bağımsızdır [162]. Ancak, yakın zamanda yapılan araştırmalar Mn katkılı KN'nin Mn emisyonlarının, dar bir aralıkta ayarlanabilir olduğunu göstermektedir [199-201]. Örneğin, Mn-katkılı KN'lerde, geniş boyut değişimli durumlarda ''kuantum kısıtlamasına benzer etki'' gözlemlenir [127]. Bu durum,~10, ~4,5, ~3,5 ve ~1 nm boyutlarında Mn-katkılı ZnS kuantum noktalarının, sırasıyla 591, 588, 581 ve 570 nm Mn^{2+} emisyonu dalga boyuna sahip olmasına neden olur.

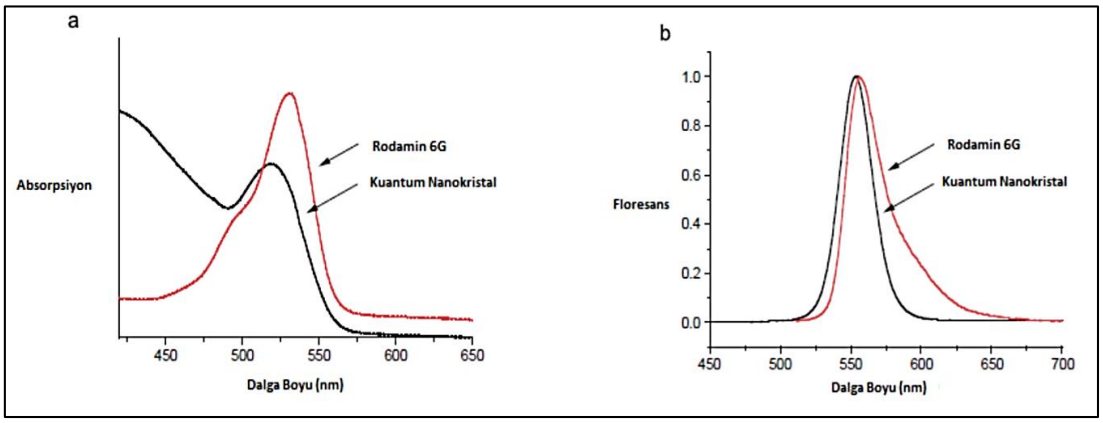
Mn emisyonu dalga boyu, 575 nm den 620 nm ye yükselmesi için KN'nin çapının 1,9 nm'den 2,6 nm'ye çıkarılır [202, 203]. İlk-prensip hesaplamalar ile birlikte yapılan sistematik deneyler sonucunda, kristal alan etkisindeki değişimler sebebiyle, farklı pozisyonlarda (çekirdek ve yüzey) tutulan katkı malzemesi Mn^{2+} farklı emisyon enerjileri göstermiştir [203].

Çizelge 2.5. Boyalar ve KN'lerin özelliklerinin karşılaştırılması

Özellik	Boya	KN	Referans
Absorpsiyon Spektrumu	Dar ve kesikli bantlar halinde (35-100 nm)	Geniş, UV bölgeye doğru artan bir spektrum sayesinde uyarma dalgaboyu seçim şansı vardır.	[204]
Emisyon Spektrumu	Kuyruklanma gözlenebilir	Simetriktir	[205]
Molar Absorpsiyon Katsayısı	$2,5 \times 10^4$ -$2,5 \times 10^5$ M^{-1} cm -1	$10^5 – 10^6$ M^{-1} cm^{-1}	[206]
Boyut	0,5 nm, molekül	1-10 nm, kolloid	[206]
Toksisite	Kullanılan boyaya bağlıdır. Çok düşükten yüksek dereceye kadar geniş bir aralıktadır.	Ağır metal içeren bazı KN'ler toksiktir. (Araştırmalar devam etmektedir.)	[207]
Çözünebilirlik veya homojen dağılabilirlik	Sübstitüent ile kontrol edilebilir.	Yüzey kimyası ile değiştirilebilir (ligand)	[208]
Kimyasal Kararlılık	Çok zayıf	Kimyasal bozulmalara karşı çok dayanıklıdır.	[209]
Fotokararlılık	Genellikle zayıftır.	Görünür bölgede vey akın alan IR bölgesinde yüksek kararlılıktadır.	[209]

Yarı iletken KN'ler, lüminesant boyalarla kıyaslandıklarında daha keskin, simetrik ve dar emisyon bantlarına sahip oldukları gözlenmektedir (Şekil 2.16). Birbirinden ayrı bantları sayesinde KN'lerin farklı renklerde net olarak görülmesi mümkündür. Fakat, Rodamin gibi bir boyar madde, geniş bir emisyon bandına sahip olduğundan farklı dalga boyunda emisyon veren bir tür ile ışımaları aynı renkmiş gibi görülür, girişim yapar. Çizelge 2.5'te KN ve boyaların karşılaştırılması ve Şekil 2.16'daki absorpsiyon ve emisyon spektrumları göz önüne alındığında; organik boyalara göre KN'lerin emisyonlarının daha belirgin olması,

fosforesansın temeline göre gecikmeli ışıma özelliği, organik boyalarla kıyaslandığında daha uzun süre kararlı kalabilmeleri ve üstün foto-kararlılığa sahip olmaları avantajlı özelliklerindendir, bu nedenle tercih sebebidir [210].



Şekil 2.16. Uyarma ve Emisyon spektrumları

2.11. Katkılanmış KN'lerin Lüminesans Sensör Alanındaki Kullanımı

Katkılanmış KN'lerin lüminesans özellikleri katkılanmamışlara göre daha kullanışlı ve avantajlıdır. Katkılama ile elde edilen ekstra enerji seviyesi sayesinde, uyarılmış seviyede katkı malzemesi emisyon ömrü, kuantum noktalarının eksitonik emisyon (ya da yüzey emisyonu) ömürlerine kıyasla daha uzundur. Analitik bakış açısına göre, bu tip uzun-ömürlü emisyonlar ancak sıradan floresans, fosforesans ya da zaman-ayrımlı floresans modunda tespit edilebilir [210, 211]. Fosforesansta veya zamana-ayrımlı floresans modunda, biyolojik otofloresans ve saçılımın bertaraf edilmesi, arka plan gürültüsünden sonra analit sinyalleri toplanarak gerçekleştirilir [211].

Moleküler fosforlar kimyasal sensör uygulamalarında yaygın bir şekilde kullanılırlar [212-214]. Oda-sıcaklığı fosforesansı kullanılarak yapılan çalışmalar, floresans metoduna göre birçok avantaja sahiptir. Oda sıcaklığında fosforesans, biyolojik örneklerde rastlanan floresans emisyonundan ve ışık saçılmalarından, uygun bir gecikme süresi sayesinde, kolayca kaçınılmasını sağlar [126, 127]. Mn-katkılı KN'ler için, Mn^{2+} 4T1 → 6A1 emisyonunun iyice onaylanmış ms-ölçekli ömrü sebebiyle, Mn-katkılı KN'lerin fosforesans sensörü olarak kullanılarak zemin floresansı ve biyolojik matrislerin saçılımlarının yok edilmesi için analitik araştırmalar ilk olarak biyolojik sıvılarda enoksasin tespiti için 2008'de Yan'ın araştıma grubu tarafından yapılmıştır [215]. Floresans modunda oldukça ortada

olmasına rağmen, fosforesans modunda, idrar ve serum zemin sinyalleri bu sayede tamamen yok edilmiştir. Uzun-ömürlü fosforesansın, katkılı kuantum noktalarında kullanılmasının bir diğer önemli avantajı ise tipik değişkenlerin (örneğin çözülmüş oksijen), sıradan organik boyaların emisyonunu büyük ölçüde bozmasına rağmen, katkılanmış kuantum noktalarının fosforesansı için ihmal edilebilir düzeyde olmasıdır [215, 216]. Şu anda, katkı malzemesi emisyonlarının bu dayanıklılığı, sıradan organik boya-bazlı oda sıcaklığında fosforesans analitik yöntemlerine kıyasla, daha basit, kolaylıkla çoğaltılabilir ve sağlam bir oda sıcaklığında fosforesans analitik yöntem biliminin oluşmasını sağlamıştır.

Moleküler baskılma tekniği, KN'leri işlevselleştirmek ve seçiciliklerini arttırmak için etkili bir araçtır. Wang ve diğerleri, Mn-katkılı ZnS kuantum noktalarının fonksiyonelleştirilmesi için bir yüzey moleküler baskılama stratejisi geliştirdi [217]. 3-merkaptopropil trimetoksisilan (MPTS), Mn-katkılı ZnS kuantum noktaları için, tiyol grubunun Zn^{2+} ile olan yakınlığından dolayı, başlık ligandı olarak kullanılarak kullanıldı [218]. Moleküler baskılanmış bir polimer (MIP) katmanı daha sonra MPTS-kaplanmış Mn-katkılı Zns kuantum noktalarının yüzeyine, sol-gel yöntemi ile sabitlendi. Bu yöntem kalıp molekülün (pentaklorofenol), elektrostatik etkileşim yoluyla, MPTS 3-Aminopropiltrietoksisilan (APTES) ve tetraetoksisilan (TEOS), yapısına baskılanmasını içerir. Kalıp molekül yapıdan ekstrakte edildikten sonra, Mn:ZnS KN'lerinin yüzeyinde pentaklorofenole özgü, seçici bir kavite oluşturuldu. Pentaklorofenol ve bu tanıma bölgesi arasındaki etkileşimin sonucu olarak, Mn-katkılı ZnS kuantum noktalarının fosforesans özelliğindeki değişim gözlendi. Mn:ZnS KN'lerinin fosforesans özelliğinin ve yüzeyi baskılanmış polimerlerin avantajlarının bir araya gelmesi, sadece seçiciliği arttırmakla kalmaz, ayrıca fosforesant özellikte olmayan analitlerin, herhangi bir indükleyici ve türevlendirmeye ihtiyaç duymadan, seçici olarak tayinlerinin yapılmasına izin verir. Ayrıca, Mn:ZnS KN'lerinin yüzeylerinde böyle bir yüzey baskılama işlemi, diğer kalıp moleküllere de uygulanabilmektedir [219, 220]. TNT, enoksasin, arjinin, glutatyon, folik asit vb. kalıp moleküller kullanılarak katkılı KN'ler kullanılarak floresans ve fosforesans sensörler geliştirilmiştir. Çalışmalara ait özet bilgiler çizelge 2.6'da özetlenmiştir.

Çizelge 2.6. Katkılanmış KN'lerin floresans ve fosforesans özelliklerinin sensor alanındaki uygulamaları

KN	Modifiye edilen/Üzeri kaplanan kimyasal madde	Analit	Matriks	LOD	Yöntem	Referans
Mn:ZnS	Sistamin	TNT	Sulu Çözelti	1 nM	Floresans (Sönümlenme)	[221]
Mn:ZnS-Fe_3O_4	Merkaptoetanilamin	TNT	Sulu Çözelti	12,5 nM	Fosforesans (Sönümlenme)	[222]
Mn:ZnS	L-Sistein	Enoksasin	Biyolojik Sıvılar	58,6 nM	Fosforesans (Sönümlenme)	[215]
Mn:ZnS	L-Sistein	Aseton	Sulu ortam, İdrar	0,2 mg/L	Fosforesans (Sönümlenme)	[216]
Mn:ZnS	Sodyum tripolifosfat MIP	Askorbik Asit	İdrar, Plazma	9 nM	Fosforesans (Sönümlenme)	[223]
Mn:ZnS	MIP	Diazinon	Çeşme Suyu	< 50 ng/L	Floresans (Sönümlenme)	[224]
Mn:ZnSe:ZnS	Merkaptopropiyonik Asit	5-Florourasil	İnsan Serummu	0,13 µM	Floresans (Sönümlenme)	[211]
Mn:ZnS	Tiyoglikolik Asit	Sülfadiazin Sodyum	Farmasötik Enjeksiyonlar	3.86 µM	Floresans (Sönümlenme)	[225]
Mn:ZnS	L-Sistein	Florourasil	Farmasötik Enjeksiyonlar	0,38 µg/mL	Floresans (Sönümlenme)	[226]
Mn:CdS:ZnS	Dopamin	Glutatyon	Deiyonize Su	-	Floresans (Sinyal artışı)	[227]
Mn:ZnSe	Horseradish Peroksidaz	L-Tirosin	Belirtilmemiş	0,01 µg/mL	Floresans (Sönümlenme)	[228]
Mn:ZnSe	Bienzim	Parokson	Çeşme Suyu, Süt	13,1 pM	Floresans (Sönümlenme)	[229]
Mn:ZnS	ATP	Arjinin	İdrar	0,23 µM	Fosforesans (Sönümlenme)	[230]
Mn:ZnS	Glukoz Oksidaz	Glukoz	İnsan Serumu	3 µM	Fosforesans (Sönümlenme)	[231]
Mn:ZnS	Merkaptopropiyonik Asit	Folik Asit	Su	1,13 µM	Floresans (Sönümlenme)	[232]

2.12. Aminoglikozid Antibiyotikler

Aminoglikozid (AG) antibiyotikler hızlı bakterisit etkileri, klinik etkinlikleri ve yaygın kullanımları ile önemli bir antibiyotik grubudur. Bu özellikleri onların ciddi enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilen antibiyotikler grubuna girmelerini sağlamıştır [233].

Yapı ve kimyasal özellikleri incelendiğinde, AG antibiyotiklerin birbirlerine glikozid bağları ile bağlı iki veya daha fazla amino şekerden oluşmuş bir antibiyotik grubu olduğu görülür. Amino şekerler ortada bir heksoz çekirdek olan aminosiklitole bağlıdırlar [233]. pH 6,00-8,00 arasında oldukça kararlıdırlar, pH 7,40'te ise güçlü bir pozitif yüke sahip olurlar yani katyonik özelliktedirler. Bu güçlü polariteleri nedeniyle, hücrelerdeki anyonik moleküller ile etkileşimleri kolaylaşır, lipopolisakarid -LPS- ile hücre içindeki DNA ve fosfolipidlere bağlanma ilgileri yüksektir [234, 235]. Suda çok iyi çözünürken, organik çözücülerde çözünmezler. Alkali pH'de etkileri artarken asidik pH değerlerinde ise azalmaktadır [233].

Aminoglikozik antibiyotiklerin etki mekanizmaları

AG antibiyotikler elektrostatik etki sebebiyle hücre duvarına hızlı bir şekilde bağlanabilirler. Bu pasif bir fazdır ve enerji gerektirmez. AG'ler, LPS'lere bağlanan Mg^{2+} ve Ca^{2+} iyonlarının yarışmalı olarak yerini alır. Sonuçta, dış membranda bir bozulma meydana gelir, geçici bir giriş bölgesi oluşur ve duvarın normal geçirgenlik fonksiyonu bozulur [236]. İyonik bağlanmanın ardından, AG tutulumu iki enerjiye bağımlı faz (EBF) olarak gelişir. Bakterisit etki, EBF-1 ve 2 arasındaki geçiş esnasında başlar. Birçok bakterinin EBF-2'nin %25'inin tamamlanmasından önce ölümcül hasarlara sahip oldukları gözlenmiştir. Daha yüksek eksternal AG konsantrasyonu, hızlıca EBF-2 tutulumunu tetiklemesi sebebiyle gerekli hücre içi ilaç konsantrasyonuna ulaşmaktadır [237]. Hücre içine giren AG'ler çoğunlukla 50S, göreceli daha az oranda ise 30S ribozomal alt birimlere bağlanmaktadırlar. Buralarda birçok bağlanma yeri bulunmaktadır. Sonuç olarak, mRNA kodunun hatalı okunması ile [a] protein sentez oranı azalır, [b] hatal protein üretimi olur. Buna karşın, AG'lerin sağladığı bakteri ölümü çok faktörlüdür. Fazla bir trans membran elektrik potansiyeli, AG'lerin daha çok antibakteriyel etki yapmalarını sağlamaktadır. Anaerobik durumlarda, düşük eksternal pH'de ve yüksek osmolaritesi olan kültür ortamında üreme transmembran elektrik potansiyelini düşürmektedir. Bu durumların her birinde AG

transportunun ve ilgili olarak antibakteriyel aktivitenin azaldığı belirtilmiştir. Bu nedenle AG'ler anaerobik bakterilere karşı etkisiz kalmaktadır [233].

Farmakolojik ve Farmakokinetik Özellikleri

1. Plazma pik konsantrasyonu düzeyine intramüsküler (İM) verildikten 30 veya 60 dakika, intravenöz (IV) verildikten 30 dakika sonra ulaşmaktadırlar [233].
2. Streptomisin haricinde plazma proteinlerine oldukça az bağlanırlar [233].
3. Büyük ölçüde hücre dışı sıvıya dağılırlar [233].
4. Dağılma hacmi genç erişkinlerde vücut ağırlığının %25-30'u kadarına eşdeğerdir [233].
5. Kan-beyin, kan-beyin omurilik sıvısı engelini geçmekte zorlanırlar [233].
6. Yenidoğanda beyin omurilik sıvısını geçerler [233].
7. Tıkanma olduğu takdirde safra içine giremezler [233].
8. Salgı ve dokuların hücre içlerinde düşük miktarlarda bulunurlar [233].
9. Renal korteks, iç kulak ve perilenfte yüksek yoğunluğa erişirler [233].
10. Plevra, sinovya, periton ve perikard boşluklarına geçebilirler [233].
11. Vücutta metabolize olmazlar ve glomerüler filtrasyonla değişmeden böbreklerden atılırlar. Sonuçta verilen dozun %80- 90'ı 24 saatte idrarla atılmaktadır. İdrarda serumdan 80-100 kat daha fazla olabilirler (kreatinin klirensi 30 ml/dakika üzerinde ise) ve üriner sistem infeksiyonunu tedavi edecebilecek seviyeye ulaşırlar [234-236].
12. Yarı ömürleri 2-4 saattir [233].
13. Yaş, obezite, böbrek fonksiyon bozukluğu gibi parametrelerle ilgili dağılım hacmi, eliminasyon yarı ömürleri değişmektedir [233].
14. ß-laktam antibiyotiklerle aynı sıvıda verilmezler. ß-laktamantibiyotikler, özellikle penisilinler zamana bağlı olarak bakteriyi öldürürler ancak aminoglikozidler konsantrasyona bağlı öldürür [233].
15. Farklı derecelerde proksimal tubuluslardan yeniden absorbe olurlar [233].
16. Böbrek yetmezlik problemlerinde (kreatinin klirensi 40 ml/dakika altında) yarı ömürleri çok uzar. Üremik hastalarda bu süre 40-50 saat kadar olur [234].

<u>Aminoglikozidlere karşı oluşabilen antibiyotik direnç mekanizmaları</u>

AG'lere direnç mekanizmaları üçe ayrılır. İlki enzimatik modifikasyon olarak adlandırılır. Amino grubunun asetiltransferaz enzimi ile asetilasyon, hidroksil grubunun nükleotidil

transferaz enzimi ile adenilasyon veya hidroksil grubunun fosfotransferaz enzimi ile fosforilasyon reaksiyonları ile AG inaktive olur. Bunun sonucunda, ribozomlara bağlanma zayıflar ve azalır. EBF-2 uptake'i başarısız olur ve yüksek oranda direnç oluşur. İkinci olarak ribozomlardaki tek bir mutasyon ile AG'nin ribozoma bağlanma bölgesinin (reseptörün) değişimi ile direnç oluşabilir ki bu nadirdir ve tek bir AG'ye karşı oluşur. Son zamanlarda enfektif endokardit etkenlerinde karşılaşılan streptomisin direncinin bu mekanizmayla oluştuğu bildirilmektedir [233, 234]. Üçüncü mekanizma, AG uptake'inin değişmesidir ve antibiyotikler arasındaki çapraz direncin nedenidir. Direnç düzeyi enzimatik modifikasyondakinden daha azdır [233].

Klinik mikrobiyoloji

Gram-negatif aerobik veya fakültatif anaerobik bakterilere bakterisit etkilidir. Etki spektrumuna giren bakteriler, Enterobactericeae, Pseudomonas spp., metisiline duyarlı Staphylococcus aureus (MSSA), Haemophilus spp., M. tuberculosis, atipik mikobakteriler, Francisella tularensis, Yersinia pestis ve Brucella spp.'dir [233].

Etkisiz oldu¤u mikroorganizmalar ise pnömokoklar ve A grubu ß-hemolitik streptokoklar, Stenotrophomonas maltophilia, Bacterioides fragilis, Clostridium spp. ve diğer anaerop bakteriler, Rickettsia spp. ve Mycoplasma spp.'dir [233]. Antimikrobik sinerji, hücre duvar sentezini bozan antibiyotiklerle kombine edildiğinde sağlanır. Bu antibiyotikler; penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar, karbapenemler ve glikopeptidlerdir. Bu antibiyotiklerle kombinasyonu ayrı ayrı veya tek tek kullanımlarına göre daha yüksek ve güçlü bakterisit etki gösterir. Bakteriostatik antibiyotiklerle kombine edildiğindeyse antagonist etki göstermektedirler (tetrasiklin ve kloramfenikol) [233].

Klinik endikasyonları

Ampirik tedavi için, aerobik Gram negatif bakteri ve Gram pozitif kokların meydana getirmesi olası durumlarda kombine olarak kullanılmaktadırlar. Bunların arasında, sebebi belirsiz ateş, yanık yarası enfeksiyonları, infektif endokardit, intra abdominal enfeksiyonlar, febril nötropeni, osteomiyelit ve septik artrit, diyabetik hastalardaki eksternal otit, ventilatör ile ilişkili pnömoniler, pyelonefrit, pelvik inflamatuar hastalık, enfekte diyabetik ayak sayılabilir [234-237]. Spesifik tedavide ise aerobik veya fakültatif anaerobik Gram-negatif

basil infeksiyonlarında kullanılırlar. Cerrahi profilakside, kalp kapak hastalığı olup da Enterococcus spp. bakteriyemi riski olanlara uygulanacak genitoüriner ve gastrointestinal cerrahide ampisilin veya ampisiline allerji varsa vankomisin ile kombine olarak gentamisin verilebilir [238].

Aminoglikozidlerin tek doz kullanımı

Son 15 yılda AG'lerin hem minimum toksisite ile hem de daha etkili bir şekilde kullanılmaları için çok sayıca incelemeler yapılmıştır. Bu çalışlmalardan en önemlileri daha az enjeksiyon sayısı ile daha yüksek dozla yapılanlar olmuştur. Bu tip araştırmalar tek doz AG kullanımının ana gerekçelerini ortaya çıkarmıştır. Bu gerekçeler incelenecek olursa [234, 238-243]:

1. Renal kortikal uptake doyurulması. Tek dozdaki AG kullanımı sonucunda toksisitenin azaldığı düşünülmektedir. Tek doz AG ile AG'siz serbest bir dönem sağlandığı (uzun interval nedeniyle) ve son derece düşük AG serum düzeyi daha önceden hücreye alınmış olan ilacın çoğunun hücre dışına taşınmasını sağlayarak toksisitenin azalmasına yol açabilir [234].
2. Konsantrasyona bağlı bakterisit aktivite: AG'ler konsantrasyona bağlı öldürme etkisine sahip antibiyotiklerdir. Minimal inhibitör konsantrasyon değerinin üzerinde daha yüksek AG konsantrasyonu daha yüksek bir öldürme veya bakterisit etki oluşturabilir [233].
3. Post antibiyotik etki (PAE): Bu grup antibiyotiklerde ilaç konsantrasyonu MİK değerinin altına düştüğü durumlarda bile bakterisit etkinin devam ettiği gözlenmiştir. Bu etkinin in vivo olarak in vitro testlerden daha zaman alıcı olduğu gösterilmiştir. PAE mikroorganizmaya ve ulaşılan en üst değere göre değişir. PAE'nin daha uzun süre devam etmesini sağlayan faktörler, başlangıç AG konsantrasyon değerinin daha yüksek olması, kültür ortamında AG'in daha uzun süreli olarak tutulması, kültür ortamına daha az bakteri ekilmesidir. İmipenem, AG'lerin PAE'sini artıran bir ilaçtır. ß-laktam antibiyotiklerle kombinasyonu ise bu etkiyi artırmaz [233].
4. AG'lere adaptif direnç: In vitro çalışmalar AG'lerin MİK değerinin üzerinde devamlı kalacak şekilde fraksiyona verilmesiyle oluşan bir dirençtir. Bakteriyel AG uptake'nin "down regulation" a yol açtığı düşünülmektedir [235]. Bu potansiyel direnç problemi AG'siz ortamda üretilen mikroorganizmalarda saatler içinde geri döndüğü saptanmış, ancak bu gözlenen durum henüz in vivo testlerle kanıtlanmamıştır [233]. Günde tek doz

AG tedavisinin motivasyonu, yukarıda tartışılan bir takım in vitro kanıtlara, hayvan çalışmalarına, sınırlı insan verilerine, bakım ve ilaç açısından maliyetli oluşuna, gerekli serum düzeylerinin miktarına ve insan çalışmalarının, çoğu çoklu doz rejimi ile aynı derecede etkili ve daha az toksik bir tedavi olduğunu göstermesine bağlanmıştır [233].

Bütün bu yaklaşımlar ve çalışmalara karşın, üriner sistem enfeksiyonları, intra abdominal enfeksiyonlar, akciğer enfeksiyonları, pelvik inflamatuar hastalık, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları için günde tek doz AG kullanımı önerilmektedir. AG'ler, çok etkili olmaları, tedavi sırasında direnç gelişiminin çok nadir olması, ucuz olmaları ve kullanım kolaylığı nedeniyle yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerdir [238]. Ancak nefrotoksisite ve ototoksisite gösterebilmeleri ve uzun süre kullanılması durumunda kan konsantrasyonlarının sıkça izlenme zorunluluğu kısıtlı kullanımlarına neden olmuştur. Yine de AG'lerin tek doz kullanımı ile klinik etkinlikleri azalmaksızın yan etkilerinde azalma sağlandığı gösterilmiştir [233].

2.12.1. Tobramisin

Tobramisin (TOB), bir aminosilitole glikozidik bağlarla bağlanan iki veya daha fazla amino-şekerden oluşan geniş spektrumlu bir antibiyotik sınıfı olan aminoglikozitler (AG'ler) olarak iyi bilinir ve yapısı beş amino fonksiyonel grup içerir. Bu amino grupları bu nedenle ağırlıklı olarak iyonize olacak ve pH değeri 3,5 ve altına düştüğünde beş pozitif yük taşıyacaktır. TOB, Acinetobacter, Pseudomonasaeruginosa, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Providencia stu-artii ve bazen Serratia gibi duyarlı aerobik gram negatif bakterilerin enfeksiyonlarının tedavisinde yaygın olarak kullanılır. Bununla birlikte, böbrek problemleri, sinir hasarı veya işitme kaybı gibi olası yan etkileri önlemek için normal dozlarda bile uzun TOB kürlerinden kaçınılmalıdır. Bu nedenle, TOB, terapötik sonuçları iyileştirmek ve herhangi bir zehirlenme riskini azaltmak için terapötik ilaç izleme (TDM) için uygun bir aday haline gelmiştir [244]. Klinik uygulamaya ve Malezya Ulusal Antibiyotik Kılavuzu tarafından belirlenen yönergelere göre, hasta plazma örneklerinde bulunan kabul edilebilir t TOB seviyesi 0,6 ila 2,0 g/mL arasında olmalıdır [244] TOB de dahil olmak üzere bu sınıftaki antibiyotiklerin çoğu bakteri öldürücüdür [245]. Aerobik gram negatif bakterilerin hücre duvarlarına nüfuz etmek için beta-laktamlarla birlikte çalışırlar [235]. Daha sonra aminoglikozitler, translasyonun başlangıç kompleksini bağlamak ve aktifliğini durdurabilmek için aktif olarak bakteri hücre zarı boyunca taşınır [233] TOB, yüzeysel

enfeksiyonlardan deri altındaki enfeksiyonlara kadar çeşitli durumları tedavi etmek için reçete edilmiştir [234, 237].

FDA, duyarlı organizmaların, özellikle gram negatif bakterilerin ve Staphylococcus aureus'un (penisilinaz ve penisilinaz olmayan suşlar) neden olduğu çeşitli enfeksiyonların tedavisi için sistemik tobramisinin uygulanmasını (İntramüsküler veya İntravenöz) onaylamıştır [237]. Gram-negatif bakteriler arasında Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Proteus, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Providencia ve Citrobacter türleri bulunur. TOB ile tedavi edilebilen bu organizmaların neden olduğu enfeksiyonların doğası septisemi, alt solunum yolu enfeksiyonları, menenjit gibi merkezi sinir sistemi enfeksiyonları, karın içi enfeksiyonlar, cilt ve osteomiyelit, karmaşık idrar yolu enfeksiyonları gibi deri altı doku enfeksiyonları arasında değişebilir. İnhale TOB, Pseudomonas aeruginosa ile altı yaşında veya daha büyük bireylerde kistik fibroz tedavisi için FDA onaylıdır [246]. Oftalmik TOB, yetişkinlerde ve çocuklarda duyarlı organizmalar tarafından dış oküler enfeksiyonların tedavisi için FDA onaylıdır.

Hayvanlara öngörülen dozlardan fazla ilaç verilmesi ve özellikle de ilaç uygulanan hayvanların ilacın yasal bekletme süresine uyulmadan kesime sevk edilmesi ve sütlerinin kullanılması, hayvan sağlığında kullanılan ilaçların suistimal boyutu ve aşırı kullanımı veteriner hekimliğinin olduğu kadar insan hekimliğinin de öncelikli konularından birini oluşturmaktadır. Bunun sonucunda, antibiyotiklerin tamamen metabolize olmaması veya vücuttan tamamen atılmamasına bağlı olarak, hayvanların doku ve organları ile bunlardan elde edilen hayvansal gıdalarda antibiyotik kalıntısı bulunabilmektedir. Gıdalardaki kalıntılar insanlarda alerjiden şiddetli zehirlenmelere, üremenin bozulmasına, ince ve kalın bağırsak bakteri florasının değişmesine, teratojenik, karsinojenik etkilere dirençli suşların ortaya çıkmasına sebep olmaktadır.

2.12.2. Tobramisin fiziksel ve kimyasal özellikleri

TOB'un molekül formülü $C_{18}H_{37}N_5O_9$ ve mol kütlesi 467.515 g/mol'dür. Kimyasal adı (2S,3R,4S,5S,6R)-4-amino-2-{[(1S,2S,3R,4S,6R)-4,6-diamino-3-{[(2R,3R,5S,6R) - 3 – amino - 6 - (aminometil) - 5 - hidroksioksan]oks-2-hidroksisiklohekzil] oksi}-6-(hidroksimetil)oksan-3,5-diol_dür. Erime noktası 168-178 ^oC aralığındadır. Beyaz renkte kristalimsi bir tozdur. Metanol ve etanolde kısmen çözünür. Aminoglikozitler son derece

higroskopik malzemelerdir [247]. TOB suda yüksek oranda çözünür ve pH 1-11 arasındaki çözeltide ve 4 ve 37 ° C arasındaki sıcaklıklarda kararlıdır [248].

Endikasyonları

TOB, duyarlı mikroorganizmaların neden olduğu gözün ve komşu dokuların dış kaynaklı enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan topikal bir antibiyotiktir. Klinik çalışmalar TOB'un çocuklarda da kullanılmasının etkili ve güvenli olduğunu göstermiştir [249].

Kontrendikasyonları

Aminoglikozitlere karşı aşırı duyarlılık veya ciddi toksik reaksiyon geçmişi olan hastaların bu sınıftaki ilaçlara karşı bilinen çapraz hassasiyeti nedeniyle başka kullanımı sakıncalıdır [249].

Alerjik reaksiyon meydana gelirse, ilaç kesilmeli ve uygun olan başka bir tedavi uygulanmalıdır [250].

Kullanım şekli

Hafif veya orta dereceli infeksiyonlarda normal doz 7 gün boyunca göze her dört saatte bir, bir veya iki damladır. Ciddi infeksiyonlarda normal doz iyileşme elde edene kadar her saat başı iki damladır. İyileşme sağlandıktan sonra doz azaltılarak kesilir [251].

Kullanımı gebelikte kullanımı

Üç farklı deney hayvanı türünde normal insan sistemik dozunun 33 katına kadar dozlarla yapılan çalışmalarda yumurtlama ve fetüs üzerine TOB'la herhangi bir olumsuz etki saptanmamıştır. Fakat öte yandan hamile kadınlar üzerinde TOB'un etkilerini izleyen kontrollü bir çalışma yoktur. Bu nedenle hamilelerde ancak kesin endikasyon varsa kullanılmalıdır [249, 250].

Süt veren annelerde kullanımı

Süt emen bebeklerde annenin TOB kullanımına bağlı olarak ortaya çıkabilecek olası yan etkiler nedeniyle durum değerlendirilerek bebek sütten kesilmeli veya ilaç kullanılmamalıdır [249].

2.12.3. Tobramisin tayin yöntemleri

Spektroskopik tayin yöntemleri

Gaikwad ve arkadaşları TOB'u tayin edebilmek için florimetrik bir metot önerilmiştir. TOB'a önce bir ön işlem uygulanarak, oftaldialdehit ile reaksiyona sokularak bir kompleks elde edilmiştir. Metodun doğrusal aralığı ve LOD değerleri sırasıyla 0,05-30,0 µg/mL ve 0,03 µg/mL olarak hesaplanmıştır [252].

Farklı numune örneklerinde TOB tayini için tek zincirli DNA (ssDNA) ve altın nanoparçacık (AuNP'ler) temelli kolorimetrik aptasensör Qiang ve ekibi tarafından geliştirilmiştir. TOB yokluğunda, DNA aptamerler altın nanopararçacıkların yüzeyi üzerine olası bir agregasyona karşı koruma için kaplanmıştır. TOB varlığında aptamer, TOB ile etkileşecek ve bu etkileşimin yüksek ilgilisi nedeniyle altın nanopararçacıkların yüzeyinden ayrılacaktır. Geliştirilen aptasensörler, TOB tespiti için yüksek bir seçicilik ve hassasiyet göstermiştir. Doğrusal aralığı ve LOD değeri sırasıyla 40–200 nM ve 23,3 nM'dir. Önerilen yöntem,% 93,1 - %105,1 arasında yüksek geri kazanımlara sahiptir. Geliştirilen yöntem sütte ve tavuk yumurtası örneklerinde TOB'u tespit etmek için başarıyla kullanılmıştır [253].

Kromatografik tayin yöntemleri

İdrar örneğinde TOB tayini için floresein izotiyosiyanat (FITC) izomeri ile kolon öncesi türevlendirmeyi içeren ters fazlı bir sıvı kromatografi yöntemi önerilmiştir. FITC, TOB ve diğer aminoglikozitlerin birincil amino gruplarıyla, uygun koşullar altında reaksiyona girerek yüksek derecede floresan ve stabil bir türev oluşturur. Kromatografik ayırma, bir C18 kolonu üzerinde, 1 ml / dk sabit akış hızı ve asetonitril-metanol-glasiye asetik asit-su (420: 60: 5: 515, h:h) kullanılarak ortam sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. TOB-FITC türevinin, uyarma dalga boyu 490 nm ve emisyon dalga boyu 518 nm'dir. Doğrusallık 0,25 – 20 µg / ml arasında gözlenmiştir. Geri kazanım 5 örnek çalışılarak değerlendirilmiş ve

%99'dan daha büyük bulunmuştur. İdrardaki teşhis (LOD) ve tayin limiti (LOQ) sırasıyla 70 ve 250 ng / ml olarak hesaplanmıştır [254].

Russ ve arkadaşları oftalmik süspansiyonda TOB'un tayinini gerçekleştirmek için HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. TOB analizi için öncelikle 2,4-dinitroflorobenzen ile kolon öncesi türevlendirme yapılmıştır. Yöntem, bilinen iki safsızlığın (neamin ve kanamisin) ve bir bozunma ürününün (nebramin) belirlenmesini kapsayacak şekilde düzenlenmiştir. Yöntem geliştirme, türevlendirme parametreleri (zaman, sıcaklık ve asit konsantrasyonu), mobil faz bileşimi, kolon seçimi ve sıcaklığı, dalga boyu değerlendirmesi ve cevap süresi gibi çeşitli faktörler araştırılmıştır. Türevlendirme işlemi 0,8 mM sülfürik asit ile 70 ° C'de 20 dakika süreyle uygulanmıştır. Hareketli faz olarak asetonitril / tampon (55/45; h / h) ve bir C18 kolon kullanılmıştır. İlgili maddelerin tayini için dedektör 365 nm'ye ayarlanmıştır. TOB'un geri kazanımı %99,6 ile %100,7 arasında bulunmuştur Bozunma ürünlerinin ve safsızlıkların analizinde herhangi bir etkileşim gözlenmemiştir [255].

Aminoglikozitlerden TOB'in doğrudan tayini için ters faz-HPLC metodunu kullanarak buharlaşmalı ışık saçılma dedektör (ELSD) sistemi kullanılarak yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Buharlaşma 45°C sıcaklıkta olacak şekilde C-18 kolonu kullanılarak su:asetonitril (55:45, h:h) hareketli fazı izokratik modda akış hızı 1 mL/dk olarak yöntem uygulanmıştır. TOB'un alıkonma süresi 4,3 dk olarak kaydedilmiştir. Kalibrasyon aralığı 1-38 µg/mL arasında doğrusaldır ve tanımlayıcılık katsayısı 0,9998 olarak bulunmuştur. Bununla beraber, LOD değeri 0,3 µg/mL; gün-içi ve günler-arası bağıl standart sapma değerleri sırası ile 1,0 ve 1,1 olarak hesaplanmıştır. Geri kazanım yüzdeleri %99 ile %103 olarak, bağıl standart sapma değeri 2,2 ve daha düşük değerlerde bulunmuştur. Geliştirilen HPLC/ELSD yönteminin insan serumundan TOB'in tayini için uygulanabilir olduğu sonucuna varılmıştır. Bunun için insan serumunda (0,6- 12,5 µg/mL) ve idrarda (1,5 – 12,5 µg/mL), katı faz ekstraksiyon ön işlemi sonrasında zenginleştirme yapılmıştır. İnsan serumu ve idrardaki geri kazanım sırası ile %86 ve %91 olarak hesaplanmıştır [256].

Barends ve arkadaşları, yüksek performanslı sıvı kromatografi kullanılarak TOB'in insan serumundan tayini için yöntem geliştirmiştir. Bunun için, 1-floro-2,4-dinitrobenzen ile kolon öncesi türevlendirme işlemi uygulanmıştır ve sonrasında UV dedektörlü ters faz kromatografi yöntemi kullanılarak tayin yapılmıştır. İç standart olarak gentamisin kullanılmıştır. 50 µl örnek enjeksiyonu yapılmıştır ve duyarlılık 0,5 mg/L olarak

bulunmuştur. 0,5 – 16 mg/L çalışma aralığında doğrusallık göstermektedir ve TOB geri kazanımı %41 olarak hesaplanmıştır. Türevlendirme reaksiyonunun etkisi ve iç standardizasyonun güvenilirliği üzerindeki etkileri araştırılmıştır. 2,4-dinitrofenil TOB türevi sentezlenmiştir ve yapısının tamamen türevlendirilmiş TOB olduğu kanıtlanmıştır. Türevlendirme işleminin yan ürünleri deneyler sırasında izole edilmiştir [257].

Serumda TOB tayini için LC-MS-MS ile serumda yeni bir tayin metodu geliştirilmiştir ve karşılaştırmalı deneyleri floresans polarize imünoesey ile yapılmıştır. Proteinlerin, asetonitirl ile çöktürülmesi sonrası süzüntü LC-MS-MS'e enjekte edilmiştir. C-18 kolonu kullanılarak %20 - %100 metanol çözeltisi ile elüsyon gerçekleştirilmiştir. LOQ 0,15 mg/L olarak hesaplanmıştır ve 50 mg/L'ye kadar sinyallerin doğrusal olduğu gözlenmiştir [258].

Elektrokimyasal tayin yöntemleri

Fernández arkadaşları, TOB'un elektrokimyasal tayini için manyetik mikropartikül ve aptamer tabanlı bir analiz yöntemi önermişlerdir. Deneysel sonuçlara göre doğrusallığın 5-500 μM derişim aralığında olduğu gözlenmiş ve metodun tekrar kullanılabilirliği % 5,7 olarak kaydedilmiştir [259].

Yine aynı çalışma grubu, TOB'un insan serumundan tayini için aptamer temelli yöntem önerilmiştir. Önerilen sistemde, yer değiştirme assay'i, faradayik elektrokimyasal empedans spektroskopi (F-EIS) kullanılarak çalışılmıştır. İki modifiye aptamer geliştirilmiş ve kıyaslamak için kullanılmıştır. Önerilen sistemde aminoglikozitlerin seçiciliği de çalışılmıştır. Seyreltme işlemi sonrasında doğrusal yanıt alınabilen aralığın 3 μM ve 72,1 μM olduğu gözlenmiştir [260].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Cihazlar

Çizelge 3.1. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar

Cihazın Adı	Cihazın Markası	Temin Edildiği Ülke
Manyetik Karıştırıcı	Scilogex, Ms-H280-Pro	A.B.D.
Santrifüj Cihazı	Sigma, D-37520	Almanya
Vakum Etüvü	Bluepar, Dzf-6030a	Çin
Spektroflorimetre	Agilent Technologies, Cary Eclipse	Avusturalya
Orbital Çalkalayıcısı	N-Biotek, Nb-101mc	Kore
Tüp Karıştırıcı	Firlabo	İngiltere
Manyetik Karıştırıcı	Wisd	Almanya
Vakum Filtrasyon Sistemi	İldam	Türkiye
Ph-metre	Mettler-Toledo, S210-Kit	İsviçre
UV Spektrofotometre	Analytikjena, Specord 50 Plus	Almanya
FT-IR Spektrofotometre	Bruker Optics, Bruker IFS 66/S	Almanya
XPS Spektrofotometre	UIVAC-PHI, PHI 500 VersaProbe	Japonya
Buzdolabı	Arçelik, 4252 EY	Türkiye
Deiyonize su	Merck-Millipore, Direct-Q 3 UV	Fransa
Hassas Terazi	OHAUS	A.B.D.

3.2. Kimyasal Maddeler

Çizelge 3.2. Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasalın Adı	Kimyasalın Markası	Temin Edildiği Ülke
$ZnSO_4.H_2O$	Sigma-Aldrich	A.B.D.
$MnCl_2.4H_2O$	Sigma-Aldrich	A.B.D.
$Na_2S.9H_2O$	Sigma-Aldrich	A.B.D.
TEOS	Sigma-Aldrich	A.B.D.
APTES	Sigma-Aldrich	A.B.D.
TOB	İbrahim Ethem Ulagay	Türkiye
KH_2PO_4	Sigma-Aldrich	A.B.D.
K_2HPO_4	Sigma-Aldrich	A.B.D.
Etanol	Honeywell	Almanya
$NaCH_3COO.3H_2O$	Honeywell	Almanya
CH_3COOH	Sigma-Aldrich	A.B.D.
DMSO	Sigma-Aldrich	A.B.D.
NH_3	Merck	Almanya
DCE	Merck	Almanya
TCA	Sigma-Aldrich	A.B.D.
Hidroklorik Asit	Sigma-Aldrich	A.B.D.
İnsan Serumu H4522	Sigma-Aldrich	A.B. D.
Naylon Membran	Alltech	A.B.D.
Azot Gazı	Ankara Gaz	Türkiye

3.3. Tamponlar ve Çözeltilerin Hazırlanmas

Çözeltiler, iletkenliği 18 mega-ohm/cm olan deiyonize su kullanılarak hazırlanmıştır.

Tampon çözeltiler

100 mL pH 7 fosfat tamponu hazırlamak için 1,74 g K_2HPO_4 ve 1,36 g KH_2PO_4 tartılıp deiyonize su içerinde çözülmüş ve gereken pH değerine 1,00 M HCl kullanılarak ayarlanmıştır. Hazırlanan tampon çözelti kullanılana kadar 4°C'te buzdolabında saklanır.

Asetat tamponu hazırlamak için; 2,85 mL CH_3COOH mikropipet ile alınır ve 250 mL'ye seyreltilir. 6,80 g $NaCH_3COO.3H_2O$ bir miktar deiyonize suda çözülür ve 250 mL'ye tamamlanır. Asetik asit çözeltisinden 14,8 mL ve sodyum asetat çözeltisinden 35,2 mL alınır ve 100 mL'ye seyreltilir. Daha sonra gereken pH 5 değerine 1,00 M NaOH kullanılarak ayarlanmıştır. Hazırlanan tampon çözelti kullanılana kadar 4°C'te buzdolabında saklanır.

Ekstraksiyon çözücüsünün hazırlanması

Yüzeyi TOB baskılanmış inorganik polimerlerde (IMIP) yapıdaki analiti uzaklaştırmak için DMSO:EtOH:H_2O (5:3:2, h/h/h) çözücü karışımı ekstraksiyon çözücüsü 250 mL olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan ekstraksiyon çözücüsü kullanılana oda sıcaklığında saklanır.

TOB stok ve ara stok çözeltisinin hazırlanması

5,00 mg TOB hassas olarak tartılıp 5,00 mL'lik balon jojeye konularak bir miktar DMSO ile ultrasonik banyoda çözünmesi sağlandıktan sonra aynı çözücü ile hacmine tamamlandı. Hazırlanan 1,00 mg/mL'lik TOB çözeltisi kullanıma kadar 4°C'de buzdolabında saklandı.

Ara stok çözeltisi, stok çözeltiden 1,00 mL mikropipet yardımı ile çekilip başka bir balon jojeye aktarıldı ve 10,00 mL'ye DMSO ile seyreltildi. Aynı işlemler çözücüsü pH=7,00 fosfat tamponu ile de yapılarak kullanılana kadar buzdolabında saklandı.

IMIP:ZnS stok süspansiyon hazırlanması

Stok partikül süspansiyon çözeltisi hazırlamak için 10,00 mg MIP ve NIP partikülleri tartıldı 5,00 mL DCE/tampon çözelti pH=7,00 ile hacme tamamlandı. Kullanmadan önce sonike edilip ve tüp karıştırıcıda karıştırılarak homojenliği sağlandı.

CEF ve GEN çözeltilerinin hazırlanması

5,00 mg CEF hassas olarak tartılıp 5,00 mL'lik balon jojeye konularak bir miktar DMSO ile ultrasonik banyoda çözünmesi sağlandıktan sonra aynı çözücü ile hacmine tamamlandı. Hazırlanan 1,00 mg/mL'lik CEF çözeltisi kullanıma kadar 4°C'de buzdolabında saklandı.

Ara stok çözeltisi, stok çözeltiden 1,00 mL mikropipet yardımı ile çekilip başka bir balon jojeye aktarıldı ve 10,00 mL'ye pH=7,00 fosfat tamponu ile seyreltildi ve kullanılana kadar buzdolabında saklandı.

5,00 mg GEN hassas olarak tartılıp 5,00 mL'lik balon jojeye konularak bir miktar deiyonize su ile ultrasonik banyoda çözünmesi sağlandıktan sonra aynı çözücü ile hacmine tamamlandı. Hazırlanan 1,00 mg/mL'lik GEN çözeltisi kullanıma kadar 4°C'de buzdolabında saklandı.

Ara stok çözeltisi, stok çözeltiden 1,00 mL mikropipet yardımı ile çekilip başka bir balon jojeye aktarıldı ve 10,00 mL'ye pH=7,00 fosfat tamponu ile seyreltildi ve kullanılana kadar 4°C'de buzdolabında saklandı.

Stabilite için Çözeltilerin Hazırlanması

IMIP:ZnS ve INIP:ZnS partikülleri 10'ar mg olacak şekilde tartılmıştır. 10 mL balon jojede 10 mL'ye sulu ortam için pH= 7,0 fosfat tamponu ve organik ortam için DCE ile tamamlandı. Kullanılana kadar 4°C'de buzdolabında saklandı.

3.4. Partiküllerin Sentezi ve Optimizasyonları

3.4.1. KN partikülleri sentezi

KN'ler, elde edilen partiküllerin MPTS modifikasyonu ve yüzeyi baskılanmış inorganik polimerlerin (IMIP ve INIP) sentezi Wang ve arkadaşlarının önerdiği deney prosedürüne göre yapılmıştır [217]. Bu prosedür bir takım optimizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen en uygun miktarlar kullanılarak Mn:ZnS KN çekirdek ve IMIP:ZnS fosforesans sensörün kabuğu sentezlenmiştir.

250 mL'lik iki boyunlu bir cam balonda, 6,25 mmol (1121,7 mg) $ZnSO_4.H_2O$ bir miktar deiyonize su içinde çözüldükten sonra 0,50 mmol $MnCl_2.4H_2O$ (98,95 mg) eklenir ve son hacim 20 mL'ye tamamlanarak manyetik karıştırıcıda çözünmesi sağlanır. Çözeltinin bulunduğu balonun bir boynuna N_2 gazı ile doldurulmuş balon takılarak 20 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılır. 6,20 mmol $Na_2S.9H_2O$ (1501 mg) ayrı bir yerde 5 mL deiyonize su içinde çözülür. Bir cam bürete doldurulur, bu büret iki boyunlu cam balonun diğer boynuna takılır ve Na_2S çözeltisi damla damla ilave edilir. Kuantum noktaların sentezlenmesi için 30 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılır (2 orta boy balık kullanılarak, 500 rpm hızında, 250 mL balon içerisinde). 30 dakika sonra Mn:ZnS KN'ler sentezlenmiş şekilde elde edilir.

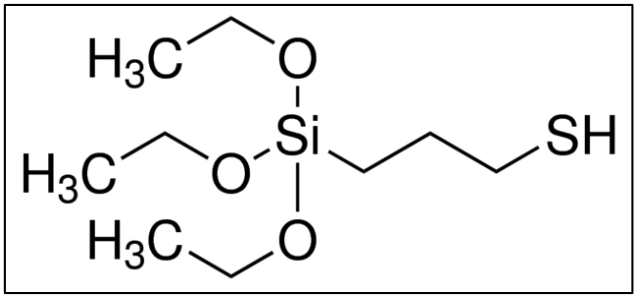
3.4.2. MPTS:ZnS modifikasyonu ve IMIP:ZnS sensörün sentezi

Daha sonra, Şekil 3.1'de gösterimi yapılan ve Şekil 3.2'de kimyasal yapısı sunulan MPTS'den 69,40 µL bir tüpe ilave edilir ve etanol ile 5,00 mL'ye seyreltilir. Bu çözelti, karıştırılmakta olan balona büret içinde damla damla eklenir. MPTS ilavesi bittiği anda gaz ile bağlantı kesilir. Gece boyunca karıştırılmaya devam edilir (20 saat, 300-350 rpm). Elde edilen süspansiyon önce santrifüj edilir (5000 rpm - 10 dk). Sonra, bir defa deiyonize su ve iki defa etanol ile yıkanır (10000 rpm'de 10 dk boyunca santrifüj edilir). Elde edilen MPTS modifiye edilmiş kuantum noktacıklar vakum etüvünde beş saat boyunca 50 ℃'de kurutulur.

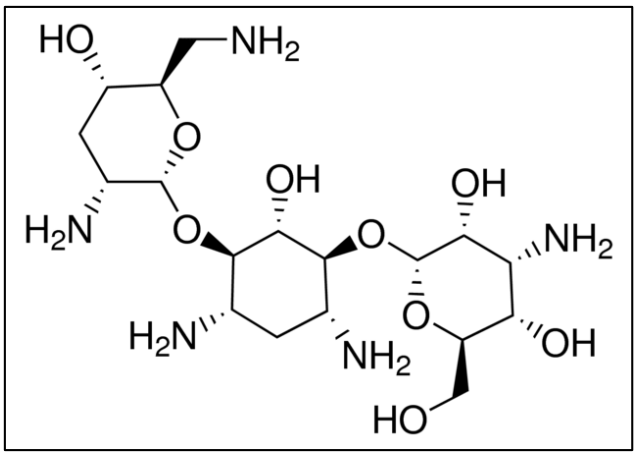
KN modifikasyonunda kullanılacak optimim MPTS miktarını belirlemek amacıyla 39,0-240,0 µL hacimlerinde MPTS ile çalışmalar yapılmıştır ve Bölüm 4'te ayrıntıları verilmiştir.



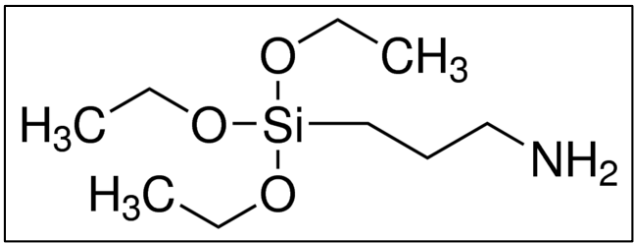
Şekil 3.1. MPTS modifiye Mn:ZnS partiküllerin sentezi gösterimi



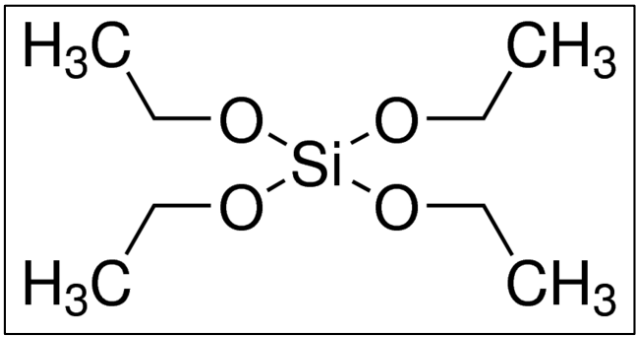
Şekil 3.2. MPTS kimyasal yapısı



Şekil 3.3. TOB kimyasal yapısı



Şekil 3.4. APTES kimyasal yapısı

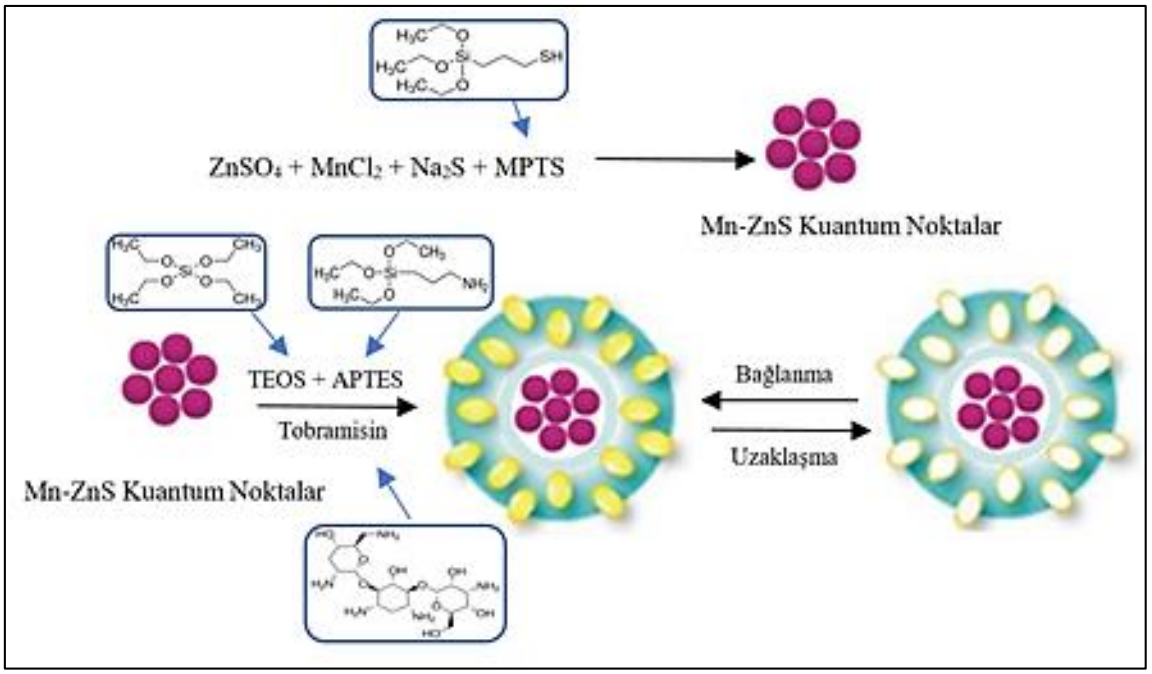


Şekil 3.5. TEOS kimyasal yapısı

IMIP:ZnS ve INIP:ZnS fosforesans sensörü sentezi

Bir cam vialde veya vezin kabında, kimyasal yapısı Şekil 3.3'te sunulan TOB'dan 1,50 mg tartılır ve 2,50 mL DMSO içinde çözünür. Şekil 3.4'te kimyasal yapısı gösterilen APTES'ten 25,00 µL ilave edilir ve 30 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılır. 75,00 µL TEOS eklenir ve 10 dakika daha karıştırmaya devam edilir, kimyasal yapısı Şekil 3.5'te gösterilmiştir. Manyetik karıştırıcıdaki karışım üzerine 10,00 mg MPTS-Mn:ZnS eklenir. Karışıma 200,00 µL %6 NH_4OH ilave edilir ve gece boyunca manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılır (300 rpm). Seçici olmayan bağlanmaları kontrol edebilmek amacıyla INIP-Mn:ZnS sentezi yapılmıştır. INIP-Mn:ZnS paritüküllerin sentezinde TOB ilavesi hariç aynı işlemler birebir uygulanmıştır. Sentezin gösterimi Şekil 3.1'da sunulmuştur.

Karıştırma işlemi bittikten sonra santrifüj uygulanır (10000 rpm - 10 dk). 3 defa Etanol:Su (1:1 h/h) çözeltisi ile yıkanır (10000 rpm - 10 dk). Elde edilen partiküller 5 saat boyunca 50°C vakum etüvünde kurutulur ve yüzey baskılamanın kontrolü için spektroflorimetrede fosforesans ölçümü alınır. Fosforesans sinyal ölçümü alınırken cihazın uyarma dalgaboyu 322 nm, emisyon dalga boyu 592 nm, slitler 10 nm ve dedektör voltajı 625 V'ye ayarlanır. (Cihaz için λ_{uyarma} : 322 nm, $\lambda_{emisyon}$: 592 nm, slitler:10 nm, PMT:625 V).



Şekil 3.6. Yüzeyi TOB baskılanmış MIP sentezi şematik gösterimi

Sentez yapılırken, 18,75-31,25 µL arasında APTES kullanılarak yukarıda açıklanan yöntem ile IMIP:ZnS ve INIP:ZnS sensör partikülleri sentezlenmiştir. Uygun fonksiyonel monomer miktarı belirlenmiştir. Devamında, 50-150 µL arasında TEOS kullanılarak aynı yöntem ile IMIP:ZnS ve INIP:ZnS sensör partikülleri sentezlenmiştir. Optimum çapraz bağlayıcı miktarı belirlenmiştir. En yüksek ilgi ile TOB'a cevap veren IMIP:ZnS sensörünü tespit etmek için 1,125-1,875 mg arasında TOB analiti miktarı araştırılmıştır ve IMIP:ZnS ve INIP:ZnS sensör partikülleri sentezlenmiştir. Sentezin gösterimi Şekil 3.6'da sunulmuştur. Bu optimizasyon parametreleri Bölüm 4'te detaylı bir şekilde anlatılmıştır.

3.5. TOB Ekstraksiyonu İşlemi

Yüzeyi TOB baskılanmış inorganik polimerlerde (IMIP) yapıdaki analiti uzaklaştırmak için DMSO:EtOH:H_2O (5:3:2, h/h/h) çözücü karışımı ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılmıştır. Ekstraksiyon, 25,00 mg partikül için 6,76 mL ekstraksiyon çözücüsü ile dört saat boyunca 50,00 mL'lik falcon tüplerin içinde orbital karıştırıcıda gerçekleştirilmiştir. İşlemler INIP için de uygulanmıştır.

3.6. Partiküllerin Sinyal Ölçümleri

Baskılama işlemi ve ekstraksiyon işleminin gerçekleşmiş olduğunu kanıtlamak için spektroflorimetre kullanılarak fosforesans sinyal ölçümleri kaydedilmiştir. Bunun için, IMIP:ZnS ve INIP:ZnS KN'lerin DCE içinde 1,0 mg/mL derişiminde süspansiyonları hazırlandı. Bu süspansiyondan 0,25 mL alınıp hacim DCE ile 3,0 mL'ye tamamlandı ve fosforesans sinyalleri ölçüldü (.λ_{uyarma} : 322 nm, $\lambda_{emisyon}$: 592 nm; slit aralıkları: 10 nm.).

Yeniden bağlanma çalışmaları için, 4 saat süre ile yapılan inkübasyon sonucunda bağlanma ortamından kuvartz küvete 3,0 mL alındı ve fosforesans ölçümü gerçekleştirildi. Bu ölçüm IMIP:ZnS, INIP:ZnS için (P) yapıldı. P0 ölçümünde ise aynı işlemler uygulandı ancak ortamda TOB ilavesi olmadan gerçekleştirildi (.λ_{uyarma} : 322 nm, $\lambda_{emisyon}$: 592 nm; slit aralıkları: 10 nm.).

Partiküllerin stabilitesini belirlemek için 1 mg/mL IMIP:ZnS ve INIP:ZnS süspansiyonu hem sulu hem organik ortamda öncelikle oda sıcaklığına getirilir. Sonrasında, 3 mL 0,3125 mg/mL derişiminde partikülün hem DCE hem pH= 7,0 fosfat tamponu ortamında fosforesans sinyalleri ölçülür. Organik ortamda günde 3 defa, 23 gün boyunca; sulu ortamda günde 3 defa 25 gün boyunca fosforesans sinyalleri ölçülmüştür (λ_{uyarma} : 322 nm, $\lambda_{emisyon}$: 592 nm; slit aralıkları: 10 nm).

3.7. Yeniden Bağlanma Çalışmaları

2,00 mg/mL derişiminde IMIP-Mn:ZnS / INIP-Mn:ZnS süspansiyonundan 0,625 mL alınır ve 1,00 mg/mL ana stok ve 0,01 mg/mL ara stok çözeltilerinden belirli derişimlerde TOB olacak şekilde ilgili hacimlerde, 15,00 mL'lik yeşil kapaklı tüplere ilave edilir. Son hacim 4 mL olacak şekilde DCE veya pH=7,00 fosfat tamponu ile hacme seyreltilir. Yeniden bağlanma çalışması 4 saat boyunca orbital çalkalayıcıda yapılır. Ölçüm almak için tüpteki çözeltiden 3,00 mL spektroflorimetre küvetine eklenir ve çözeltilerin fosforesans sinyali okunur (P). P0 fosforesans sinyalleri okumak için de aynı prosedür izlenir ancak bağlanma ortamına TOB eklenmeden inkübasyon yapılır.

3.7.1. Kalibrasyon standartlarının hazırlanması ve ölçümleri

Kalibrasyon için hazırlanan, 2,00 mg/mL partikül stok süspansiyon çözeltisinden 625 µL alınıp standart çözeltilerdeki derişimi 0,3125 mg/mL olacak şekilde tüplere eklendi. Sonrasında 0,10 mg/mL'lik TOB ara stok çözeltisinden mikropipet ile belli miktarlarda alınıp her biri fosfat tampon pH 7,00 ile 4,00 mL'ye tamamlanarak, 0,05; 0,10; 0,25; 0,50; 1,00; 1,50 µg/mL derişimlerde standartlar hazırlandı (λ_{uyarma} : 322 nm, $\lambda_{emisyon}$: 592 nm; slit aralıkları: 10 nm).

Kalibrasyon için hazırlanan, 2,00 mg/mL partikül stok süspansiyon çözeltisinden 625 µL alınıp standart çözeltilerdeki derişimi 0,3125 mg/mL olacak şekilde tüplere eklendi. Kalibrasyon için hazırlanan 0,1 mg/mL'lik TOB ara stok çözeltisinden mikropipet ile belli miktarlarda alınıp her biri DCE ile 4,0 mL'ye tamamlanarak, 0,05; 0,10; 0,25; 0,50; 1,00; 1,50 µg/mL derişimlerde standartlar hazırlandı (λ_{uyarma} : 322 nm, $\lambda_{emisyon}$: 592 nm; slit aralıkları: 10 nm).

3.8. Süt Matriksi ve Serum Matriksinde Çalışmalar

5,00 mL yağsız süt üzerine, 1,00 mg/mL derişiminde hazırlanmış TOB ana stok çözeltisinden belirli hacimde ilâve edilir. Üzerine, deiyonize su içinde hazırlanan %10'luk TCA çözeltisinden 500 µL eklenir. Çözelti 15 dakika boyunca 5000 rpm'de santrifüjlenir. Süzüntüler alınır ve pH'ı 7,00'a ayarlanır. Elde edilen çözelti 0,45 µm gözenekli naylon filtreler ile vakumda süzülür ve süzüntü hacmi belirlenir. Kullanılana kadar 4°C'te buzdolabında saklanır.

Örnek hazırlama işleminde, insan serumu numunelerinde bir ön işleme gerek duyulmamıştır.

3.8.1. Süt matriksinde bağlanma çalışmaları

2,50 mL TCA ile ön işlem uygulanmış süt alınır, üzerine 2,00 mg/mL derişiminde IMIP-Mn:ZnS / INIP-Mn:ZnS partikül stok çözeltisinden 625 µL ilave edilir ve son hacmi pH 7 fosfat tamponnu ile 4,00 mL'ye tamamlanır. Yeniden bağlanma çalışması kapağı kapatılmış deney tüpleri içinde orbital karıştırıcıda 4 saat boyunca yapılır. İnkübasyon sonunda tüplerden 3 mL alınarak kuvartz küvete eklenir ve fosforesans sinyali ölçülür. P0 fosforesans sinyalleri okumak için de aynı prosedür izlenir ancak bağlanma ortamına TOB eklenmeden

inkübasyon yapılır. Stern-Volmer kalibrasyonuna göre sinyal yerine koyularak TOB derişimi hesaplanır.

3.8.2. Serum matriksinde bağlanma çalışmaları

1,00 mL ticari insan serumu çözeltisinin içine, 1,00 mg/mL derişiminde hazırlanmış TOB ana stok çözeltisinden belli hacimlerde ilâve edilir. Üzerine 2,00 mg/mL derişiminde IMIP-Mn:ZnS / INIP-Mn:ZnS partikül stok çözeltisinden 625 µL eklenir ve son hacmi fosfat tamponnu ile 4,00 mL'ye tamamlanır. Yeniden bağlanma çalışması kapağı kapatılmış deney tüpleri içinde orbital karıştırıcıda 4 saat boyunca yapılır. İnkübasyon sonunda tüplerden 3 mL alınarak kuvartz küvete eklenir ve fosforesans sinyali ölçülür. P0 fosforesans sinyalleri okumak için de aynı prosedür izlenir ancak bağlanma ortamına TOB eklenmeden inkübasyon yapılır. Stern-Volmer kalibrasyonuna göre sinyal yerine koyularak TOB derişimi hesaplanır.

3.9. Analitik Performans Çalışmaları

Öncelikle hem organik ortamda hem de fosfat tamponu (pH= 7,00) ortamında doğrusal aralık belirlemek için deneyler yapılmıştır. DCE ortamında yapılan deneylerde, doğrusal aralık 0,01 – 5,00 µg/mL olarak çalışılmış ve kalibrasyon doğrusu hazırlanmıştır. Fosfat tamponu (pH= 7,00) ortamında doğrusal aralık 0,05 – 1,50 µg/mL olarak çalışılmış ve kalibrasyon doğrusu hazırlanmıştır.

Kalibrasyon çalışması Stern-Volmer'a göre ve baskılama faktörünü hesaplamak için derişime karşılık P0/P'ye göre yapılmıştır. Bunların sonucunda kalibrasyon eğrileri çizilmiş ve denklemleri oluşturulmuş, R değerleri hesaplanmıştır. P0, inkübasyon süresi sonunda analit bağlanmadan önceki, P ise analit bağlandıktan sonraki sinyalleri temsil etmektedir.

LOD ve LOQ değerlerinin belirlenmesi için kalibrasyon çalışmalarında kullanılan en küçük derişime sahip standart sapma kullanılarak fosforesans sinyalleri ölçülmüştür (n=10). Ölçümlerin standart sapma değerleri belirlenmiştir. LOD hesaplanırken (3,3 x SS) / eğim; LOQ hesaplanırken ise (10 x SS) / eğim hesabı kullanılarak sayısal sonuçlar belirlenmiştir.

Gün içi ve günler arası kesinlik çalışmaları için satın alınan yağsız süt ve ticari insan serumu kullanılmıştır. Sütte gün içi ve günler arası deneyler yapılırken, kalibrasyon aralığına girecek 3 farklı derişimde (0,10; 0,25; 0,50 µg/mL) TOB içeren numuneler ile çalışılmıştır. P ve P0 sinyalleri günde 3 kere, farklı zamanlarda okunarak kaydedilmiştir. Günler arası çalışmalarda da 3 farklı TOB derişimi 3 ayrı günde, üçer defa çalışılarak yapılmıştır.

İnsan serumu çalışmalarına gelince, kalibrasyo aralığında olacak şekilde 3 farklı TOB derişimi seçilmiştir (0,30; 0,60 ve 1,20 µg/mL). Gün içi ve günler arası çalışmalar yine yukarıda bahsedilen şekilde yapılmış ve fosforesans sinyalleri okunarak bağıl standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Kesinlik parametresi ile ilgili yorumlar yapılmıştır.

Geri kazanım çalışmalarında ise, süte ve insan serumuna farklı derişimlerde TOB ilâve edilerek ilgili kalibrasyon doğruları kullanılarak sonuçlar hesaplanmıştır. Sütte geri kazanım çalışması için, 3 farklı TOB derişimi (0,10; 0,25; 0,50 µg/mL) içeren numuneler hazırlanmıştır. Her bir numune ayrı ayrı üç defa çalışılarak TOB'un süt numunesindeki geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. İnsan serumu için ise, kalibrasyon aralığına girecek şekilde 3 ayrı TOB derişimi (0,30; 0,60 ve 1,20 µg/mL) içeren numuneler hazırlanmıştır. Her bir numune ayrı ayrı dört defa çalışılarak TOB'un insan serumu numunesindeki geri kazanım değerleri hesaplanmıştır

Çalışmalar sonucu fosforesans sinyalleri okunması şu sıra ile yapılmaktadır. İnkübasyon 4 saat boyunca orbital karıştırıcıda gerçekleştirilir. Deney sonlandığında tüpler 5 dakika boyunca ultrasonik banyoda homojenize edilir. Daha sonra 15 saniye vortekslenerek tüpteki çözeltiden 3,00 mL spektroflorimetre küvetine eklenir ve sinyal okunur.

3.9.1. Seçicilik çalışması için çözeltilerin hazırlanması

Seçicilik çalışması için TOB'un analoğu olan GEN ve yapısal olarak benzemeyen CEF kullanılmıştır. 0,3125 mg/mL derişiminde olacak şekilde 2,00 mg/mL stok süspansiyon IMIP/INIP çözeltisinden 0,625 mL alınır, devamında derişimi 0,1 µg/mL olacak şekilde analit ve analog çözeltileri ayrı ayrı 15,00 mL'lik yeşil kapaklı tüplere ilave edilir. Son hacim 4,00 mL olacak şekilde pH=7,00 fosfat tamponu ile hacme seyreltilir. 4 saat yeniden bağlanma çalışması yapılır ve işlem bittiğinde 5 dakika sonikatörde homojen bir dağılma

sağlanır sonrasında vortekslenerek tüpten 3,00 mL spektroflorimetre küvetine aktarılarak sinyal ölçülür.

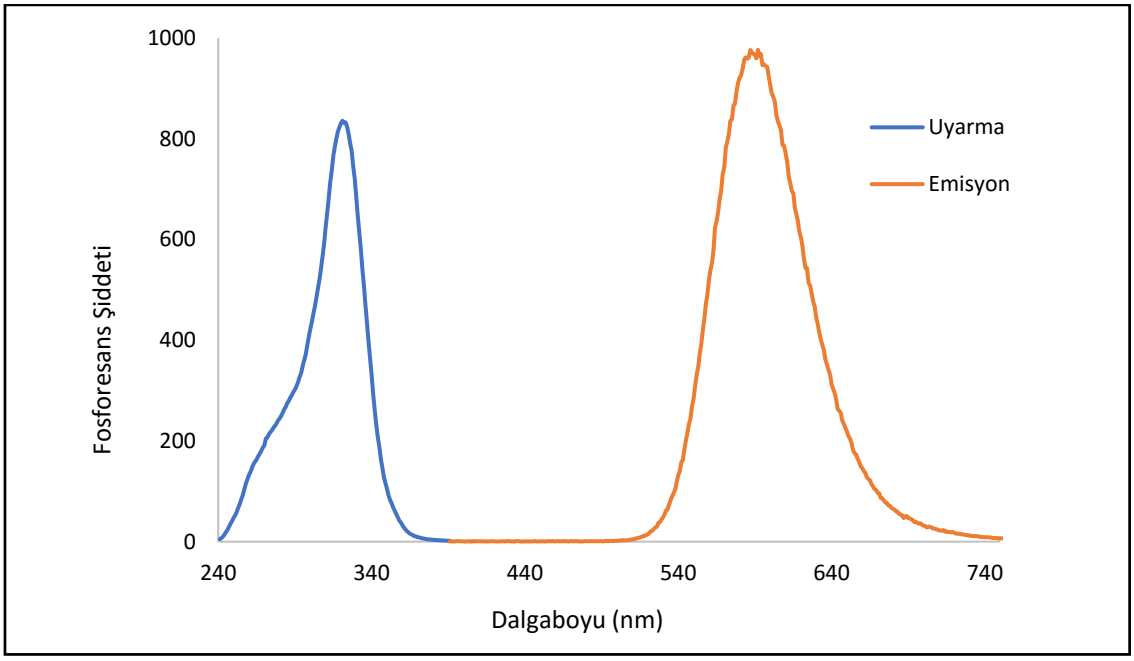
4. BULGULAR

Tez çalışmasında ilk olarak sensörün karakterizasyon çalışması yapıldı ve değerlendirildi. Karakterizasyon çalışmalarından TEM, FTIR ve XPS analizleri ODTÜ Merlab'da yapılmıştır. Daha sonra sentez bileşenleri olan, fonksiyonel monomer, çapraz bağlayıcı ve kalıp molekül miktarlarının optimizasyonları yapıldı. TOB'un bağlanma yüzdesini incelemek için inkübasyon çalışmaları uygulandı. Bu çalışmalardaki bağlanma yüzdelerini iyileştirmek için çeşitli optimizasyonlar yapıldı. Bu optimizasyonlar sırasıyla, inkübasyon çözücüsü, bağlanma süresi, inkübasyonda kullanılacak polimer miktarı ve TOB çözelti derişimidir. Oda sıcaklığında fosforesans emisyon ölçümlerine dayalı olarak yapılan geri kazanım çalışmalarında geliştirilen sensörün analitik performansı hem insan serumunda hem de süt matriksinde değerlendirildi.

4.1. Sentez Parametreleri Çalışmaları ve Karakterizasyon

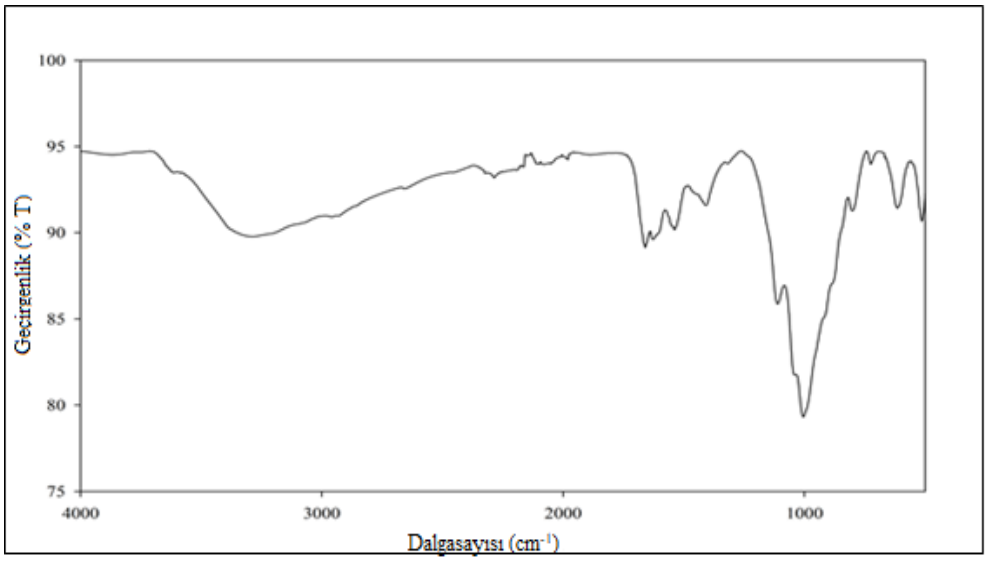
4.1.1. Sentez parametreleri optimizasyonu

KN sentezi ve MPTS modifikasyonu deneyleri Wang tarafından geliştirilen yöntem kullanılarak yapılmıştır [217]. Öncelikle, KN'lere ait uyarma ve emisyon dalga boyları araştırılmıştır ve spektroflorimetrede fosforesans emisyon spektrumları ölçülmüştür. Şekil 4.1'de KN'lerin uyarma ve emisyon dalgaboyları sırasıyla 322 nm ve 592 nm olarak kaydedilmiştir.



Şekil 4.1. Mn:ZnS KN'lerine ait uyarma ve fosforesans emisyon spektrumu

Mn:ZnS KN'leri partikülleri karakterize etmek için partiküllerin Şekil 4.2'de FTIR spektrumları kaydedilmiştir.



Şekil 4.2. Mn:ZnS KN'lerin FTIR spektrumu

Karakterizasyonu yapılan KN'ler, yüzey baskılama işlemi öncesinde MPTS ile kaplanmalıdır. Bunun için öncelikle KN yüzeyi modifikasyonu için gerekli MPTS miktarı incelenmiştir. Farklı miktarlarda (39 µL – 240 µL) MPTS'nin sentezlenen yüzeyi TOB

baskılanmış MPTS modifiye edilmiş Mn:ZnS KN'lerin fosforesans sinyallerine olan etkisi Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Farklı MPTS hacimleri ile partiküllerin polimerizasyon ve ekstraksiyon sonrası sinyalleri

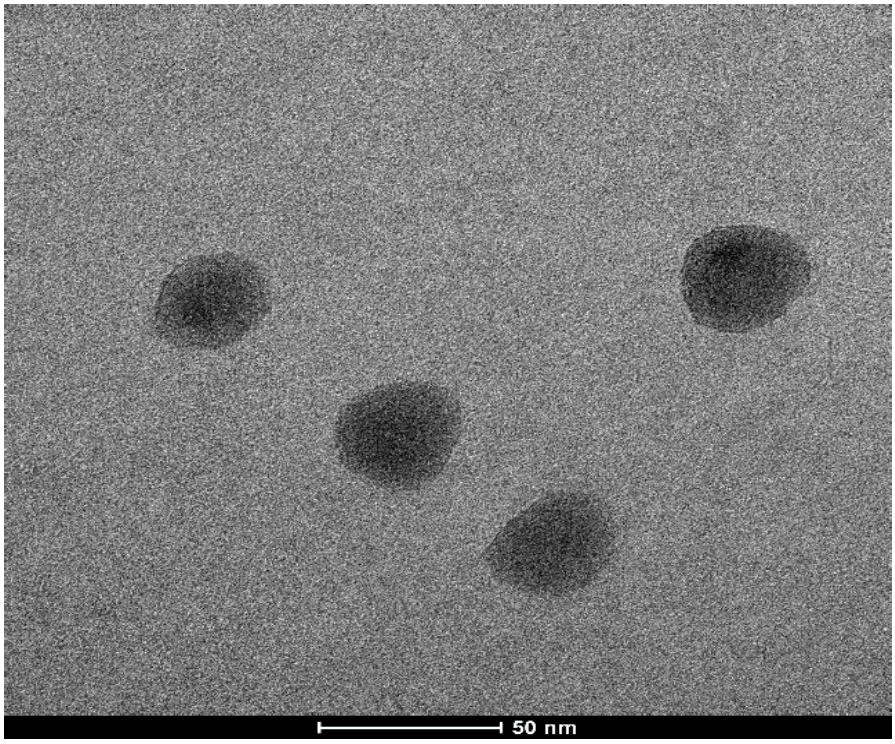
MPTS Miktarı (µL)	Baskılama Sonrası Fosforesans Sinyali		Ekstraksiyon Sonrası Fosforesans Sinyali		Polimerizasyon
	INIP	IMIP	INIP	IMIP	
39	250,1	138,4	271,5	177	Süspansiyon
54	205	100	186	169	Süspansiyon
69,4	222	91	204	203	Süspansiyon
90	-	-	-	-	Çözelti
120	48	35	103	96	Çözelti
240	37	29	153	148	Çözelti

Çizelge 4.2'de, MPTS miktarı 39, 54 ve 69,4 µL kullanılarak sentezlenen IMIP-Mn:ZnS ve INIP-Mn:ZnS KN'lerin yerniden bağlanma çalışmaları görülmektedir. Fosforesans emisyon sinyalindeki düşüşün IMIP için en fazla ve seçici olmayan türleri kontrol amaçlı sentezlenen INIP için en az olan miktarın 69,4 µL MPTS kullanılarak sentezlenen partiküllerde olduğu görülmektedir. Bu verilere dayanarak, optimum miktarın 69,40 µL olmasına karar verilmiştir.

Çizelge 4.2. Farklı miktarlardaki MPTS'nin yeniden bağlanma çalışmalarında fosforesans sinyali üzerindeki etkisi

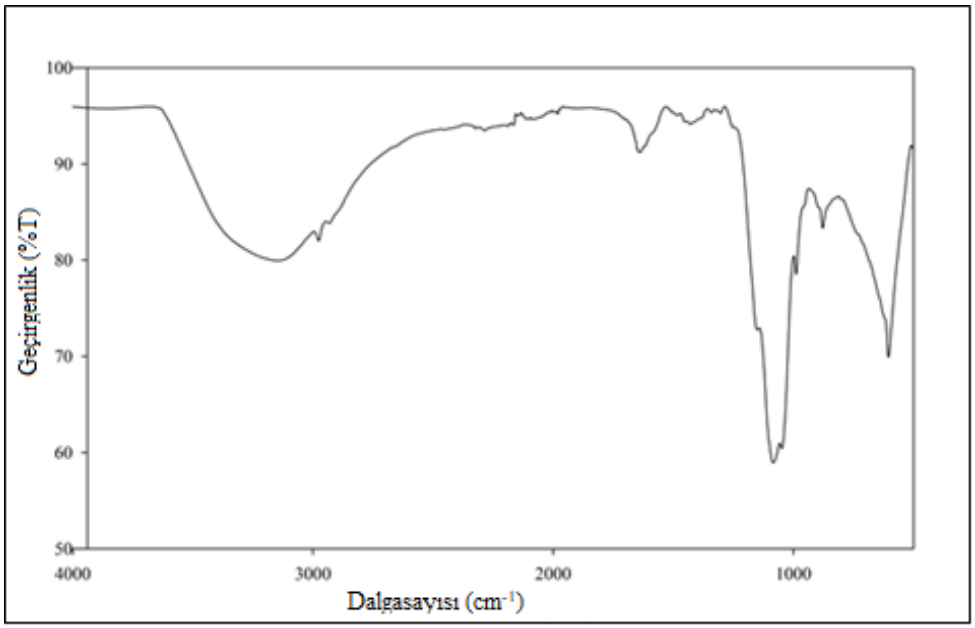
MPTS Miktarı (µL)	IMIP			INIP		
	INIP	IMIP	% Sinyal Düşüşü	INIP	IMIP	% Sinyal Düşüşü
39	476	304,6	36	412	383,8	13,7
54	510	259	49,2	485	426,8	12
69,4	507	198	61	540	500,9	7,2

MPTS modifiye edilmiş KN'lerin boyutlarını araştırmak için TEM görüntüleri kaydedilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.3'te sunulmuştur.



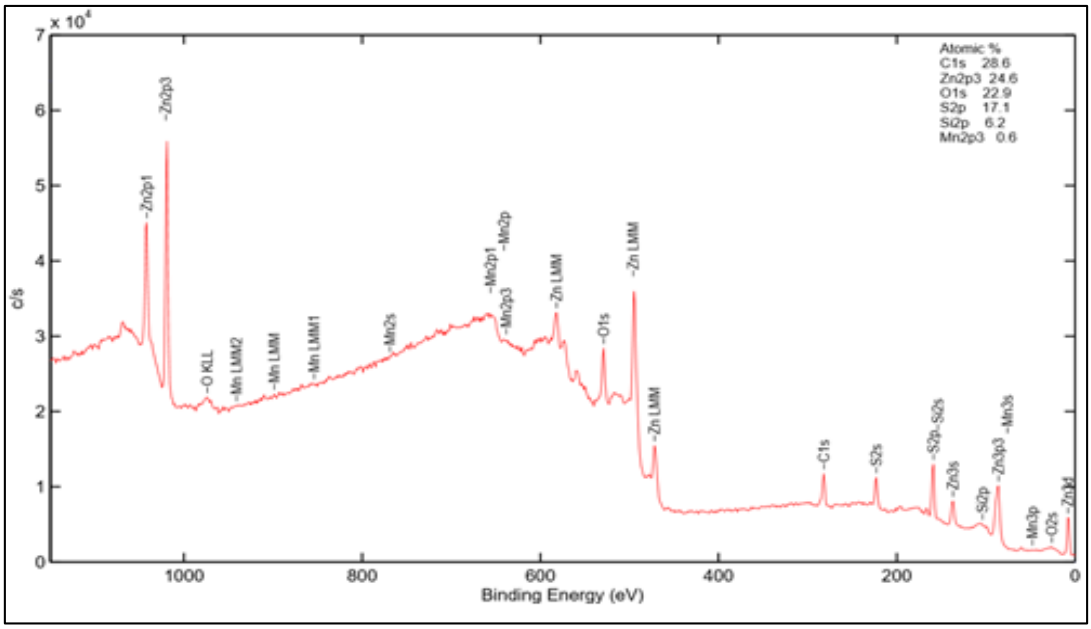
Şekil 4.3. MPTS modifiye edilmiş Mn:ZnS KN'lerin TEM görüntüsü

MPTS modifiye edilmiş Mn:ZnS partikülleri karakterize etmek için partiküllerin Şekil 4.4'te FTIR spektrumları kaydedilmiştir.



Şekil 4.4. MPTS modifiye edilmiş Mn:ZnS KN'lerin FTIR spektrumu

MPTS modifiye edilmiş KN partiküllerin, XPS spektrumları kaydedilmiştir. Bu spektrum Şekil 4.5'te gösterilmiştir.



Şekil 4.5. MPTS modifiye edilmiş Mn:ZnS KN'lerin XPS spektrumu

TOB tayini için yüzeyi baskılanmış fosforesans sensör hazırlamak amacı ile sentez parametreleri de sırasıyla optimize edilmiştir. Bunlardan ilki fonksiyonel monomer olarak kullanılan APTES'in optimizasyon çalışmalarıdır. Bu amaçla 18,75; 25,00 ve 31,25 µL APTES kullanılarak yüzeyi TOB baskılanmış partiküller sentezlenmiştir. Ekstraksiyon işleminden sonra IMIP ve INIP sinyalleri ölçülmüştür. Seçiciliğin, 25,00 µL APTES kullanıldığında maksimum verime ulaştığı fosforesans emisyonları ölçülerek kanıtlanmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.3 ve 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.3. APTES miktarının baskılama ve ekstraksiyon sonrası fosforesans sinyallerine etkisi

APTES Hacmi (µL)	Baskılama Sonrası Fosforesans Sinyali		Ekstraksiyon Sonrası Fosforesans Sinyali		Polimerizasyon
	INIP	IMIP	INIP	IMIP	
18,75	439	365	403	394	Süspansiyon
25,00	222	91	204	203	Süspansiyon
31,25	418	174	400	406	Süspansiyon

Çizelge 4.4. Farklı miktarlarda APTES'in yeniden bağlanma çalışmalarında fosforesans sinyali üzerindeki etkisi

	IMIP			INIP		
APTES (µL)	P_0	Pson	%Düşüş	P_0	Pson	%Düşüş

18,75	500	290	42	482	429	11
25,00	507	198	61	540	500,9	7,2
31,25	533	260,6	51,1	514	436,9	15

Çapraz bağlayıcı olarak kullanılan TEOS'un sensörün seçiciliği üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu nedenle 50,00; 75,00; 100,00; 125,00 ve 150,00 µL TEOS kullanılarak, yüzeyi TOB baskılanmış farklı sensörler hazırlanmıştır. Fosforesans emisyon ölçümleri göz önüne alındığında, en fazla seçiciliğe ve en yüksek sensör verimine 75,00 µL TEOS kullanıldığında ulaşıldığı görülmektedir. Deneysel verileri Çizelge 4.5 ve 4.6'da belirtilmiştir.

Çizelge 4.5. TEOS miktarının baskılama ve ekstraksiyon sonrası fosforesans sinyallerine etisi

TEOS Hacmi (µL)	Baskılama Sonrası Fosforesans Sinyali		Ekstraksiyon Sonrası Fosforesans Sinyali		Polimerizasyon
	INIP	IMIP	INP	IMIP	
50,00	551	375	536	509	Süspansiyon
75,00	590	392	554	516	Süspansiyon
100,00	222	91	204	203	Süspansiyon
125,00	-	-	-	-	Çözelti
150,00	-	-	-	-	Çözelti

Çizelge 4.6. Farklı miktarlarda TEOS'un yeniden bağlanma çalışmalarında fosforesans sinyali üzerindeki etkisi

	IMIP			INIP		
TEOS (µL)	P_0	Pson	%Düşüş	P_0	Pson	%Düşüş
50,00	529	227,5	57	507	446,2	12
75,00	487	155,8	68	572	517,7	9,5
100,00	507	198	61	540	500,9	7,2

Farklı miktarlarda TOB (1,125 mg, 1,5 mg ve 1,875 mg) kullanılarak hazırlanan sensöre ait fosforesans sinyalleri incelenmiştir. INIP'in seçici olmayan türlere cevabının daha düşük olduğu gözlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.7 ve Şekil 4.8'de sunulmuştur.

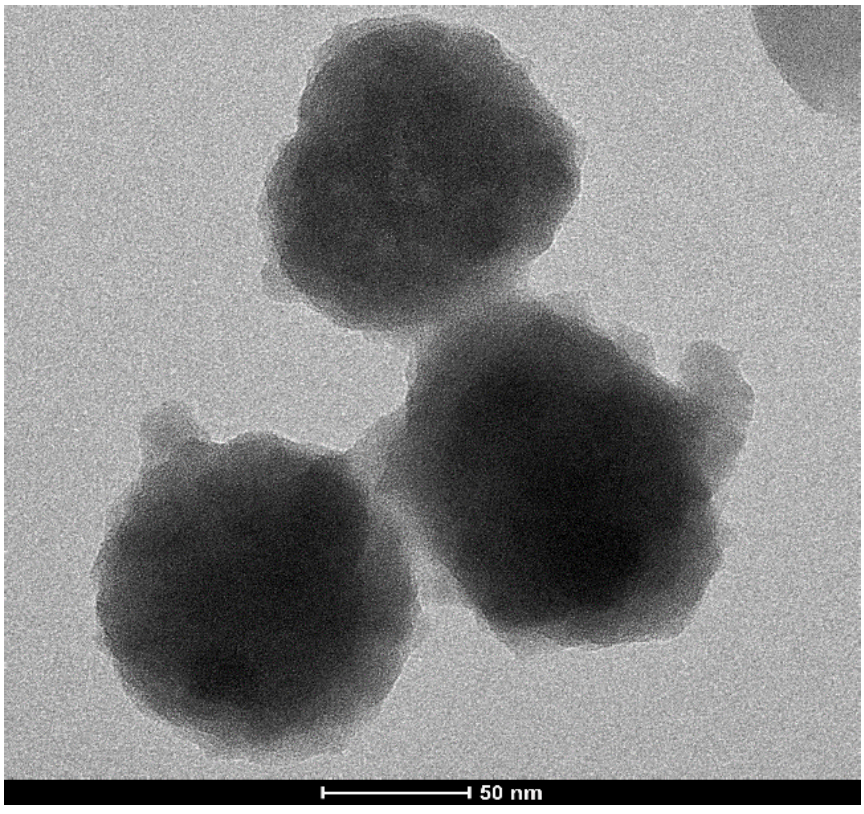
Çizelge 4.7. TOB miktarının baskılama ve ekstraksiyon sonrası fosforesans sinyallerine etkisi

TOB miktarı (mg)	Baskılama Sonrası Fosforesans Sinyali		Ekstraksiyon Sonrası Fosforesans Sinyali	
	INIP	IMIP	INIP	IMIP
1,125	539	379	512	494
1,500	222	91	204	203
1,875	519	402	501	532

Çizelge 4.8. Farklı miktarlarda TOB'un yeniden bağlanma çalışmalarında fosforesans sinyali üzerindeki etkisi

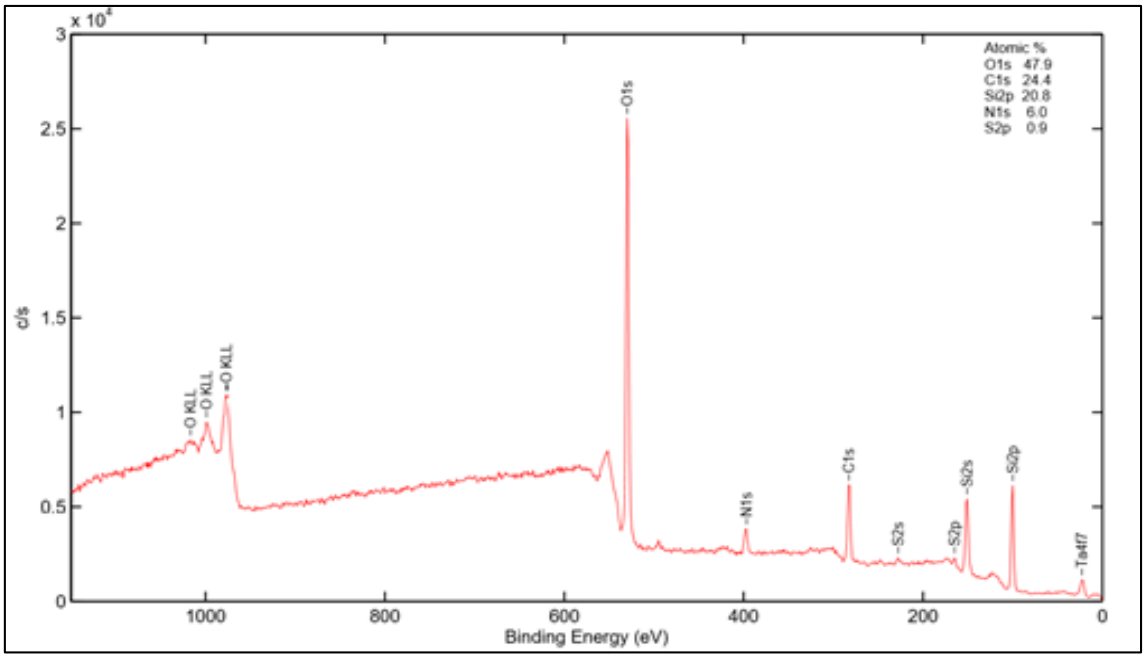
	IMIP			INIP		
TOB (mg)	P_0	Pson	%Düşüş	P_0	Pson	%Düşüş
1,125	467	160,12	65,7	507	446,2	10,8
1,500	501	162,32	68	572	517,7	8,4
1,875	558	228,78	59	540	500,9	7,7

MPTS modifiye edilmiş yüzeyi TOB baskılanmış sensörlerin boyutlarını araştırmak için TEM görüntüleri kaydedilmiştir. Sentezlenen IMIP:ZnS sensör partiküllerinin, MPTS modifiye edilmiş KN partiküllere göre daha büyük çapta olduğu gözlenmiştir. Sonuç Şekil 4.6'da sunulmuştur.

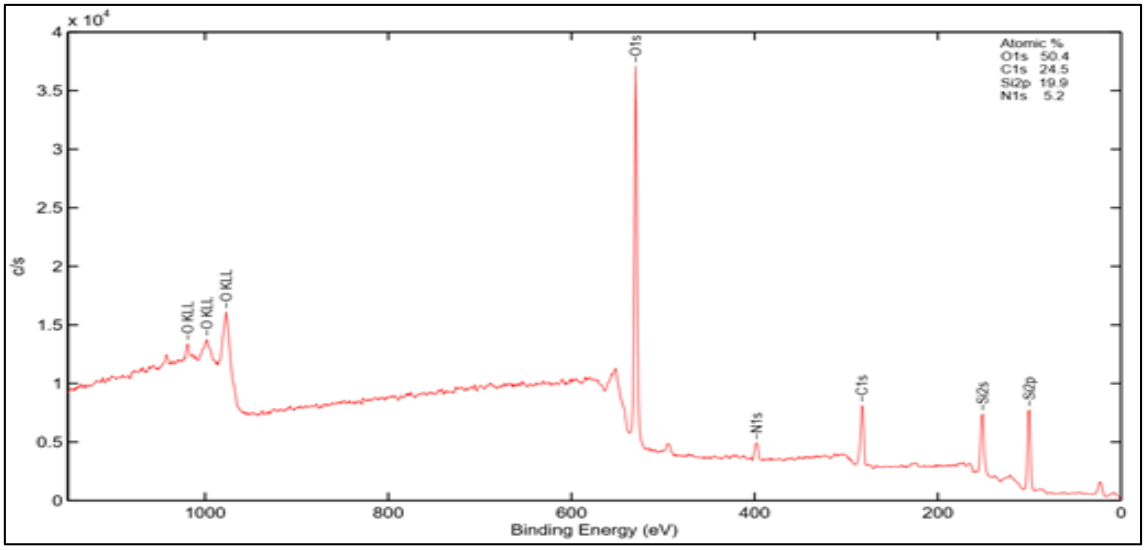


Şekil 4.6. Yüzeyi IMIP ile kaplanmış Mn:ZnS KN'lerin TEM görüntüsü

Yüzeyi TOB baskılanmış (IMIP:ZnS) ve kontrol sensörü olarak TOB baskılanmamış (INIP:ZnS) partiküllerin XPS spektrumları kaydedilmiştir. Bu spektrumlar Şekil 4.7 ve 4.8'de gösterilmiştir.



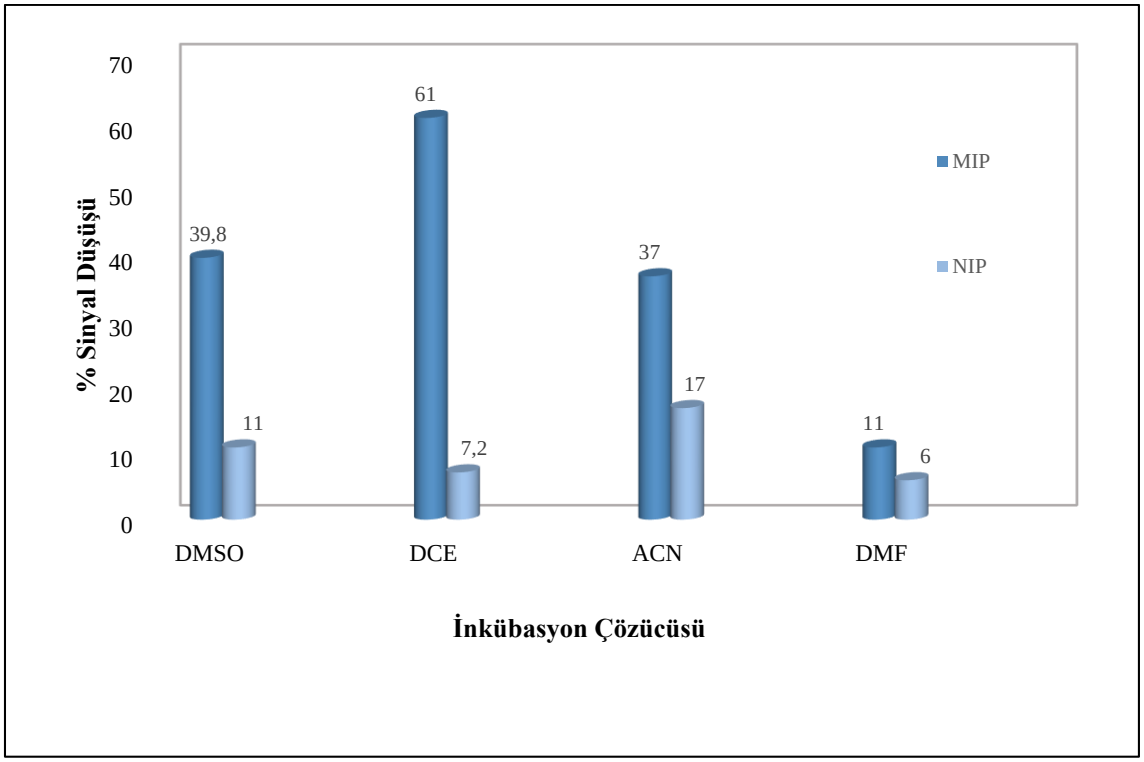
Şekil 4.7. Yüzeyi IMIP ile kaplı Mn:ZnS KN'lerin XPS spektrumu



Şekil 4.8. INIP - Mn:ZnS KN'lerin XPS spektrumu

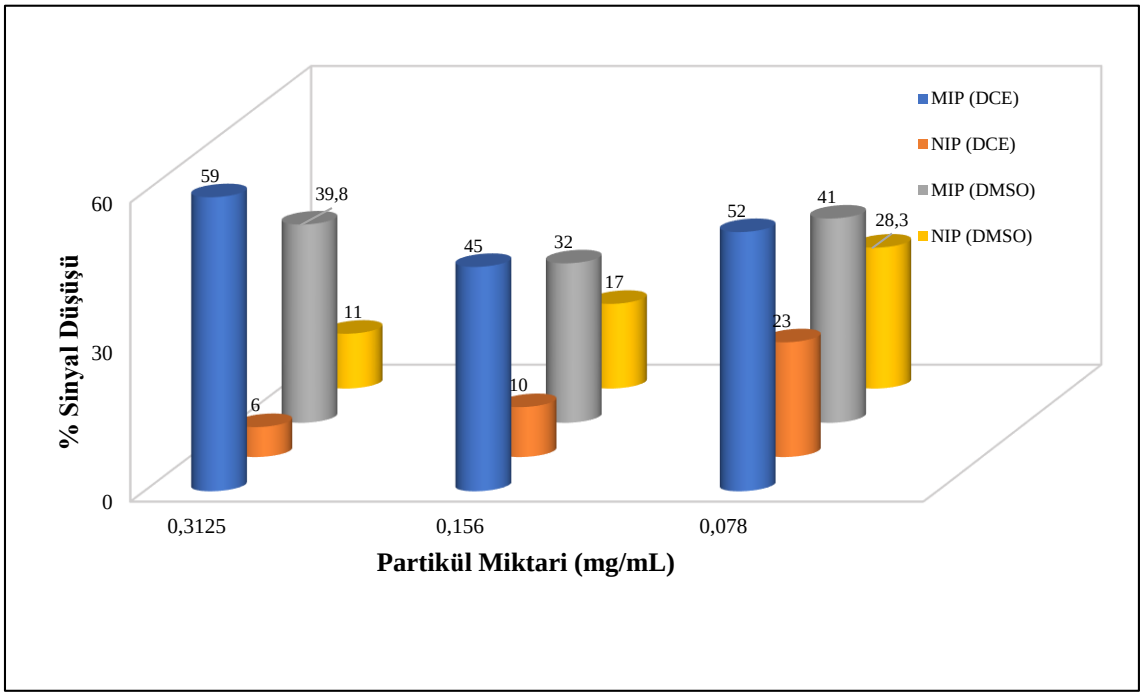
Sentezlenen IMIP ve INIP sensörlerin inkübasyon optimizasyonları

Yeniden bağlanma ortamında kullanılan çözücü türünün, TOB için hazırlanan fosforesans sensöre etkisi incelendi. Çözücü seçimi için organik ortamda da DMSO, DCE, ACN ve dimetil formamid (DMF) çözeltilerinde çalışılmıştır. Sonuçlar Şekil 4.9'da gösterilmiştir.



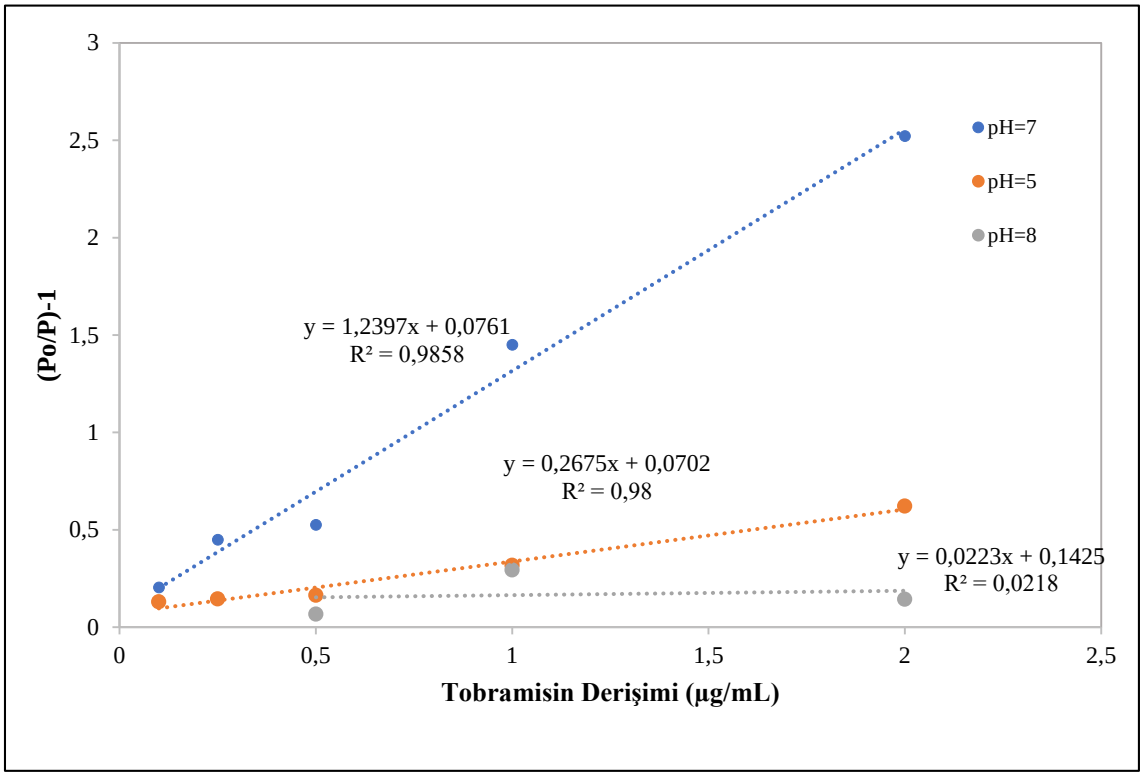
Şekil 4.9. Yeniden bağlanma çalışması için çözücü optimizasyonu.

İnkübasyon ortamına eklenecek olan partikül miktarı hem DMSO hem de DCE çözücü ortamlarında, partikül derişimi 0,3125 mg/mL; 0,156 mg/mL ve 0,0780 mg/mL olacak şekilde incelenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



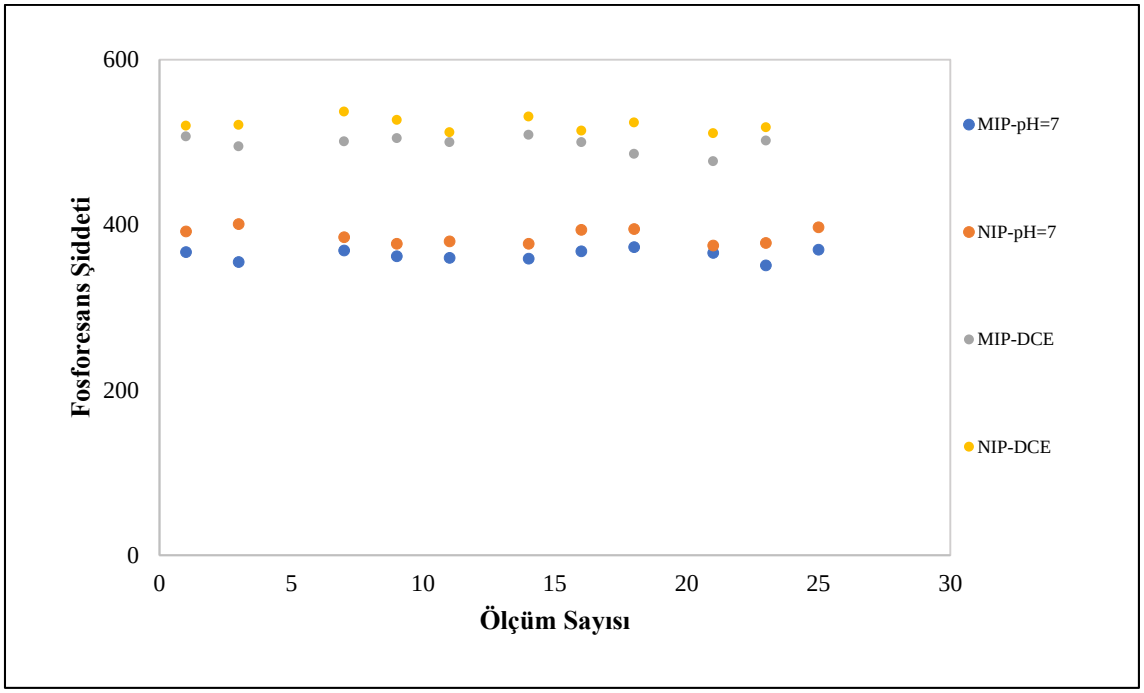
Şekil 4.10. Farklı çözücü ortamında partikül miktarı optimizasyon çalışması

Sulu ortamda sensörün, oda sıcaklığında fosforesans sinyaline olan etkisini gözlemek için farklı pH (5,00; 7,00; 8,00) değerlerinde inkübasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.11'de sunulmuştur.



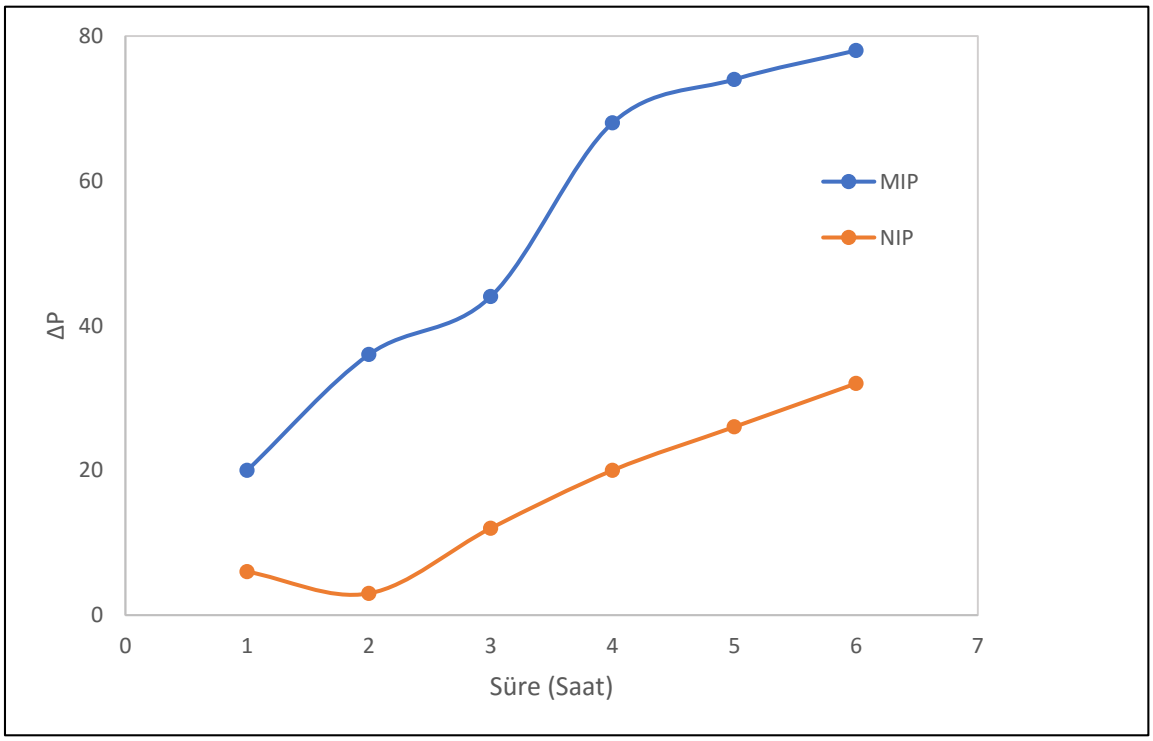
Şekil 4.11. Farklı pH ortamlarında Stern-Volmer kalibrasyon çalışması (Asetat tamponu 5,00; PBS 7,00 -8,00. P0, inkübasyon süresi sonunda analit bağlanmadan önceki, P ise analit bağlandıktan sonraki sinyalleri temsil etmektedir)

Yüzeyi baskılanmış oda sıcaklığında fosforesansa cevap verebilen IMIP ve INIP sensörünün fotokararlılıkları organik ortamda 23 gün boyunca, sulu ortamda da 25 gün boyunca aynı koşullarda aynı saatte ölçüm alınarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.12'te sunulmuştur.

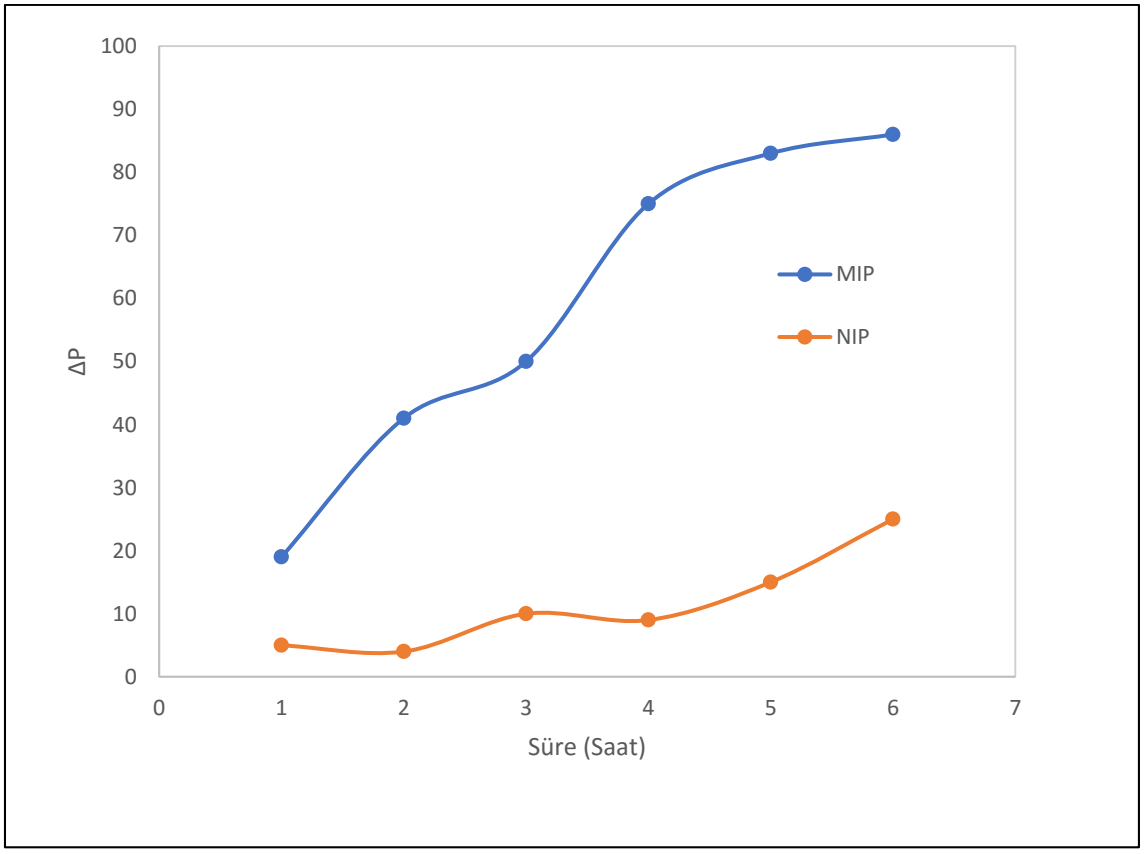


Şekil 4.12. IMIP/INIP partiküllerin stabilite çalışması

Sensöre TOB'un yeniden bağlanma çalışmalarında inkübasyon süresi organik ortamda (DCE) ve sulu ortamda (pH=7,00) incelendi. Deneyler 6 ssaat boyunca sürdürülmüştür. Sonuçlar Şekil 4.13 ve 4.14'te sunulmuştur.



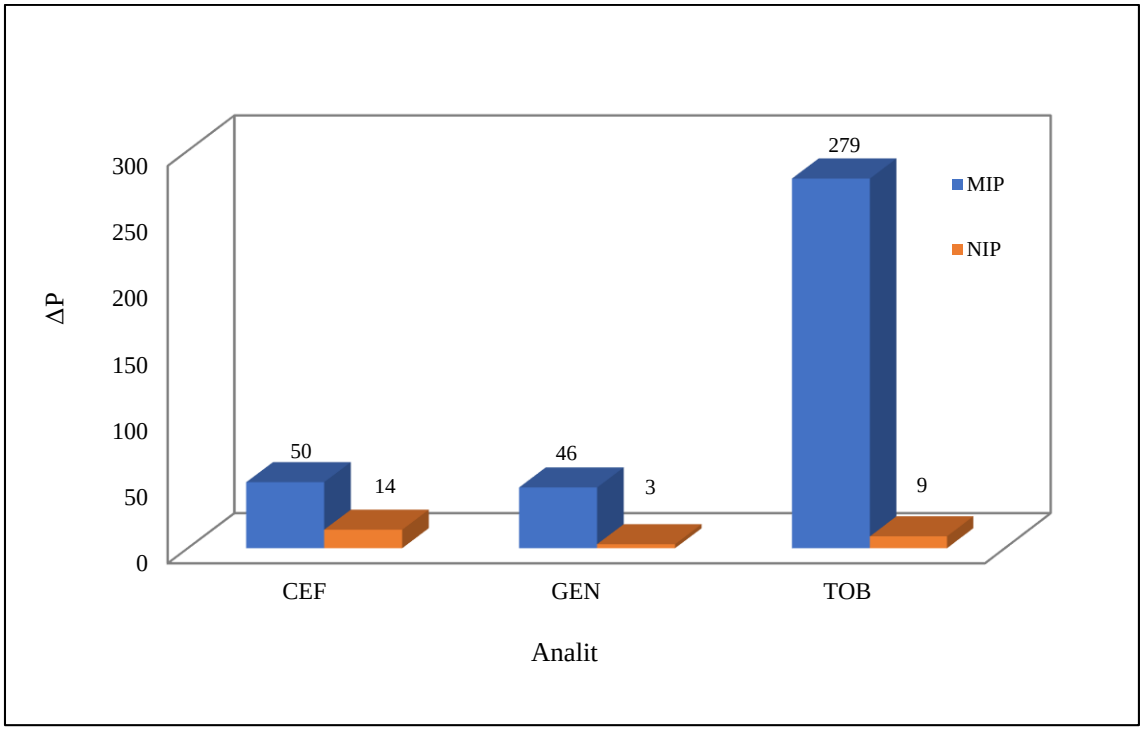
Şekil 4.13. TOB'a yeniden bağlanma çalışmalarında sürenin etkisi (PBS pH=7,00; TOB derişimi 0,25 µg/mL)



Şekil 4.14. TOB'a yeniden bağlanma çalışmalarında sürenin etkisi (DCE, TOB derişimi 0,25 µg/mL)

Geliştirilen yüzeyi TOB baskılanmış sensörün seçiciliğinin belirlenmesi

TOB baskılanmış ensörlerin baskılama seçiciliğini araştırmak için yapısal olarak analog olan GEN ve yapıca benzemeyen CEF çözeltilerine belirlenen uygun koşullar altında inkübasyon işlemi uygulanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.15'de verilmiştir.



Şekil 4.15. Hazırlanan IMIP ve INIP partiküllerin seçicilik çalışması (Sulu ortam pH=7,00 PBS TOB derişimi 1,50 µg/mL)

Bunun yanında; geliştirilen sensörün önerilen yöntemde, analiti tanıma davranışlarını belirlemek ve yeniden bağlanma özelliklerini incelemek için inkübasyon çalışması yapılmıştır. Baskılamanın başarısı, analitin hem MIP'e hemde NIP'e bağlanma ilgisi belirlenerek baskılama faktörü ile tespit edilmektedir. Baskılama faktörüne ait deneysel veriler Çizelge 4.9'da belirtilmiştir.

Çizelge 4.9. Tobramisin sensörü için baskılama faktörü

TOB Derişimi (µg/mL)	$(P0/P)_{IMIP}$	$(P0/P)_{INIP}$	Baskılama Faktörü (IF)
5,00	4,66	1,00	4,66
1,50	2,82	1,04	2,71

Baskılama faktörü (IF), $(P_0/P)_{MIP}/(P_0/P)_{NIP}$ eşitliği ile hesaplanmıştır. Yeniden bağlanma çalışması organik ortamda (DCE) ve fosfat tamponu ortamında (pH= 7,0) yürütülmüştür.

$$\text{Baskılama Faktörü (IF)} = (P_0/P)_{IMIP} / (P_0/P)_{INIP} \quad (4.1)$$

$$\text{Baskılama Faktörü (IF)} = (Ksv)_{IMIP} / (Ksv)_{INIP} \quad (4.2)$$

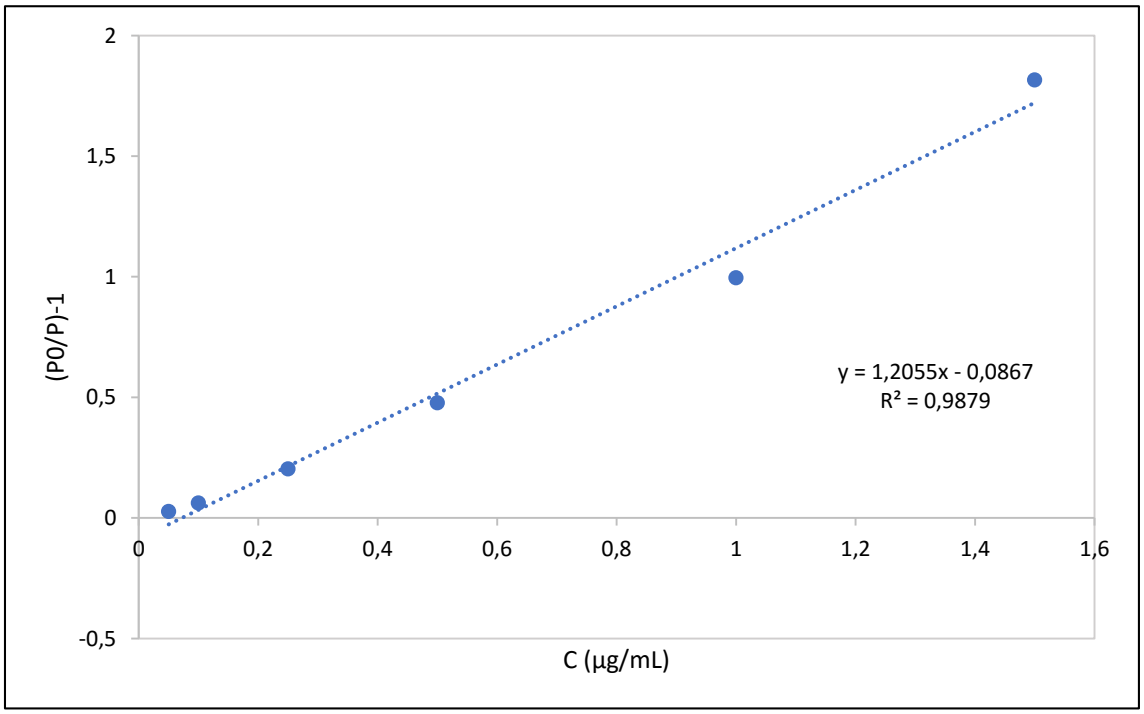
4.2. Analitik Performans Parametreleri

Yöntemin doğrusal aralığını tespit etmek için pH'ı 7,00 olan fosfat tamponu ortamında ve organik ortam olan DCE'da sırası ile 0,05-1,50 ve 0,01-5,00 µg/mL derişim aralıklarında TOB içeren süspansiyonlar ile kalibrasyon çalışması yapılmıştır. Yöntemin doğrusal aralığı belirlendikten sonra LOD ve LOQ değerleri sulu ve organik ortamda hesaplanmıştır. .Sonuçlar Çizelge 4.10'da, Şekil 4.16 ve 4.17'de sunulmuştur

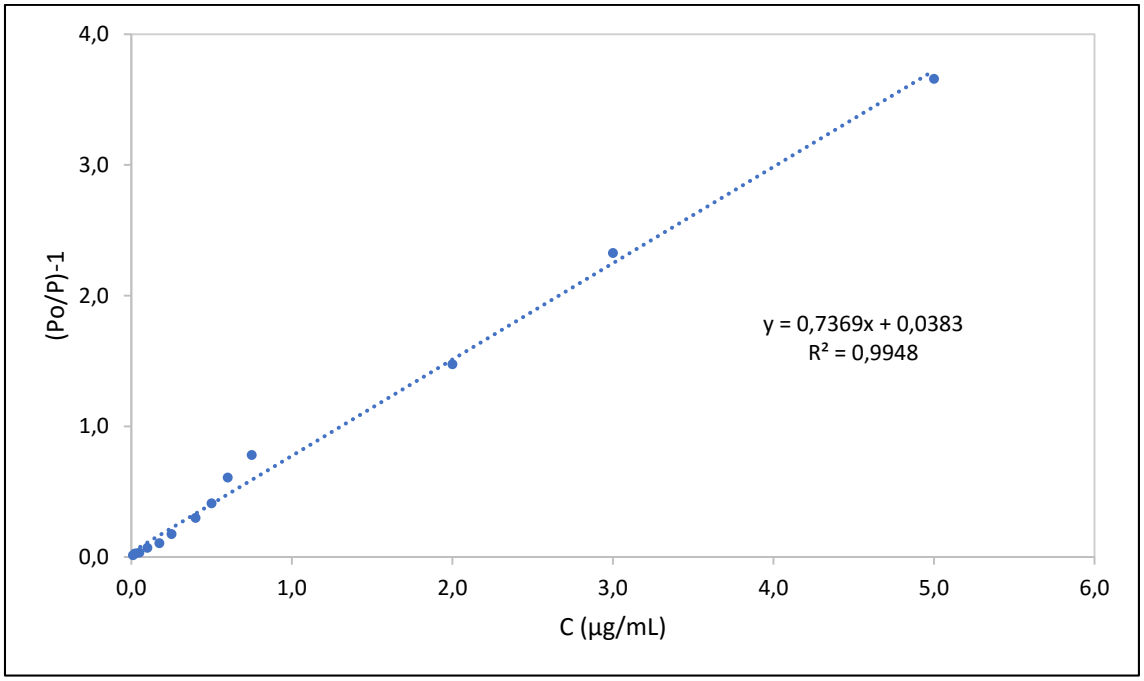
Çizelge 4.10. Tobramisinin organik ve sulu ortamdaki analitik performans çalışması

Doğrusal Aralık (µg/mL)	Çözücü Ortamı	Eğim (K_{SV})		Kesim Noktası		R^2	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
		IMIP	INIP	IMIP	INIP			
0,05-1,50	PBS (pH=7,0)	1,2055	-0,0068	-0,0867	0,0353	0,9879	0,0012	0,0034
0,01-5,00	DCE	0,7369	-0,0023	0,0383	0,0274	0,9948	0,0009	0,0027

(Stern-Volmer Eşitliğine göre hesaplandı, LOD LOQ hesabında en küçük derişim kullanıldı, n=10. LOD hesaplanırken (3,3 x SS) / eğim; LOQ hesaplanırken ise (10 x SS) / eğim hesabı kullanıldı).



Şekil 4.16. Stern-Volmer sulu ortam kalibrasyon doğrusu (pH= 7,00 PBS)



Şekil 4.17. Stern-Volmer organik ortam kalibrasyon doğrusu (DCE)

Süt ve serum numunelerinde, uygun pH değeri 7,00 olarak belirlendikten sonra, sensörün üç farklı derişimde TOB'a olan cevabı incelendi ve geri kazanım değerleri tespit edildi. Süt numunesindeki TOB tayini için geri kazanım çalışması Çizelge 4.11'de, gün içi ve günler arası çalışmalara ait sonuçlar ise Çizelge 4.12'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.11. Gün içi ve günler arası bağıl standart sapma değerleri (Stern Volmer)

TOB Derişimi (µg/mL)	Gün İçi (n=3)	Günler Arası (n=3)
	%RSD	%RSD
0,10	1,5153	1,8911
0,25	3,8967	1,9343
0,50	4,3974	5,0344

Çizelge 4.12. Süt matriksinde geri kazanım çalışması (Stern-Volmer)

TOB Derişimi (µg/mL)	Geri Kazanım (%) (*n* = 3)		RSD %	
	IMIP	INIP	IMIP	INIP
0,10	77,17	22,86	1,84	4,07
0,50	89,34	27,99	4,27	2,87
1,00	103,5	30,43	4,60	3,15

Geliştirilen yöntemin serum numunesinde tekrarlanabilirliği gün-içi ve günler-arası çalışmalar yapılarak tespit edildi. Buna ek olarak geri kazanım çalışmaları yapıldı. Sonuçlar Çizelge 4.13'te sunuldu.

Çizelge 4.13. Serum matriksinde analitik performans ve geri kazanım çalışması (Stern-Volmer kalibrasyon kulanılmıştır)

Eklenen Tobramisin (µg/mL)	Gün içi (RSD%, n = 4)	Günler arası (RSD%, *n* = 4)	Geri Kazanım (%) (*n* = 4)		RSD %	
			IMIP	INIP	IMIP	INIP
0,30	3,69	4,84	100,47	30,33	5,06	2,93
0,60	3,40	1,08	96,12	24,80	1,80	3,23
1,20	3,02	4,60	88,50	27,00	2,67	3,08

5. TARTIŞMA

Bu kısımda bulgular bölümünde sunulan deneysel veriler değerlendirildi.

5.1. Karakterizasyon ve Sentez Parametreleri Çalışmaları

Bu çalışmada, seçici IMIP:ZnS ve lüminesant Mn katkılanmış ZnS KN'lerin kombinasyonu ile TOB tayini için seçiciliği ve duyarlılığı arttırılmış oda sıcaklığında fosforesans yöntemine dayalı optik bir sensör geliştirilmiştir.

Sentez parametrelerinin miktarları MPTS modifiye edilmiş Mn:ZnS KN'lerin yüzeyinde baskılanacak polimerin kalınlığını doğrudan etkilemektedir. Bu kabuğun ince olması, hem analitin ekstraksiyonu hem de yeniden bağlanma çalışmasının yüksek verimli olması için çok önemlidir. Optimum miktarlar kullanılarak yapılan yüzey baskılama en uygun ekstraksiyon çözücüsü ile muamele edilip kalıp molekülün yapıdan uzaklaştırılması ve bu işlem gerçekleşirken analite seçici olan kavitelerin şekil, büyüklük, fonksiyonel gruplarının uzaysal yönlenimi gibi özelliklerini korumaları gerekmektedir. Analit yapıdan uzaklaştırıldığında, IMIP:ZnS ve INIP:ZnS'e ait oda sıcaklığı fosforesans sinyali neredeyse aynı emisyon değerine sahip olmalıdır.

Hazırlanan KN'lerin MPTS ile modifikasyonundan sonra APTES –fonksiyonel monomer- ve TEOS –çapraz bağlayıcı- ile yüzey baskılama işlemi uygulandı. Optimum miktardaki silika, KN'lerin yüzey modifikasyonu için uygun tanıma bölgeleri oluşturmak için oldukça ideal ve avantajlı bir seçenektir. Polimerik matrikste, analit ilâvesi IMIP:ZnS KN'lerde anlamlı bir fosforesans sinyal düşüşüne sebep olmaktadır. Çünkü yüzeydeki baskılanmış bölgeler analite seçicidir. Matriks ortamında baskılanmış bölgelere TOB yerleşecek ve emisyon şiddetini baskılayacaktır. Sensörün oda sıcaklığındaki fosforesans şiddeti artan TOB derişim ile azaltacaktır. Sensörün yüksek verimde cevap vermesi için Mn:ZnS sentezi yapıldıktan sonra optimum miktarda MPTS ile modifikasyon ve devamında uygun miktarlarda APTES, TEOS, TOB ile yüzey baskılama işlemi uygulanmıştır.

Öncelikle, KN'lere ait uyarma ve emisyon dalga boyları, spektroflorimetrede taranarak kaydedilmiştir. Şekil 4.1'e bakıldığında uyarma dalga boyunun 322 nm, emisyon dalga boyunun ise 592 nm olduğu gözlenmektedir. Fosforesans sinyal ölçümlerinde, emisyon

kaynağı ZnS içine doplanan Mn^{2+} iyonudur. Bu sayede Jablonski diyagramında, elektron triplet sistemden ışıma yapmaya daha uygun hale gelir ve Bölüm 2.10'da açıklandığı gibi Mn^{2+}'nin $^4T_1 \rightarrow {}^6A_1$'e geçişi söz konusudur ve fosforesans ışıması gerçekleşir. Mn:ZnS KN'ler sensörün çekirdek kısmını oluşturmaktadır. Önerilen yöntem için geliştirilen sensörün sentezi için yapının doğrulanması amacıyla FT-IR analizi gerçekleştirildi ve sonuçlar Şekil 4.2'de gösterildi.

KN'lerin FT-IR analizi için Şekil 4.2'ye göre, 615 cm^{-1} piki yapıdaki ZnS'nin varlığını kanıtlamaktadır. 800 cm^{-1} piki de ZnO gerilimini göstermektedir. 1000 – 1100 cm^{-1} piki KN'ye ait olan inorganik türlerden kaynaklıdır. 3200-3400 cm^{-1} civarında ortaya çıkan bantlar, hidroksil grubunun gerilme titreşimini temsil etmektedir. Bu yorumlara göre Mn:ZnS KN'lerin sentezinin başarılı bir şekilde gerçekleştiği görülmektedir.

IMIP/INIP:ZnS'leri sentezleyebilmek için KN'lerin MPTS ile modifikasyonu gerekmektedir. Bu sayede elde sol-jel metodu ile yapılacak yüzey baskılama yapılabilecek ve sensörün kabuk kısmı kararlı bir şekilde, TOB'a seçiciliği yüksek olarak sentezlenebilecektir. Farklı MPTS miktarları kullanılarak Mn:ZnS KN'lerin sentezi yapılmıştır. Bu sentezlerde Çizelge 4.1'e bakıldığında, 120,00 ve 240,00 µL MPTS ilâvesi ile sentezlenen partiküllerde çözelti polimerizasyonu görülmektedir. Elde edilen partiküller jel formuna dönüşmüştür. Jelleşme bu aşamada büyük bir problem olarak görülmektedir. Yüzey baskılama işlemi yüzeyde analite özgü seçici kaviteler oluşturmakta ve kütle aktarımı daha hızlı gerçekleştirme avantajlarına sahiptir. Bu avantaj hem sensörün yeniden bağlanma basamağında yüksek seçicilik ile sonuçlanmasına hem de ekstraksiyon işlemlerinde kalıp molekülün yapıdan uzaklaşmasına kolaylık sağlamaktadır. Çözelti polimerizasyonu problemi kalıp molekülün uzaklaştırılması zorlaştırmakta, sentezlenen partiküllerin bağlanma kapasitesini ve kütle aktarım hızını düşürmektedir, bağlanma kinetiği tamamen farklı özelliktedir. Jelleşme problemini çözmek için çözücü hacmini arttırmak ve sentez yapılırken karıştırma hızını daha yüksek değerde tutmak gibi çeşitli yollar izlenebilir. Bunun dışında polimerizasyon yöntemi olarak daha farklı bir yöntem seçilebilir ancak bu durumda da partiküller yığın (bulk) olarak elde edilecektir [261]. Yüzey baskılama yönteminden ve karakterize edilen partiküllerin çalışma prensibini değiştirmeden elde edilen sonuçlara bakıldığında, 69,4 µL MPTS ile hazırlanan IMIP-INIP partiküllerinin baskılama sonrası sinyalleri arasındaki farkın en fazla olduğu görülmektedir. Ekstraksiyon işlemi sonrasında ise yine yine aynı partiküllere ait fosforesans sinyallerinin neredeyse eşit olduğu

görülmektedir. Çizelge 4.2'ye bakıldığında, yüzey baskılama işleminde kullanılan farklı miktardaki MPTS'ler ile hazırlanan IMIP ve INIP'in yeniden bağlanma çalışma sonuçları görülmektedir. Bağlanma ortamındaki analitin, sentezlenen IMIP partikülleri yüzeyinde kendine özgü kavitelere yerleşmesi beklenmektedir. INIP için TOB'a özgü bir bölge bulunmadığından bağlanma öncesi ve bağlanma sonrası sinyallerde büyük bir değişim beklenmemektedir. Fosforesans emisyon sinyalleri karşılaştırıldığında 69,40 µL MPTS kullanılarak hazırlanan IMIP ve INIP için beklenen durumun gerçekleştiği görülmektedir.IMIP'ın en yüksek sinyal düşüşü ve INIP'ın en az sinyal düşüşünün bu partiküller için olduğu sonucuna varılmıştır. Bundan dolayı, partiküllerin sentezinde kullanılacak en uygun MPTS miktarının 69,40 µL olması gerektiğine karar verilmiştir.

Şekil 4.3'te MPTS modifiye edilmiş Mn:ZnS KN'lerin şekil ve boyut dağılımı TEM görüntüsü ile gösterilmiştir. Partiküller açık bir şekilde agregasyona uğramamış ve küreseldir. Boyutları yaklaşık 25-30 nm çapındadır. MPTS modifiye edilmiş KN partiküllerin FTIR analizi Şekil 4.4'te verilmiştir. Bu sonuca göre KN'ler ile karşılaştıldığında, yaklaşık 1643 cm^{-1}, 1147 cm^{-1} ve 1090 $cm^{-1'}$ deki bantlar, Mn katkılı ZnS KN'ler üzerinde Si-O-Si'nun karakteristik titreşim bantlarına ait olduğu gözlenmektedir. Yukarıda belirtilen piklerin varlığı, MPTS'nin Mn:ZnS KN'lerin yüzeyine başarılı bir şekilde modifiye edildiği kanıtlanmıştır. XPS ölçümleri, sentezlenen partiküllerin elementel kompozisyonunun yanı sıra MPTS modifiye edilmiş Mn:ZnS KN'lerin yüzeyi üzerindeki kaplamanın başarısını kanıtlamak için yapılmıştır. Şekil 4.5 göz önüne alındığında atomik yüzde değerleri Zn için %24; O için %22,9; S için %17,1; Si için %6,2; Mn için %0,6 değerleri MPTS'nin, Mn:ZnS KN'lerin yüzeyi üzerinde modifiye edildiğini kanıtlamaktadır. Bunu desteklemek için MPTS modifiye edilmiş Mn:ZnS KN'lerin Şekil 4.4'teki FTIR sonuçlarına bakacak olursak Si-O-Si titreşiminin varlığı gözlenmiş ve bu da XPS'in %6,2'lik bir Si elementi varlığı ile kanıtlanmıştır. KN'lerin yüzeyine MPTS modifikasyonu böylece kanıtlanmış olmaktadır.

Devamında, en uygun APTES miktarı araştırılmıştır. Bunun için MPTS ile modifiye edilmiş KN yüzeyine 18,75; 25,00; 31,25 µL olarak üç farklı miktarda APTES ilâve edilerek IMIP:ZnS ve INIP:ZnS partikülleri sentezlenmiştir. Çizelge 4.3'e, baskılama sonrası ve ekstraksiyon sonrası oda sıcaklığı fosforesans emisyon şiddetlerine bakıldığında kullanılan APTES hacmi arttıkça IMIP ve INIP arasındaki emisyon şiddeti farkının açıldığı gözlenmektedir. IMIP ve INIP sinyallerinin aynı kalmaması baskılanmanın başarılı bir

şekilde gerçekleştiğinin kanıtıdır. Yani kabukta bulunan TOB, çekirdekteki Mn:ZnS KN tarafından yayılan fosforesans şiddetini düşürmektedir. Baskılama işleminin gerçekleştiğinin kanıtı olarak da yorumlanabilir. Ekstraksiyon sonrası fosforesans sinyalleri incelendiğinde ise, yüzey baskılama sonucu kabukta bulunan TOB'un yapıdan uzaklaştığı IMIP ve INIP için sinyallerin birbirine yaklaşması ile yorumlanır. IMIP'in yüzeyinde TOB var iken Mn:ZnS KN'lerin ışıması göreceli olarak engellenmiştir. Ancak yapıdan uzaklaştıktan yani ekstraksiyon işlemi başarılı bir şekilde gerçekleştikten sonra, ışımayı bloke edecek analit yüzeyde kalmadığından IMIP'in sinyali INIP'e yaklaşmıştır. Bu da sensörün analite seçiciliği ve duyarlılığını arttıran bir parametredir. Farklı miktarlardaki APTES'in yeniden bağlanma çalışmalarında fosforesans sinyali üzerindeki etkisi incelendiğinde, IMIP göz önüne alınarak yeniden bağlanma çalışması öncesi ve sonrası emisyon şiddetleri üzerindeki düşüşün Çizelge 4.4 'te en fazla 25 µL APTES hazırlanarak elde edilen partiküllerde olduğu görülmektedir. Bu durum APTES'teki amino grupları ile TOB'daki hidroksil gruplarının yüzeyde polimerizasyon öncesi hidrojen bağı ile en yüksek verimde etkileştiğinin bir göstergesidir ve TOB bağlanınca IMIP sensör için sinyal düşüşünün %61 olduğu hesaplanmıştır. Seçici olmayan çalışmaları kontrol etmek amacı ile hazırlanan INIP'ta ise, yeniden bağlanma öncesi ve sonrası çalışmalar göz önüne alınarak fosforesans şiddetindeki düşüşün %7,2 olduğu gözlenmiştir. IMIP ve INIP arasındaki sinyal düşüş farkı en yüksek 25 µL APTES kullanılarak hazırlanan partiküllerde olduğu sonucuna varılmıştır. Sentezde kullanılacak optimum APTES miktarı 25 µL olarak belirlenmiştir.

Ön polimerizasyon kompleksi yüzeyde maksimum verimle etkileşirken, partiküllerin daha sağlam küresel bir yapı halini alması için TEOS miktarı araştırıldı. TEOS, yüzey baskılama işleminde APTES ile sol jel yöntemine göre reaksiyona girip inorganik kabuk yapısının oluşumuna yardımcı olmaktadır. Bunun için 50,00; 75,00; 100,00; 125,00 ve 150,00 µL olarak beş farklı miktarda TEOS ilâve edilerek yüzeyi TOB baskılanmış MIP ve NIP partikülleri sentezlenmiştir. Çizelge 4.5'te, baskılama sırasında 100,00 µL'den daha fazla miktar TEOS kullanılması çözelti polimerizasyonuna sebep olmaktadır. Oluşan yüzey baskılanmış polimerin kabuğu daha kalın olarak ve jel formunda yığın (bulk) polimerler elde edilmektedir. Bağlanma bölgeleri yüzeyde veya yüzeye yakın yerlerde elde edilemez bunun sonucu olarak analitin kaviteye bağlanması yani kütle transfer hızı daha yavaş olacaktır. Kalın kabuk ve agregasyon problemleri MIP ve NIP'in seçiciliği arasında bir fark yaratmamaktadır. Ancak Çizelge 4.6'ya bakıldığında, 50,00; 75,00 ve 100,00 µL TEOS'un yeniden bağlanma çalışmalarında fosforesans sinyali üzerindeki etkisi incelendiğinde, IMIP

için maksimum yüzde düşüş değeri %68,00 olarak hesaplanmıştır. Ancak, buna karşılık gelen INIP için ise bu değer %7,20'den %9,50'e çıkmıştır. INIP'taki bu sinyal artışı sebebi ile 75,00 µL TEOS seçilmemiştir. Baskılama, ekstraksiyon sonrası sinyaller ve yeniden bağlanma sonrası sensörün yüzde fosforesans sinyal düşüş miktarları göz önüne alındığında 100, 00 µL TEOS'un daha yüksek seçicilik göstererek TOB ile etkileştiği sonucuna varılmıştır. IMIP ve INIP fosforesans sinyalleri arasındaki fark TOB için hazırlanan sensörün seçiciliğinin bir ölçütüdür ve optimum TEOS miktarı seçicilik ve tanıma bölgelerinin daha fazla olması nedeni ile 100,00 µL olarak belirlenmiştir.

Farklı miktarlarda analit (1,125 mg, 1,50 mg ve 1,875 mg) kullanılarak hazırlanan TOB baskılanmış fosforesans sensörü ve TOB baskılanmamış fosforesans sensörü fosforesans sinyalleri incelendiğinde INIP-ZnS'nin seçici olmayan türlere cevabının daha düşük olduğu gözlenmiştir. Çizelge 4.7'de ekstraksiyon işlemi sonrasında ölçülen fosforesans emisyon sinyallerinin yakın (INIP-ZnS 204, IMIP-ZnS 203) oluşu yapıdan tamamen TOB'in uzaklaştığını göstermektedir. Baskılama sonrası, fosforesans emisyon sinyalleri arasındaki fark 1,50 mg TOB kullanılarak yapılan sentez için en fazladır. Bu farkın sebebi moleküler baskılamanın gerçekleşmiş olmasıdır. Fosforesans sensörün kabuğundaki baskılanmış TOB, sensörün verdiği sinyali baskılar ve emisyon şiddetinin azalmasına sebep olur. Çizelge 4.8'de, yapılan yeniden bağlanma çalışması sonuçlarına göre, baskılama aşamasında seçilen optimum TOB derişimi 1,50 mg olarak saptanmıştır. TOB'un, IMIP-ZnS'nin seçici kavitelerine -hem fonksiyonel grup, hem uzaydaki yönleniş, hem de boyut bakımından- yüksek ilgi ile yerleşebilmesi seçici olarak daha fazla sinyal düşüşüne sebep olmuştur (IMIP-ZnS %68,60, INIP-ZnS %8,40).

Şekil 4.6'da yüzeyi TOB baskılanmış MPTS modifiye edilmiş Mn:ZnS KN'lerin şekil ve boyut dağılımı TEM ile incelenmiştir. Partikül çapı 50 nm civarında, homojen dağılmış bir küre olarak tespit edilmiştir. MPTS modifiye edilmiş Mn:ZnS KN'lerin çapının IMIP partikülünden daha düşüktür. Bu sonuca göre TOB, MPTS modifiye edilmiş KN'lerin üzerine başarıyla bir kabuk şeklinde baskılandığı morfolojik olarak kanıtlanmıştır.

Şekil 4.7'de IMIP partiküllerine ait XPS spektrumuna bakıdığında atomik yüzde değerleri O için %47,9; C için %24,4; Si için %20,8; N için %6 ve S için %0,9 olarak belirtilmiştir. TOB'un yapısında bulunan azot, oksijen ve karbonların değerlerindeki artış yüzeyin TOB ile baskılandığını göstermektedir. Şekil 4.8'e bakıldığında INIP için XPS spektrumu

görülmektedir. Buna göre, O için %50,4; C için %24,5; Si için %19,9 ve N için %5,2 yoğunluğu bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, yüzey polimerizasyonunun gerçekleştiği görülmektedir. N yoğunluklarına bakıldığında TOB'un INIP yapısında olmadığı açığa çıkmaktadır.

Çizelge 5.1. KN yüzeyi modifikasyonu ve baskılama işlemi için optimum sensör bileşen miktarları

Sensör	MPTS	APTES	TEOS	TOB
IMIP:ZnS	69,40 µL	25 µL	100 µL	1,50 mg
INIP:ZnS	69,40 µL	25 µL	100 µL	----------

IMIP:ZnS ve INIP:ZnS sensörün kabuk kısmı inorganik polimerden oluşmaktadır. İnorganik polimer sol-jel yöntemine göre sentezlenmiştir. Bu sayede elde edilen kabuğun kalınlığı kontrol edilebilmekte ve sensörlerin boyutları nanometre ile mikrometre arasında değişebilmektedir. Partiküller agrege olmadan sentezlenebilir ve çoğunlukla homojendir. Bu yöntemde APTES, silika partikülleri ile kovalent olarak etkileşecek bir fonksiyonel monomer olarak davranır. Polimerizasyon işleminde TEOS çapraz bağlayıcı olarak davranır. Hidroksil grupları, analit ile inorganik kabuk arasında hidrojen bağı etkileşimini arttırmaktadır. Çizelge 5.1'deki optimum miktarlar bu yönteme göre kullanıldığında TOB'a özgü olan baskılama bölgeleri yüksek seçicilik ile oluşmuştur.

5.1.1. Ekstraksiyon

Yüzeyi TOB baskılanmış MPTS modifiye edilmiş Mn katkılı ZnS KN'lerin analite seçimli hale gelebilmesi için hem IMIP hem de INIP için DMSO:EtOH:H_2O (5:3:2 h/h/h) çözücüsü ile ekstraksiyon işlemi 4 saat boyunca yapıldı Baskılama sonrası, Çizelge 4.7'deki sinyallere bakıldığında IMIP ve INIP için fosforesans sinyallerinin sırasıyla 222, 91 olduğu gözlenmektedir. Ekstraksiyon sonrası yapılan fosforesans ölçümlerinde ise yine IMIP ve INIP için sinyaller sırasıyla 204 ve 203 olarak kaydedilmiştir.

Bu sonuçlara göre, yüzeyde baskılanmış olan TOB'un yüzeyden ekstraksiyonu oldukça verimli bir şekilde, yüzeyde bir aşınma meydana gelmeden gerçekleştirilmiştir. Baskılama sonrasında, IMIP ve INIP arasındaki sinyal farkı göz önüne alındığında baskılamanın

başarılı bir şekilde gerçekleştiğini söylemek mümkündür. MIP için, Mn^{+2} katkılı ZnS fosforesans şiddetinin, baskılama sonrası dramatik bir şekilde düşüşü de baskılama işleminin kanıtlarından biridir. Bunu destekleyen bir diğer işlem de ekstraksiyondur. Yapıdaki TOB'un uzaklaşması sonrasında IMIP ve INIP sinyallerinin birbirine yaklaşmaları ekstraksiyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.

5.1.2. pH çalışması

pH değerinin, IMIP:ZnS ve INIP:ZnS sensör partikülleri için oda sıcaklığında fosforesans şiddetleri üzerinde oldukça önemli bir etkisi vardır. Bilindiği gibi pH değeri 4,00'ün altında olan ortamlarda KN'ler kararsızdır ve H_2S kokusu yayarlar. pH değeri 11'den fazla ise oda sıcaklığı fosforesans şiddeti aniden düşer. Bunun sebebi silika kabuğun yüksek pH değerlerinde iyonlaşmasıdır. İyonlaşma sonrası OH^- yüzeye nükleofilik atakta bulunacak ve yüzeydeki yapı zarar görecektir. Tüm bunlar göz önüne alındığında pH'ın 5,00; 7,00 ve 8;00 olarak hazırlandığı değerlerde, TOB için hazırlanan oda sıcaklığındaki fosforesans ölçümüne dayalı sensöre olan etkisi incelendi. İnkübasyon çalışmaları 5 saat boyunca gerçekleştirildi. Şekil 4.11'e bakıldığında R^2 değerlerine bakarak ilgili derişimlerdeki sinyallerin pH=5,00 ve pH=7,00 değerlerinde doğrusal olduğu görülmektedir. Bu pH değerlerinde eğimlere bakıldığında pH=7,00 değerindeki sonuçların daha duyarlı olduğu sonucuna varılmaktadır. Bu nedenle optimum pH PBS tamponunda pH=7,00 olarak seçilmiştir.

5.1.3. Kararlılık

IMIP:ZnS ve INIP:ZnS partiküllerinin kararlılıkları hem sulu ortamda pH=7,00 hem de organik ortamda çalışılmıştır. Şekil 4.12'de, organik ortam için 23 gün ikişer ölçüm, sulu ortam için 25 gün ikişer ölçüm olarak deneyler yapılmıştır. Aynı derişimdeki süspansiyondan kaydedilen fosforesans ölçümlerine göre önemli bir farka rastlanmamıştır. Bu sonuca göre sensörün oldukça kararlı olduğu söylenebilir.

Fosforesans işaretleyicilerden boyalar ile karşılaştırıldıığnda KN'lerin uyarma dalga boyu aralığı geniştir. Emisyonlarında da Raman ve Rayleigh saçılmalarının olasılığı azalmaktadır. Emisyon pikleri keskin ve dar bantlar şeklindedir. Absorpsiyon ve emisyon dalga boylarını,

KN'lerin boyutu ile değiştirmek mümkündür. Sensör sistemlerindeki kararlılık düzeyini arttırmaktadırlar.

Yukarıda bahsedilen özelliklerinden ve tezdeki deneysel çalışmalara dayanarak, KN'lerin boyalara göre tercih sebebi olması açıkça görülmektedir.

5.1.4. Seçicilik

TOB, MPTS modifiye edilmiş Mn:ZnS KN sensörü fosforesans sinyalini, derişim ile doğrusal olarak önemli derecede azaltma eğilimi göstermiştir. Bu sinyal düşüşünün TOB'a olan seçiciliğini test etmek için yapısal analoğu olan GEN ve yapıca benzemeyen CEF molekülleri seçilmiş ve inkübasyon işlemi aynı şartlar altında yapılmıştır. Po analit ilâvelerinden olmadan, P ise analit varlığında inkübasyon işlemi sonrasındaki ölçümleri temsil etmektedir. ΔP ise bu sinyallerin arasındaki farktır. Şekil 4.15'te, sensörün fosforesans sinyallerine bakıldığında sırasıyla, CEF için MIP ve NIP sinyal değişimleri 50 ve 14, GEN için MIP ve NIP sinyal değişimleri 46 ve 3, TOB için MIP ve NIP sinyal değişimleri 279 ve 9 olarak hesaplanmıştır. GEN ve TOB yapısal analog olmalarına rağmen, GEN kabuk bölgesinde TOB'a özgü bölgeler ile etkileşememiş ve sensörün tanıma bölgeleri yalnızca TOB'a cevap vermiştir. Yüzeyi baskılanmış bölgelerin, hem şekil hem fonksiyonel grup hem de uzaysal yönlenimleri dikkate alındığında, TOB için seçici tanıma bölgelerine sahip olduğu açıktır ve yüzey baskılamanın seçicilik özelliğini ön plâna çıkarmıştır. Sinyal düşüşü, yalnızca TOB için seçimli bağlanmanın gerçekleştiği, MIP değerinde en fazla olarak bulunmuştur. Kontrol polimer sensörü yani NIP için ise düşük bir sinyal düşüşü gözlenmiştir. Bundan dolayı, analitin bulunduğu ortamda tanıma bölgelerinin yalnızca analite özgü olduğu sinyal düşüşü ile kanıtlanmaktadır. Sensörün TOB için yüksek ilgi ile seçici olduğu sonucuna varılmıştır.

<u>İnkübasyon çalışma koşulları optimizasyonu.</u>

Ekstraksiyon sonrası fosforesans sinyallerini ölçmek ve inkübasyon ortamında en iyi bağlanma ortamını seçebilmek için en uygun çözücü araştırılmıştır. Şekil 4.9'a göre, farklı organik çözücüler kullanılmıitır. Yapılan inkübasyon işlemeri sonunda IMIP:ZnS sensörüne ait en yüksek sinyal düşüşü ve INIP:ZnS sensöründeki en az düşüş yüzdesi DCE ortamında

yapılan inkübasyon sonucu elde edilmiş ve %61 %7,2 olarak kaydedilmiştir. Bu nedenle organik ortamda yapılacak inkübasyon işlemlerinde orgaik çözücü olarak DCE seçilmiştir.

İnkübasyon ortamındaki IMIP:ZnS ve INIP:ZnS miktarı seçimi çok dikkatli bir şekilde yapılmalıdır. Optimum miktarın tespiti için farklı miktarlarda partiküller kullanılarak inkübasyon çalışmaları sürdürülmüştür. Şekil 4.10'daki görüldüğü gibi, 0,3125; 0,156; 0,078 mg/mL derişiminde partiküller kullanılmıştır. Yapılan deneysel çalışmalarda hem sulu hem organik ortamda TOB'a olan seçiciliğin en yüksek olarak gözlendiği 0,3125 mg/mL IMIP:ZnS ve INIP:ZnS partikülün bulunduğu deneylerde gözlenmiştir

TOB'un en yüksek verimle tayin edilebilmesi için, sensörün inkübasyon süresi optimize edilmiştir. Şekil 4.13 ve 4.14 için her iki ortama bakıldığında IMIP'lerin 4. saat itibariyle plato bölgesine girdiği gözlenmektedir. 4.saat sonrasında sinyal değişimi anlamlı bir şekilde artmamıştır. INIP ile verilen fosforesans sinyal farkı değişken olup süre seçiminin 4 saat olarak belirlenmesi uygun görülmüştür. INIP için, fosforesans şiddetindeki değişim yeniden bağlanma sonrası anlamlı büyüklükte değildir. Bunun nedeni, INIP'ın TOB'a seçici bölgelerinin olmayışından ve yalnızca seçici olmayan türlere cevap vermesinden dolayıdır.

Genellikle, IMIP-ZnS ve INIP-ZnS benzer ağ örgüsüne sahip olurlar, aralarındaki fark analit ve ekstraksiyon sonrası analite özgü oluşmuş tanıma bölgeleridir. Sinyal düşüşünün MIP'te daha fazla olması, yüzeyi TOB baskılanmış MPTS modifiye edilmiş Mn:ZnS fosforesans sensörünün analite seçici kavitelerinin olduğunu desteklemektedir. Bu da, optimum inkübasyon zamanı kullanılarak organik ortamda yeniden bağlanma işlemi gerçekleştirilerek incelenmiştir. Yüksek bir baskılama faktörü ile deneysel olarak kanıtlanmıştır. Baskılama faktörü (IF), (P0/P)MIP / (P0/P)NIP eşitliği (Eşitlik 4.1) ile hesaplanmıştır. Çizelge 4.9'da, yeniden bağlanma çalışması organik ortamda (DCE) ve fosfat tamponunda (pH= 7,00) yürütülmüştür. MIP'ın NIP'e göre; DCE için 4,66, fosfat tamponu için 2,71 kat daha seçici olduğu sonucuna varılmıştır. Deneyler üç paralel halde çalışılarak sonuçların tekrarlanabilirliğine dikkat edilmiştir. Bunun yanında IMIP:ZnS ve INIP:ZnS sensörleri için uygulamalar Stern-Volmer kalibrasyonu ile yapılmıştır. Çizelge 4.11'de hem IMIP hem de INIP için Ksv değerleri elde edilmiştir. Eşitlik 4.2 kullanılarak sensörlerin Ksv oranları alındığında bulunan IF değerleri fosfat tamponu ve DCE için sırasıyla; 177 ve 320'dir. Bulunan IF değerleri tartışıldığında, yöntem için doğru bir değeri temsil etmediği sonucuna

varılmıştır. Bu nedenle moleküler baskılama çalışmalarında sıkça kullanılan eşitlik 1'e göre hesaplamalar yapılmış ve IF değerinin sulu ve organik ortamdaki değerleri hesaplanmıştır.

5.2. Sensörün Analitik Performans Değerlendirmesi

Geliştirilen yöntemde, hem pH=7,00 fosfat tamponu hem de organik ortam olarak seçilen DCE ortamında kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Doğrusal aralıklarının belirlenmesi için, TOB'un sensör ile etkileştirildikten sonra gözlenen sinyaller grafiğe geçirilmiştir. Fosfat tamponu pH= 7,00 ortamında doğrusal aralık 0,05 – 1,50 µg/mL olarak; organik ortamda ise doğrusal aralığın 0,01 – 5,00 µg/mL arasında olduğu bulunmuştur. Şekil 4.16 ve Şekil 4.17'de sırasıyla, sulu ve organik ortam için sırasıyla tanımlayıcılık katsayıları 0,9879 ve 0,9948 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler yöntemin doğrusallığını göstermektedir. TOB derişimi arttıkça fosforesans sinyallerinde doğrusal olarak bir düşüş gözlenmiştir. Elde edilen LOD ve LOQ değerleri sulu ortamda pH= 7,00 fosfat tamponunda 0,0012 ve 0,0034 µg/mL'dir. Bu veriler, geliştirilen sensörün oda sıcaklığında fosforesans yöntemi kullanılarak teşhis ve tayin sınırlarının farklı ortamlardan düşük derişimlerdeki TOB'a cevap verebileceğini göstermektedir. Standart dozlamada, TOB için teröpatik derişim aralığı 2-10 µg/mL olarak bilinmektedir. Bu bilgi ışığında sensörün teşhis sınırı ve TOB'un fosfat tamponundaki derişim aralığı incelendiğinde, yüksek duyarlılıkta ve seçicilikte plazmada TOB tayini gerçekleştirilebilecektir. Önerilen yöntemin analitik verileri Çizelge 4.10'da sunulmuştur.

Hesaplamalar Stern-Volmer kalibrasyonu ile yapılmıştır. Kalibrasyon için $(P_0/P)= 1+K_{SV}Cq$ denklemi kullanılmıştır. Burada P_0 ve P, sensör için sırasıyla analit yokluğunda ve TOB ile etkileşim sonrasında, inkübasyon işlemi sonucu elde edilen sinyalleri temsil etmektedir. Cq analit konsantrasyonu, Ksv sönümlenme sabitidir. MIP için bulunan Ksv değeri 1,205 olarak hesaplanmıştır. NIP'e göre daha yüksek bir değerdedir. Bu da yüzeyi baskılanmış MPTS modifiye edilmiş Mn katkılı ZnS KN'ler ile yüksek ilgide etkileştiğini göstermektedir.

Oda sıcaklığında fosforesans yöntemi özellikle matriks ortamından kaynaklanacak olan zemin gürültüsünü, Jablonski diyagramına göre daha yüksek dalgaboyunda bir ışıma yapıyor olduğu için elimine etmektedir. Bu da biyolojik örneklerde çok önemli bir avantaj sağlamaktadır. Bunun yanında, yöntemin dikkat çekicici özelliği olarak uzun süren ön işlemlerin yapılmasına gerek duyulmaması gösterilir. KN'lerin oda sıcaklığı floresans

özelliğinin analitik uygulamaları ile ilgili araştırmalar henüz başlangıç aşamasında ve göreceli olarak az sayıda olmasına ve floresans özelliği temeline dayanan çalışmalar kadar yaygın olmamasına rağmen, KN'lerin oda sıcaklığında fosforesans özelliği artan ivme ile ilgi çekmektedir. Yukarıdaki avantajlar nedeniyle yakın gelecekte geniş analitik uygulamaları etkili bir şekilde artacaktır. Oda sıcaklığı fosforesansın, özellikle serum matriksinde floresansa üstünlüğüne değinecek olunursa 500 nm - 600 nm arası FAD emisyonları bertaraf edilmektedir. Fosforesans sisteminin daha yüksek dalgaboylarında emisyon özelliğine sahip olması, görüntüleme sistemlerinde de avantaj sağlamaktadır. Beyinde yapılan görüntülemelerde, fosforesansın matriks ortamında geri plan gürültüsüne maruz kalmaması sebebiyle saçılma olmadan, ışığın daha derine inmesine, daha etkili bir şekilde hücre ile etkileşmesine neden olur ve girişimden bağımsız sinyaller kaydedilir. Işık madde yüksek verimde etkileşerek daha güvenilir cevaplar verir.

Bu sistem yüzey baskılama ile kombinasyon yapılarak sensör oluşturulduğunda ise, moleküler baskılama işleminin avantajlarından da yararlanılmaktadır. Sensör sisteminde hızlı bir kütle transferi gerçekleşmektedir, sistem daha seçici bir hal almaktadır. Kontrol partikülü olan NIP ile seçici olmayan türler tespit edilir ve analite özgü güvenilir bir sensör oluşturulabilir.

5.2.1. Süt matriksinde sensörün uygulanması

Yukarıda bahsedilen avantajlı durumlar ışığında süt için öncelikle bir çöktürme işlemi uygulanmıştır sonrasında vakumlu süzme sisteminde bir süzme işlemi yapılmıştır. İnkübasyon işlemlerinin devamında ölçümler yapılmıştır. Analitik performans çalışmalarına bakıldığında, TOB'un oda sıcaklığında fosforesans yöntemi ile sentezlenen sensör için gün içi ve günler arası çalışmaları 0,10 µg/mL, 0,25 µg/mL ve 0,50 µg/mL derişiminde üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Gün içi çalışmalarda hesaplanan bağıl standart sapma değerleri %1,50 ile %4,4 arasında hesaplanmıştır. Gün-içi kesinliğin elde edilen düşük bağıl standart sapma değerleri yöntemin gün-içi kesinliğinin yüksek olduğunu göstermektedir. Günler arası çalışmalarda yine aynı derişimler kullanılmıştır ve bağıl hata değerleri %1,90 ile %5,00 arasında bulunmuştur. Süt numunesinde çalışmaların tekrarlanabilirliği gün içi ve günler arası deneyler ile araştırılmıştır. Çizelge 4.11'de belirtilen ve yukarıda bahsedilen sonuçlar değerlendirildiğinde, düşük bağıl standart sapma değerleri nedeniyle yöntemin hem gün içi hem de günler arası kesinliğinin oldukça yüksek olduğu görülmektedir.

Sensör uygulamasının süt matriksinde oda sıcaklığında fosforesans yöntemi ile geri kazanım çalışmaları gerçekleştirildi ve sonuçlar Çizelge 4.12'de sunuldu. IMIP partikülleri için geri kazanım değerleri % 77,17 – 103,50 arasında değiştiği bulunmuştur. INIP için ise bu aralığın % 22,86 – 30,43 arasında olduğu hesaplanmıştır. IMIP sensörü ile elde edilen geri kazanım yüzdelerinin INIP ile elde edilenlere göre daha yüksek olması, TOB'un başarılı bir şekilde baskılandığını ve sensörün seçici olarak yalnızca analite bağlandığını göstermektedir. Düşük bağıl standart sapma verileri elde edilmiştir, bu da matriks etki olmadan TOB tayininin başarıyla yapılacağını göstermektedir. Ölçüm yönteminin de avantajı sayesinde girişimlerin olabileceği bir matrikste TOB tayini başarı ile gerçekleştirilmiştir. Oda sıcaklığında fosforesans yönteminin girişimleri bertaraf ettiği açıktır. Bu da yüzeyi baskılanmış MPTS modifiye edilmiş Mn katkılı ZnS partiküllerinin, TOB'a seçici olarak süt örneğinde cevap verebileceğinin mümkün olduğunu kanıtlamıştır.

5.2.2. Serum matriksinde sensörün uygulanması

Serum numunesinde hazırlanan sensör geliştirilen yöntem ile uygulandı ve sonuçlar Çizelge 4.13'te gösterildi. Gün içi çalışmalar için hesaplanan bağıl standart sapma değerleri % 3,00 – 3,70 arasında bulunmuştur. Günler arası çalışmalarda ise bağıl standart sapma hesapları yapılmış ve % 1,08 – 4,84 arasında bulunmuştur. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde, düşük bulunan bağıl standart sağma değerlerinden dolayı yöntem, serum matriksi için hem gün içi hem de günler arası kesinliğinin yüksek olduğunu belirtmektedir.

Geliştirilen sensörün, önerilen yöntem ile geri kazanım çalışmaları yapıldı ve sonuçlar Çizelge 4.13'te sunuldu. IMIP:ZnS sensörü için geri kazanım yüzdeleri % 88,50 – 100,47 arasında INIP:ZnS için ise %24,80 – 30,33 değerleri arasında hesaplandı. Yine benzer şekilde IMIP sensörünün geri kazanım yüzdelerinin INIP'e göre daha yüksek olması yüzeye TOB'un başarılı şekilde baskılandığının ve yalnızca analite bağlandığını göstermektedir. INIP:ZnS seçici olmayan türler için bir kontrol sensörü olarak işlev görmüştür. Özellikle serum matriksi için, sütte yapılan herhangi bir ön işleme gerek duymadan direk sensör sistemi ile etkileştirilip önerilen yöntem ile girişime açık bir ortamda TOB tayini, yüksek geri kazanım ve düşük bağıl standart sapma değerleriyle oldukça başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 5.2'de farklı yöntemler ile TOB tayini yapılmıştır. Yapılan çalışmalara göre, doktora tezinde elde edilen LOD ve lineer aralık derişimleri literatür ile uyum göstermektedir [262-266]. Ayrıca yapılan kolorimetrik çalışma süt ve süt ürünlerinde TOB tayini için geliştirilmiştir. TOB'un süt ve süt ürünlerindeki tayini oldukça önem taşımaktadır. Antibiyotiklerin tamamen metabolize olmaması veya vücuttan tamamen atılmamasına bağlı olarak, hayvanların doku ve organları ile bunlardan elde edilen hayvansal gıdalarda antibiyotik kalıntısı bulunabilmektedir. Yine süt ve süt ürünlerini inceleyen çalışmada TOB tayini için camsı karbon elektrot sensörü yapılmıştır [266]. Çalışmada MIP, ince bir film olarak üretilmiş ve camsı elektrot yüzeyine modifiye edilmiştir. Bu MIP ince filminin yüzeye bağlanması problemlere sebep olabilmektedir. MIP'in yüzeyde bozunması tekrarlanabilir sonuçların alınmasını engelleyebilmektedir. Her ne kadar MIP'in üstün seçicilik özelliğinden yararlanılıyor olunsa da elektrotun dengeye getirilmesi zaman alıcıdır.

Bu doktora tezinde LOD değerinin düşük olması, hem biyolojik sıvılardan hem de süt ve süt ürünlerinden TOB'un analizine uygulanabilmesini mümkün kılmaktadır.

Çizelge 5.2. Önerilen yöntemin yapılan çalışmalar ile karşılaştırılması

Yöntem	LOD	Lineer Aralık (M)	Referans
Voltametri	$3{,}44 \times 10^{-9}$ M	$6{,}87 \times 10^{-9} – 3{,}44 \times 10^{-7}$	262
HPLC	$7{,}5 \times 10^{-9}$ M	$2{,}0 \times 10^{-7} – 1{,}5 \times 10^{-5}$	263
Kapiler Elektroforez	$6{,}42 \times 10^{-10}$ M	$6{,}42 \times 10^{-10} – 6{,}4 \times 10^{-8}$	264
Kolorimetrik	$23{,}3\ 10^{-9}$ M	$40 – 200\ 10^{-9}$ M	265
Voltametri	1.4×10^{-10} M	$5.0 \times 10^{-10} – 1.0 \times 10^{-8}$ M	266
Bu Çalışma	$2{,}57 \times 10^{-9}$ M	$1{,}07 \times 10^{-7} – 3{,}21 \times 10^{-6}$ M	Doktora Tezi

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında göz enfeksiyonları tedavisinde kullanılan bir madde olan TOB'un inek sütünde ve insan serumunda analizi için yüzeyi baskılanmış MPTS modifiye edilmin Mn:ZnS KN'ler kullanılarak, fosforesans sensör geliştirilmiştir.

Geliştirilen yüzeyi IMIP:ZnS sensörleri TEM ile görüntülenmiş, FTIR spektroskopisi ve XPS ölçümleri kullanılarak karakterize edilmiştir. KN'lerin küresel olarak hazırlandığı, MPTS modifikasyonu, IMIP ve INIP partiküllerin hem elementel hem morfolojik olarak sentezlendiği kanıtlanmıştır.

Geliştirilen IMIP:ZnS ve INIP:ZnS sensör, fotolüminesans yöntemi için optimize edilmiş sentez koşullarında; monomer miktarı 25,00 µL, çapraz bağlayıcı miktarı 100,00 µL ve hedef molekül (TOB) miktarı 1,50 mg bulunmuştur.

Geliştirilen spektroflorimetrik yöntem için 0,10 M, pH 7,00 fosfat tamponu sistemi kullanılarak kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur. Organik ortam için yapılan deneysel çalışmalarda sensörün en iyi çalıştığı çözücü DCE olarak belirlenmiştir.

Sentezlenen partiküllerin kararlılıkları hem DCE hem de pH=7,00 tampon çözeltisinde sırasıyla 25 ve 23 gün boyunca incelenmiş ve sinyal değişimlerinde anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir. Sensörün ideal koşullarda TOB'a verdiği cevabı incelerken, inkübasyon ortamına eklenecek olan partikül miktarı 0,3125 mg/mL olarak belirlenmiştir.

Önerilen yöntemde, hazırlanan partiküllerin seçicilikleri incelenmiş ve sensörün TOB için seçici olduğu bulunmuştur, IMIP partiküllerinin INIP partiküllere organik ortamda 4,66, sulu ortamda 2,71 kat daha seçici olduğu baskılama faktörü ile hesaplanmıştır.

Sensörün sulu ve organik ortamdaki davranışı incelenmiş ve pH=7,00 tamponu ortamında doğrusal aralığın 0,05 – 1,50 µg/mL; LOD ve LOQ değerlerinin sırasıyla 0,0012 ve 0,0034 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Organik ortamda doğrusal aralık 0,01 – 5,00 µg/mL olarak tespit edilmiştir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla; 0,0009 ve 0,0027 µg/mL olarak hesaplanmıştır.

Süt matriksinde geri kazanım değeri %77,17 ile %103,50 arasında bulunmuştur. Gün içi ve günler arası çalışmalarda bağıl standart sapma değerleri %5,00'ten düşük olarak hesaplanmıştır. İnsan serumu matriksinde geri kazanım değerleri %88,5 ile %100,47 arasında; gün içi ve günler arası çalışmalarda bağıl standart sapma değerleri de %5,00'ten küçük olarak hesaplanmıştır.

Yüzey baskılama tekniği kullanılarak geliştirilen spektroflorimetrik sensörler inek sütünde ve insan serumunda TOB'un analizine dayananan tez çalışmasının literatüre katkı sağlaması açısından önemlidir. Tez kapsamında geliştirilen bu yöntem; validasyon parametreleri açısından iyi sonuçlar vermesine ek olarak basit ve ucuz yöntemler olması, bununla beraber fosforesansın arka plan sinyalerinin girişim etkisini en aza indirmesi hatta yok etmesi nedeniyle TOB analizi için önerilen yöntemlere alternatif olarak sunulmaktadır. Ayrıca geliştirilen yöntemin LOD değerinin düşük olması bu yöntemlerin biyolojik sıvılardan TOB'un analizine uygulanabilmesini mümkün kılmaktadır.

Geliştirilen fosforesans tabanlı sensörün, literatürde bulunan benzer bilimsel çalışmalarla karşılaştırıldığında oldukça geniş bir TOB derişimi aralığında doğrusal davrandığı gözlenmiştir. Tayin sınırı açısından da literatürdeki çalışmaların büyük bölümü ile benzerlik göstermektedir. Hatta ön işleme gerek duyulmadan biyolojik ortamda hızlı, kolay ve ekonomik bir tayin yöntemi olduğu söylenebilir.

KAYNAKLAR

1. Platon, (2015). *Kratylos.* (Çev. Furkan Akderin). İstanbul: Say Yayınları, 112.

2. Darwin, C. R. (2015). *Türlerin kökeni*. (Çev: Öner Ünalan). (7. Baskı). Kitap (Eserin orijinali 1859'da yayımlandı). Ankara: Evrensel Basım Yayınları, 520.

3. Watson, J. D. and Crick, F. H. C. (1953). Molecular structure of nucleic acids. *Nature,* 171(4356), 737-738.

4. Dugas, H. (1996). *A chemical approach to enzyme action.* (3rd ed.). New York: Springer-Verlag, 700.

5. Buckingham, A. D., Legon, A. C. and Roberts, S. M. (1993). *Principles of molecular recognition*. London, UK: Blackie Academic and Professional, 44-47.

6. Rebek, J. J. (1996). Assembly and encapsulation with self-complementary molecules. *Chemical Society Reviews,* 25, 255-264.

7. Kang, J. and Rebek, J. (1996). Entropically driven binding in a self-assembling molecular capsule. *Nature,* 382(6588), 239-241.

8. Rebek Jr, J. (2005). Simultaneous encapsulation: Molecules held at close range. *Angewandte Chemie International Edition*, 44(14), 2068-2078.

9. Lehn, J. M. (2004). Supramolecular chemistry: From molecular information towards self-organization and complex matter. *Reports on Progress in Physics,* 67(3), 249.

10. Sellergren, B. (2001). *Molecularly imprinted polymers. Man made mimics of antibodies and their applications in analytical chemistry*. Techniques and instrumentation in analytical chemistry. (*Vol. 23).* Amsterdam: Elsevier Science, 223.

11. Yan, M. and Ramström, O. (2005). *Molecularly ımprinted polymers: Science and technology*. New York: Marcer Dekker/CRC Press,156.

12. Cormack, P. A. G. and Elorza, A. Z. (2004). Molecularly ımprinted polymers: Synthesis and characterization. *Journal of Chromatography B*, 804, 173

13. Sellergren, B., Ekberg, B. and Mosbach, K. (1985). Molecular imprinting of amino acid derivatives in macroporous polymers : Demonstration of substrate- and enantio-selectivity by chromatographic resolution of racemic mixtures of amino acid derivatives. *Journal of Chromatography A*, 347, 1-10.

14. Hall, A. J., Achilli, L., Manesiotis, P., Quaglia, M., de Lorenzi, E. and Sellergren, B. (2003). Urea host monomers for stoichiometric molecular ımprinting of oxyanions. *Journal of Organic Chemistry*, 70, 5, 1732–1736.

15. Manesiotis, P., Hall, A. J., Emgenbroich, M., Quaglia, M., de Lorenzi, E. and Sellergren, B. (2004). An enantioselective imprinted receptor for *Z*-glutamate exhibiting a binding induced color change. *Chemical Communication*, 2278-2279.

16. Idziak, I. and Benrebouh, A. (2000). A molecularly imprinted polymer for ethynylestradiol evaluated by immunoassay. *Analyst*, 125, 1415-1417.

17. Rachkov, A. E., Cheong, S.H., El'skaya, A. V., Yano, K. and Karube, I. (1998). Molecularly imprinted polymers as artificial steroid receptors. *Polymers for Adanced Technologies*, 9, 511.

18. Ye, L., Cormack, P. A. G. and Mosbach, K. (1999). Molecularly imprinted monodisperse microspheres for competitive radioassay. *Analytical Communications*, 36, 35.

19. Say, R., Birlik, E., Ersoz, Yilmaz, A., F., Gedikbey, T. and Denizli, A. (2003). Preconcentration of copper on ion selective imprinted polymer microbeads. *Analytica Chimica Acta*, 480, 251.

20. Cui, A., Singh, A. and Kaplan, D. L. (2002). Enzyme-based molecular ımprinting with metals. *Biomacromolecules*, 3, 1353.

21. Ersoz, A., Say, R. and Denizli, A. (2004). Ni(II) ion-imprinted solid-phase extraction and preconcentration in aqueous solutions by packed-bed columns. *Analytica Chimica Acta*, 502, 91.

22. Matsui, J., Nicholls, I. A., Takeuchi, T., Mosbach, K. and Karube, I. (1996). Metal ion mediated recognition in molecularly imprinted polymers. *Analytica Chimica Acta*, 335, 71.

23. Rachkov, A. and Minoura, N. (2001). Towards molecularly ımprinted polymers selective to peptides and proteins. The epitope approach. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1544, 255.

24. Theodoridis, G., Konsta, G. and Bagia, C. (2004). Synthesis and evaluation of molecularly ımprinted polymers for enalapril and lisinopril, two synthetic peptide anti-hypertensive drugs. *Journal of Chromatography B*, 804, 43.

25. Titirici, M. M. and Sellergren, B. (2004). Peptide recognition via hierarchical ımprinting. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378, 1913.

26. Hayden, O., Bindeus, R., Haderspock, C., Mann, K.J., Wirl, B. and Dickert, F. L. (2003). Mass-sensitive detection of cells, viruses and enzymes with artificial receptor. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 91, 316.

27. Silvestri, D., Cristallini, C., Ciardelli, G., Giusti, P. and Barbani, N. (2004). Molecularly imprinted bioartificial membranes for the selective recognition of biological molecules. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 15, 255.

28. Rachkov, A., Hu, M., Bulgarevich, E., Matsumoto, T. and Minoura, N. (2004). Molecularly imprinted polymers prepared in aqueous solution selective for [Sar1, Ala8] angiotensin II. *Analytica Chimica Acta*, 504(1), 191-197.

29. Titirici, M. M. (2005). *Synthesıs and Evaluatıon of Novel Formats in Molecular Imprıiting*. Doktora Tezi, University of Dortmund. Üniversitesi, Institut für Umweltforschung, Dortmund. 203.

30. Yu, C. and Mosbach, K. (1997). Molecular imprinting utilizing an amide functional group for hydrogen bonding leading to highly efficient polymers. *Journal of Organic Chemistry*, 62, 4057–4064.

31. Panasyuk-Delaney, T., Mirsky, V.M. and Wolfbeis, O.S. (2002). Capacitive creatinine sensor based on a photografted molecularly imprinted polymer. *Electroanalysis*, 14(3), 221–224.

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

33. Matsui, J., Doblhoff-Dier, O. and Takeuchi, T. (1997). 2-(trifluoromethyl)acrylic acid: a novel functional monomer in non-covalent molecular imprinting. *Analytica Chimica Acta,* 343 (1–2), 1–4.

34. Liao, J.L., Wang, Y. and Hjerte´n, S. (1996) A novel support with artificially created recognition for the selective removal of proteins and for affinity chromatography. *Chromatographia*, 42, 259–262.

35. Kempe, M. (1996). Antibody-mimicking polymers as chiral stationary phases in hplc. *Analytical Chemistry*, 68, 1948–1953.

36. Piletsky, S.A. Andersson, H.S. and Nicholls, I.A. (1999). Combined hydrophobic and electrostatic interaction-based recognition in molecularly imprinted polymers. *Macromolecules*, 32, 633–636.

37. Yilmaz, E., Haupt, K. and Mosbach, K. (1999). Influence of functional and cross-linking monomers and the amount of template on the performance of molecularly imprinted polymers in binding assays. *Analytical Communication*, 36, 167–170.

38. Sellergren, B. (1994). Imprinted dispersion polymers: A new class of easily accessible affinity stationary phases. *Journal of Chromatography A*, 673, 133–141.

39. Sellergren, B. and Shea, K.J. (1993). Influence of polymer morphology on the ability of imprinted network polymers to resolve enantiomers. *Journal of Chromatography*, 635, 31–49.

40. Cowie, J.M.G. (1998). In Polymers: Chemistry & Physics of Modern Materials. (2nd Edition). Cheltenham, UK: Stanley Thornes Ltd, 429.

41. Bandrup, J. and Immergut, E.H. (1989). *In Polymer Handbook*. (3rd Edition). New York: Wiley, 2250.

42. Haupt, K., Dzgoev, A. and Mosbach, K. (1998). Assay system for the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid using a molecularly imprinted polymer as an artificial recognition element. *Analytical Chemistry*, 70, 628–631.

43. Wulff, G. and Sarhan, A. (1972). *Enzyme models based on molecularly ımprinted polymers with strong esterase activity*. Angewandte Chemie International Edition, 11, 341.

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

45. Shea, K. J. and Thompson, E. A. (1978). Template synthesis of macromolecules. selective functionalization of an organic polymer. *Journal of Organic Chemistry*, 43, 4253.

46. Beckett, A. and Andersson, P. (1959). Footprints in adsorbents. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 11, 258.

47. Dickey, F. H. (1949). The preparation of specific adsorbents. *Proceedings of National Academy of Science*, 35, 227.

48. Mosbach, K. (1983). Novel affinity techniques. Affinity chromatography and biological recognition. Part IV: Affinity Methods - Design and Development Orlando: Academic Press, 230.

49. Andresson, L., Sellergren, B. and Mosbach, K. (1984). Imprinting of amino acid derivatives in macroporous polymers. *Tetrahedron Letters*, 25, 5211.

50. Whitcombe, M. J., Rodriguez, M. E., Villar, P. and Vulfson, E. N. (1995). A new method for the ıntroduction of recognition site functionality into polymers prepared by molecular ımprinting: Synthesis and characterization of polymeric receptors for cholesterol. *Journal of American Chemical Society*, 117, 7105.

51. Glad, M., Norrlow, O., Sellergren, B., Siegbahn, N. and Mosbach, K. (1985). Use of silane monomers for molecular imprinting and enzyme entrapment in polysiloxanecoated porous silica. *Journal of Chromatography A*, 347, 11–23.

52. Cormack, P. A. G., Haupt, K. and Mosbach, K. (2000). Affinity Separation: Imprint Polymers. *Encyclopedia of Separation Science*, 288-296.

53. Norrlow, O., Mansson, M.O. and Mosbach, K. (1987). Improved chromatography prearranged distances between boronate groups by the molecular imprinting approach. *Journal of Chromatography A*, 396, 374–377.

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

55. Shi, H.Q., Tsai, W.B., Garrison, M.D., Ferrari, S. and Ratner, B.D. (1999). Template imprinted nanostructured surfaces for protein recognition. *Nature*, 398, 593–597.

56. Gao, D.M., Zhang, Z.P.,Wu, M.H., Xie, C.G., Guan, G.J. and Wang, D.P. (2007). A surface functional monomer-directing strategy for highly dense imprinting of TNT at surface of silica nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 129, 7859–7866.

57. Fu, G.Q., He, H.Y., Chai, Z.H., Chen, H.C., Kong, J., Wang, Y. and Jiang, Y.Z. (2011). Enhanced lysozyme imprinting over nanoparticles functionalized with carboxyl groups for noncovalent template sorption. *Analytical Chemistry*, 83, 1431–1436.

58. Cheng, W., Liu, Z. and Wang, Y. (2013). Preparation and application of surface molecularly imprinted silica gel for selective extraction of melamine from milk samples. *Talanta*, 116, 396–402.

59. Lin, Z., Xia, Z., Zheng, J., Zheng, D., Zhang, L., Yang, H. and Chen, G. (2012). Synthesis of uniformly sized molecularly imprinted polymer-coated silica nanoparticles for selective recognition and enrichment of lysozyme. *Journal of Materials Chemistry*, 22, 17914-17922.

60. Gao, R.X., Kong, X.,Wang, X., He, X.W., Chen, L.X. and Zhang, Y.K. (2011). Preparation and characterization of uniformly sized molecularly imprinted polymers functionalized with core–shell magnetic nanoparticles for the recognition and enrichment of protein. *Journal of Materials Chemistry*, 21, 17863–17871.

61. Li, L., He, X.W., Chen, L.X. and Zhang, Y.K. (2009). Preparation of core-shell magnetic molecularly ımprinted polymer nanoparticles for recognition of bovine hemoglobin. *Chemistry – An Asian Journal*, 4, 286–293.

62. Kan, X.W., Zhao, Q., Shao, D.L., Geng, Z.R.,Wang, Z.L. and Zhu, J.J. (2010). Preparation and recognition properties of bovine hemoglobin magnetic molecularly ımprinted polymers. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114, 3999–4004.

63. Gai, Q.Q., Qu, F., Liu, Z.J., Dai, R.J. and Zhang, Y.K. (2010). Superparamagnetic lysozyme surface-imprinted polymer prepared by atom transfer radical polymerization and its application for protein separation. *Journal of Chromatography A*, 1217, 5035–5042.

64. Zhou,W.H., Lu, C.H., Guo, X.C., Chen, F.R., Yang, H.H. and Wang, X.R. (2010). Inspired molecularly imprinted polymer coating superparamagnetic nanoparticles for protein recognition. *Journal of Materials Chemistry*, 20, 880-883.

65. Zhang, M., Zhang, X.H., He, X.W., Chen, L.X. and Zhang, Y.K. (2012). A self-assembled polydopamine film on the surface of magnetic nanoparticles for specific capture of protein. *Nanoscale*, 4, 3141–3147.

66. Jing, T., Du, H.R., Dai, Q., Xia, H., Niu, J.W., Hao, Q.L., Mei, S.R. and Zhou, Y.K. (2010). Magnetic molecularly imprinted nanoparticles for recognition of lysozyme. *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 301–306.

67. Zhang, M.S., Huang, J.R., Yu, P. and Chen, X. (2010). Preparation and characteristics of protein molecularly imprinted membranes on the surface of multiwalled carbon nanotubes. *Talanta*, 81, 162–166.

68. Li, Y., Yang, H.H., You, Q.H., Zhuang, Z.X. and Wang, X.R. (2006). Protein recognition via surface molecularly ımprinted polymer nanowires. *Analytical Chemistry*, 78, 317–320.

69. Chen, T., Shao, M.W., Xu, H.Y., Zhou, S.J., Liu, S.S. and Lee, S.T. (2012). Molecularly imprinted polymer-coated silicon nanowires for protein specific recognition and fast separation. *Journal of Materials Chemistry*, 22, 3990–3996.

70. Ouyang, R.Z., Lei, J.P. and Ju, H.X. (2008). Surface molecularly imprinted nanowire for protein specific recognition. *Chemical Communications*, 5761–5763.

71. Tan, C.J., Wangrangsimakul, S., Bai, R.B. and Tong, Y.W. (2008). Defining the interactions between proteins and surfactants for nanoparticle surface imprinting through miniemulsion polymerization. *Chemistry of Materials*, 20, 118–127.

72. Zhang, W., He, X.W., Chen, Y., Li, W.Y. and Zhang, Y.K. (2011). Composite of CdTe quantum dots and molecularly imprinted polymer as a sensing material for cytochrome c. *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 2553–2558.

73. Wu, A.H., Jia, J. and Luan, S.J. (2011). Amphiphilic PMMA/PEI core–shell nanoparticles as polymeric adsorbents to remove heavy metal pollutants. *Colloids Surfaces A*, 384, 180–185.

74. Liu, M., Gao, Z., Yu, Y., Su, R., Huang, R., Qi, W. and He, Z. (2018). Molecularly imprinted core-shell CdSe@SiO2/ CDs as a ratiometric fluorescent probe for 4-Nitrophenol sensing. *Nanoscale Research Letters*, 13-27.

75. Agasti, S.S., Rana, S., Park, M.H., Kim, C.K., You, C.C. and Rotello, V.M. (2010). Nanoparticles for detection and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, 316–328.

76. Wang, S. Yong, W., Liu, J., Zhang, L., Chen, Q. and Dong, Y. (2014). Development of an indirect competitive assay-based aptasensor for highly sensitive detection of tetracy-cline residue in honey. *Biosens Bioelectron*, 57, 192–198.

77. Piloto, A.M., Riberio, D.S.M., Rodrigues, S.S.M., Santos, C., Santos, J.L.M. and Sales, M.G.F. (2018). Plastic antibodies tailored on quantum dots for an optical detection of myoglobin down to the femto-molar range. *Scientific Reports*, 8, 4944.

78. Menon, S., Jesny, S. and Kumar, G.K. (2018). A voltammetric sensor for acetaminophen based on electropolymerized-molecularly imprinted poly (o-ami-nophenol) modified gold electrode. *Talanta*, 179, 668–675.

79. Teng, Y., Fan, L., Dai, Y., Zhong, M., Lu, X. and Kan, X. (2015). Electrochemical sensor for paracetamol recognition and detection based on catalytic and imprinted com-posite film. *Biosensensors and Bioelectronics*, 71, 137–142.

80. Gholivand, M. and Karimian, N. (2015). Fabrication of a highly selective and sensitive voltammetric ganciclovir sensor based on electropolymerized molecularly imprinted polymer and gold nano-particles on multiwall carbon nanotubes/glassy carbon electrode. *Sensors and Actuators B Chemical*, 215, 471–479.

81. Prasad, B.B., Singh, R. and Kumar, A. (2017). Synthesis of fullerene (C60-monoad-duct)-based water-compatible imprinted micelles for electro-chemical determination of chlorambucil. *Biosensensors and Bioelectronics*, 94, 115–123.

82. El-Naby, E.H. and Kamel, A.H. (2015). Potential transducers based man-tailored biomimetic sensors for selective recognition of dextromethorphan as an antitussive drug. *Material Science and Engineering C*, 54, 217–224.

83. Li, J., Xu, Z., Liu, M., Deng, P., Tang, S., Jiang, J., Fendg, H., Qian, D. and He, L. (2017). Ag/N-doped reduced graphene oxide incorpo-rated with molecularly imprinted polymer: an advanced electro-chemical sensing platform for salbutamol determination. *Biosensensors and Bioelectronics*, 90, 210–216.

84. Prasad, B.B., Kumar, A. and Singh, R. (2017). Synthesis of novel monomeric graphene quantum dots and corresponding nanocomposite with molecularly imprinted polymer for electrochemical detec- tion of an anticancerous ifosfamide drug. *Biosensors and Bioelectronics*, 94, 1–9.

85. Khan, S.I., Chillawar, R.R., Tadi, K.K. and Motghare, R.V. (2018). Molecular imprinted polymer based impedimetric sensor for trace level determination of digoxin in biological and pharmaceutical samples. *Current Analytical Chemistry*, 14, 474–482.

86. da Silva, H., Pocheco, J., Silva, J., Viswanathan, S. and Matos, C.D. (2015). Molecularly imprinted sensor for voltammetric detection of norfloxacin. *Senors and Actuators B Chemical*, 219, 301–307.

87. Zhang, L., Zhu, C., Chen, C., Zhu, S., Zhou, J., Wans, M. and Shang, P. (2018). Determination of kanamycin using a molecularly imprinted SPR sensor. *Food Chemistry*, 266, 170–174.

88. Torkashvand, M., Gholivand, M.B. and Malekzadeh, G. (2016). Construction of a new electrochem-ical sensor based on molecular imprinting recognition sites on multiwall carbon nanotube surface for analysis of ceftazidime in real samples. *Senors and Actuators B Chemical*, 231, 759–767.

89. Xiao, N., Deng, J., Cheng, J., Ju, Saigin., Zhao, H., Xie, J., Qian, D. and He, J. (2016). Carbon paste electrode modified with duplex molecularly imprinted polymer hybrid film for metronidazole detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 81, 54–60.

90. Canfarotta, F., Czulak, J., Guerreiro, A., Cruz, A.G., Piletsky, S., Bergdahl, G.E., Hedström, M. and Mattaiasson, B. (2018). A novel capacitive sensor based on molecularly imprinted nanoparticles as recognition elements. *Biosensors and Bioelectronics*, 120, 108–114.

91. Teng, Y., Liu, F. and Kan, X. (2017). Voltammetric dopamine sensor based on three-dimensional electrosynthesized molecularly imprinted polymers and polypyrrole nanowires. *Microchimica Acta*, 184, 2515–2522.

92. Lin, L., Lian, H.T., Sun, X.Y., Yu, Y.M. and Liu, B. (2015). An L-dopa electrochemical sensor based on a graphene doped molecularly imprinted chitosan film. *Analytical Methods*, 7, 1387–1394.

93. Chen, J., Huang, H. Zeng, Y., Tang, H. and Li, L. (2015). A novel composite of molecularly imprinted polymer-coated PdNPs for electrochemical sensing norepineph-rine. *Biosensors and Bioelectronics*, 65, 366–374.

94. Gupta, P. and Goyal, R.N. (2015). Graphene and co-polymer composite based molecularly imprinted sensor for ultratrace determination of melatonin in human biological fluids. *RSC Adv*, 5, 40444–40454.

95. Ermiş, N., Uzun, L. ve Denizli, A. (2017). Preparation of molecularly imprinted electrochemical sensor for L-phenylalanine detection and its application. *Journal Electroanal Chem*, 807, 244–252.

96. Sharma, P.S., Iskierko, Z., Noworyta, K., Cieplak, M., Borowicz, P., Lisowsko, W., D'Souza, F. and Kutner, W. (2018). Synthesis and application of a "plastic antibody" in electrochemical microfluidic platform for oxytocin determination. *Biosensors and Bioelectronics,* 100, 251–258.

97. Hai, H., An, X. and Li, J. (2015). Molecularly imprinted electrochemical sensor for selective determination of oxidized glutathione. *Analytical Methods*, 7, 2210–2214.

98. Huang, J., Tong, J., Luo, J., Zhu, Y., Gu, Y. and Liu, X. (2018). Green synthesis of water-compatible fluorescent molecularly imprinted polymeric nanoparticles for efficient detection of paracetamol. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 6, 9760–9770.

99. Altintas, Z., Guerreiro, A., Piletsky, S. and Tothill, E. (2015). NanoMIP based optical sensor for phar-maceuticals monitoring. *Sensors and Actuators B Chemical*, 213, 305–313.

100. Tang, Y., Gao, Z., Wang, S., Gao, X., Gao, J., Ma, Y., Liu, X. and Li, J. (2015). Upconversion particles coated with molec-ularly imprinted polymers as fluorescence probe for detection of clenbuterol. *Biosensors and Bioelectronics*, 71, 44–50.

101. Altintas, Z., France, B., Ortiz, J. O. and Tothill, E. (2016). Computationally modelled receptors for drug monitoring using an optical based biomimetic SPR sensor. *Sensors and Actuators B Chemical*, 224, 726–737.

102. Sari, E., Üzek, R., Duman, M., Alagöz, H.Y. ve Denizli, A. (2017). Prism coupler-based sensor system for simultaneous screening of synthetic glucocorticosteroid as dop-ing control agent. *Sensors and Actuators B Chemical*, 260, 432–444.

103. Li, S., Li, J., Lin, Q. and Wei, X. (2015). A molecularly imprinted sensor based on an electrochemiluminescent membrane for ultratrace doxycycline determination. *Analyst*, 140, 4702–4707.

104. Weber, P., Riegger, B.R., Niedergall, K., Tovar, G. E. Em., Bach, M. and Gauglitz, G. (2018). Nano-MIP based sensor for penicillin G: sensitive layer and analytical validation. *Sensors and Actuators B Chemical*, 267, 26–33.

105. Mehrzad-Samarin, M., Faridbod, F., Dezfuli, A. S. and Ganjali, M. R. (2017). A novel metronidazole fluorescent nanosensor based on graphene quantum dots embedded silica molecularly imprinted polymer. *Biosensors and Bioelectronics*, 92, 618–623.

106. Duan, H., Li, L., Wang, X., Wang, Y., Li, J. and Luo, C. (2015a). A sensitive and selective chemilumines-cence sensor for the determination of dopamine based on silan-ized magnetic graphene oxide-molecularly imprinted polymer. *Spectrochimica Acta A Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 139, 374–379.

107. Diltemiz, S.E. ve Uslu, O. (2015). A reflectometric interferometric nanosensor for sarcosine. *Biotechnology Progress*, 31, 55–61.

108. Li, D.Y., Qin, Y. P., Li, H.Y., He, X.W., Li, W.Y. and Zhang, K.Y. (2015). A "turn-on" fluorescent receptor for detecting tyrosine phosphopeptide using the surface imprinting procedure and the epitope approach. *Biosensors and Bioelectronics*, 66, 224–230.

109. Zhang, X., Yang, S., Jiang, R., Sun, L., Pan, S. and Luo, A. (2018). Fluorescent molecularly imprinted mem-branes as biosensor for the detection of target protein. *Sensors and Actuators B Chemical*, 254, 1078–1086.

110. Sharma, S. and Gupta, B.D. (2018). *An efficient and selective sensing of creatinine based on fiber optic SPR technique exploit-ing the advantages of molecular imprinting technique.* In Optical Sensing and Detection V. International Society for Optics and Photonics, 106801T.

111. Li, D., He, Q., He, Y., Xin, M., Zhang, Y. and Shen, Z. (2017). Molecular imprinting sensor based on quantum weak measurement. *Biosensors and Bioelectronics*, 94, 328–334.

112. Primo, E.N., Kogan, M. J., Verdejo, H. E., Bollo, S., Rubianes, M. D. and Rivas, A. G. (2018). Label-free graphene oxide-based sur-face plasmon resonance immunosensor for the quantification of galectin-3, a novel cardiac biomarker. *ACS Applied Materials and Interfaces,* 10, 23501–23508.

113. Liu, S., Cheng, R., Chen, Y., Shi, H. and Zhao, G. (2018). A simple one-step pretreatment, highly sensi-tive and selective sensing of 17b-estradiol in environmental water samples using surface-enhanced Raman spectroscopy. *Sensors and Actuators B Chemical*, 254, 1157–1164.

114. Duan, H., Li, L., Wang, X., Wang, Y., Li, J. and Luo, C. (2015b). Biorecognition and highly sensitive determination of ribonuclease A with chemiluminescence sensor based on Fe3 O4/multi-walled carbon nanotubes/ SiO_2-surface molecular imprinting polymer. *RSC Advances*, 5, 18850–18857.

115. Yan, Y.J., He, X.W., Li, W.Y. and Zhang, Y.K. (2017). Nitrogen-doped graphene quantum dots-labeled epitope imprinted polymer with double templates via the metal chelation for specific recognition of cytochrome c. *Biosensors and Bioelectronics*, 91, 253–261.

116. Wang, X., Yu, J., Li, J., Kang, Q. and Shen, D. (2018). Quantum dots based imprinting fluorescent nanosensor for the selective and sensitive detection of phycocy-anin: A general imprinting strategy toward proteins. *Sensors and Actuators B Chemical*, 255, 268–274.

117. Liu, X., Liu, Q., Kong, F., Qiao, X. and Xu, Z. (2017) Molecularly imprinted fluorescent probe based on hydrophobic CdSe/ZnS quantum dots for the detection of methamidophos in fruit and vegetables. *Advanced Polymer Technology,* 37, 1790-1796.

118. Sarikaya, A.G., Osman, B., Çam, T. ve Denizli, A. (2017). Molecularly imprinted surface plasmon resonance (SPR) sensor for uric acid determination. *Sensors Actuators B Chemical*, 251, 763–772.

119. İnternet: Günsür, M.Y. (2014). *Lüminesans Nedir?* Web: http://deneyselkimya.blogspot.com/2014/01/luminesans-nedir.html, adresinden 10.04.2020'de alınmıştır.

120. Yıldız, A., Genç, Ö. ve Bektaş, S. (1997). *Enstrümantal analiz yöntemleri*. Ankara: Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 75-84.

121. Lakowicz, J. R. (1999). *Principles of fluorescence spectroscopy*. (2nd Edition). New York, USA: Plenum Press.

122. Straughan, B. P., Walker, S. (1976). Fluorescence and Phosphorescence Spectroscopy. Dordrecht: Springer.

123. İnternet: *Physical & Theoretical Chemistry*, (2020). Web: https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps, adresinden 26.04.2020'de alınmıştır.

124. Schulman, G.S., Winefordner, J. D. and Koolthoff, I. M. (1993*). Molecular luminescence spectroscopy.* New York, USA: Wiley, 480.

125. İnternet: *Moleküler Lüminesans Spektroskopisi* Web: https://abs.mehmetakif.edu.tr/upload/1127_905_dosya.pdf, adresinden 26.04.2020'de alınmıştır.

126. Shi, D., Guo, Z. andBedford, N. (2015). 4-Semiconductor quantum dots. *Nanomaterials and Devices*, 83-104.

127. Wu, P. and Yan, X. P. (2013). Doped quantum dots for chemo/biosensing and bioimaging. *Chemical Society Reviews*, 42(12), 5489-5521.

128. Medintz, L., Uyeda, H. T., Goldman, E. R. and Mattoussi, H. (2008). Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nature Materials*, 4, 435–446.

129. Smith, A. M., Duan, H. W., Mohs, A. M. and Nie, S. (2008). Bioconjugated quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(11), 1226–1240.

130. Gill, R., Zayats, M. and Willner, I. (2008). Semiconductor quantum dots for bioanalysis. *Angewandte Chemical International Edition*, 47, 7602–7625.

131. Smyder, J. A. and Krauss, T. D. (2011). Coming attractions for semiconductor quantum dots. *Materials Today*, 14, 382–387.

132. Talapin, D. V., Lee, J. S., Kovalenko, M. V. and Shevchenko, E. V. (2010). Prospects of colloidal nanocrystals for electronic and optoelectronic applications. *Chemical Reviews*, 110, 389–458.

133. Bryan, J. D. and Gamelin, D. R. (2005). Doped semiconductor nanocrystals: Synthesis, characterization, physical properties, and applications. *Progress in Inorganic Chemistry*, 54, 47–126.

134. Bol, A. A. and Meijerink, A., (2000). Doped semiconductor nanoparticles – a new class of luminescent materials? *Journal of Luminescence*, 87–89, 315–318.

135. Resch-Genger, U., Grabolle, M., Cavaliere-Jaricot, S., Nitschke, R. and Nann, T. (2008). Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nature Methods*, 5(9), 763–775.

136. Uekewa, N., Ouchi, M., Wen, M., Matsumoto, T. and Kojima, T. (2015). Synthesis of copper ion doped ZnS phosphor sols by peptization process of sulfide-citrate complex precipitates. *Journal of the Ceramis Society of Japan*, 123, 924-928.

137. Reiss, P. (2007). ZnSe based colloidal nanocrystals: Synthesis, shape control, core/shell, alloy and doped systems. *New Journal of Chemistry*, 31, 1843–1852.

138. Wang, Y. S., Thomas, P. J. and O'Brien, (2006). Optical properties of ZnO nanocrystals doped with Cd, Mg, Mn, and Fe Ions. *Journal of Physical Chemistry B*, 110, 21412–21415.

139. Jug, K. and Tikhomirov, V. A. (2009). Comparative studies of cation doping of ZnO with Mn, Fe, and Co. *Journal of Physical Chemistry A*, 113, 11651–11655.

140. Wu, J. C., Zheng, J. W., Wu, P. and Xu, R. (2011). Study of native defects and transition-metal (Mn, Fe, Co, and Ni) doping in a zinc-blende CdS photocatalyst by DFT and hybrid DFT calculations. *Journal of Physical Chemistry C*, 115, 5675–5682.

141. Chikan, V. (2011). Challenges and prospects of electronic doping of colloidal quantum dots: Case study of CdSe. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 2, 2783–2789.

142. Mocatta, D., Cohen, G., Schattner, J., Millo, O., Rabani, E. and Banin, U. (2011). Heavily doped semiconductor nanocrystal quantum dots. *Science*, 332, 77–81.

143. Karan, N. S., Sarma, D. D., Kadam, R. M. and Pradhan, N. (2010). Doping transition metal (Mn or Cu) ıons in semiconductor nanocrystals. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 1, 2863–2866.

144. Pradhan, N. and Sarma, D. D. (2011). Advances in light-emitting doped semiconductor nanocrystals. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 2, 2818–2826.

145. Chen, W., Zhang, J. Z. and Joly, A. G. (2004). Optical properties and potential applications of doped semiconductor nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 4, 919–947.

146. Norris, D. J., Efros, A. L. and Erwin, S. C. (2008). Doped nanocrystals. *Science*, 319, 1776–1779.

147. Yang, H. S., Santra, S. and Holloway, P. H. (2005). Synthesis and applications of Mn doped II-IV semiconductor nanocrystals. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 5, 1364–1375.

148. Zhuang, J. Q., Zhang, X. D., Wang, G., Li, D. M., Yang, W. S. and Li, T. J. (2011). Synthesis of water-soluble ZnS: Mn2+ nanocrystals by using mercaptopropionic acid as stabilizer. *Journal of Material Chemistry*, 13, 1853–1857.

149. Aboulaich, A., Balan, L., Ghanbaja, J., Medjandi, G., Merlin, C. and Schneider, R. (2011). Aqueous Route to Biocompatible ZnSe:Mn/ZnO Core/Shell Quantum Dots Using 1-Thioglycerol As Stabilizer. *Chemistry of Materials*, 23, 3706–3713.

150. Aboulaich, A., Geszke, M., Balan, L., Ghanbaja, J., Medjahdi, G. and Schneider, R. (2010). Water-Based Route to Colloidal Mn-Doped ZnSe and Core/Shell ZnSe/ZnS Quantum Dots. *Inorganic Chemistry*, 49, 10940–10948.

151. Bol, A.A. and Meijerink, A. (2001a). Luminescence quantum efficiency of nanocrystalline ZnS:Mn2+ surface passivation and Mn2+ concentration. *Journal of Physical Chemistry B,* 105, 10197–10202.

152. Suyver, J.F., Wuister, S.F., Kelly, J.J. and Meijerink, A. (2001). Synthesis and photoluminescence of nanocrystalline ZnS:Mn2+. *Nano Letters*, 1, 429–433.

153. Zhou, W.B. and Baneyx, F. (2011). Aqueous, protein-driven synthesis of transition metal-doped ZnS immuno-quantum dots. *ACS Nano*, 5, 8013–8018.

154. Makhal, A., Sarkar, S. and Pal, S. K. (2012). Protein-mediated synthesis of nanosized mn-doped ZnS: A multifunctional, UV-Durable bio-nanocomposite. *Inorganic Chemidtry*, 51, 10203–10210.

155. Yang, H. and Holloway, P. H. (2004). Efficient and photostable ZnS-passivated CdS:Mn luminescent nanocrystals. *Advanced Functional Materials,*14, 152–156.

156. Yang, H. S., Holloway, P. H., Cunningham, G. and Schanze,K. S. (2004). CdS : Mn nanocrystals passivated by ZnS: Synthesis and luminescent properties. *Journal of Chemical Physics,* 121, 10233–10240.

157. Qian, L., Bera, D. and Holloway, P. (2008). Photoluminescence from ZnS／CdS : Mn ／ZnS ZnS／CdS : Mn／ZnS quantum well quantum dots. *Applied Physics Letters,* 92, 093103.

158. Mikulec, F. V., Kuno, M., Bennati, M., Hall, D. A., Griffin, R. G. and Bawendi, M. G. (2000). Organometallic synthesis and spectroscopic characterization of manganese-doped CdSe nanocrystals. *Journal of American Chemical Society*, 122, 2532–2540.

159. Suyver, J. F., Wuister, S. F., Kelly, J. J. and Meijerink, A. (2000). Luminescence of nanocrystalline ZnSe:Mn2+. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2, 5445–5448.

160. Norris, D.J., Yao, N., Charnock, F.T. and Kennedy, T.A. (2001). High-quality manganese-doped ZnSe nanocrystals. *Nano Letters,* 1, 3–7.

161. Pradhan, N., Goorskey, D., Thessing, J. and Peng, X. G. (2005). An alternative of cdse nanocrystal emmiters: Control of optical performancde via greener synthetic chemistry. *Journal of Americam Chemical Society,* 127, 17586–17587.

162. Pradhan, N. and Peng, X. G. (2007). Efficient and color-tunable mn-doped ZnSe nanocrystal emitters: Control of optical performance via greener synthetic chemistry. *Journal of American Chemical Society*, 129, 3339–3347.

163. Radovanovic, P. V. and Gamelin, D. R. (2001). Electronic absorption spectroscopy of cobalt ıons in diluted magnetic semiconductor quantum dots: Demonstration of an isocrystalline core/shell synthetic method. *Journal of American Chemical Society*, 123, 12207–12214.

164. Du, M. H., Erwin, S. C. and Efros, A. L. (2008). Trapped-dopant model of doping in semiconductor nanocrystals. *Nano Letters*, 8, 2878–2882.

165. Zu, L. J., Wills, A. W., Kennedy, T. A., Glaser, E. R. and Norris, D. J. (2010). Effect of different manganese precursors on the doping efficiency in ZnSe nanocrystals. *Journal of Physical Chemistry C,* 114, 21969–21975.

166. Nag, A., Sapra, S., Nagamani, C., Sharma, A., Pradhan, N., Bhat, S. V. and Sarma, D. D. (2007). A study of Mn^{2+} doping in CdS nanocrystals. *Chemistry of Materials*, 19, 3252–3259.

167. Viswanatha, R., Battaglia, D. M., Curtis, M. E., Mishima, T. D., Johnson, M. B. and Peng, X. (2008). Shape control of doped semiconductor nanocrystals (d-dots). *Nano Research*, 1, 138–144.

168. Yang, Y. A., Chen, O., Angerhofer A. and Cao,Y. C. (2006). Radial-position-controlled doping in CdS/ZnS core/shell nanocrystals. *Journal of American Chemical Society*, 128, 12428–12429.

169. Yang, Y. A., Chen,O., Angerhofer A. and Cao, Y. C. (2008). On doping CdS/ZnS core/shell nanocrystals with Mn. *Journal of American Chemical Society*, 130, 15649–15661.

170. Yang, Y. A., Chen, O., Angerhofer, A. and Cao, Y. C. (2009). Radial-position-controlled doping of CdS/ZnS core/shell. *Chemistry A European Journal*, 15, 3186–3197.

171. Srivastava, B. B., Jana, S., Karan, N. S., Paria, S., Jana, N. R., Sarma, D. D. and Pradhan, N. (2010). Highly luminescent Mn-doped ZnS nanocrystals: Gram-scale synthesis. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 1, 1454–1458.

172. Shen, H. B., Wang, H. Z., Li, X. M., Niu, J. Z., Wang, H., Chen, X. and Li, L. S. (2009). Phosphine-free synthesis of high quality ZnSe, ZnSe/ZnS, and Cu-, Mn-doped ZnSe nanocrystals. *Dalton Transactions*, 10534–10540.

173. Acharya, S., Sarma, D. D., Jana, N. R. and Pradhan, N. (2010). An alternate route to high-quality znse and Mn-doped ZnSe nanocrystals. *Journal of Physical Chemistry Letters,* 1, 485–488.

174. Zeng, R. S., Zhang, T. T., Dai, G. Z. and Zou, B. S. (2011). Highly emissive, color-tunable, phosphine-free Mn:ZnSe/ZnS core/shell and Mn:ZnSeS shell-alloyed doped nanocrystals. *Journal of Physical Chemistry C*, 115, 3005–3010.

175. Pradhan, N., Battaglia, D. M., Liu, Y. C. and Peng, X. G. (2007). Efficient, stable, small, and water-soluble doped ZnSe nanocrystal emitters as non-cadmium biomedical labels. *Nano Letters,* 7, 312–317.

176. Zheng, J.J., Gao, F.M., Wei, G.D. and Yang, W.Y. (2012). Enhanced photoluminescence of water-soluble Mn-doped ZnS quantum dots by thiol ligand exchange. *Journal of Chemical Physics Letters*, 519–520, 73–77.

177. Deng, M. L., Tu, N. N., Bai, F. and Wang, L. Y. (2012). Surface Functionalization of hydrophobic nanocrystals with one particle per micelle for bioapplications. *Chemistry of Materials,* 24, 2592–2597.

178. Beaulac, R., Archer, P. I. and Gamelin, D. R. (2008). Solid state chemistry on the nanoscale: Achievements, challenges, and opportunities. *Journal of Solid State Chemistry,* 181, 1582–1589.

179. Dreyhsig, J. and Allen, J. M. (1989). Absorption from the excited state in ZnS:Mn. *Journal of Physics: Condensed Matter,* 1, 1087–1089.

180. Yu, W. W., Qu, L. H., Guo, W. Z. and Peng, X. G. (2003). Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals. *Chemistry of Materials,* 15, 2854–2860.

181. Mahamuni, S., Lad, A.D. and Patole, S. (2008). Photoluminescence properties of manganese-doped zinc selenide quantum dots. *Journal of Physical Chemistry C,* 112, 2271–2277.

182. Norman, T. J., Magana, D., Wilson, T., Burns, C., Zhang, J. Z., Cao, D. and Bridges, F. 2003). Optical and surface structural properties of Mn2+-Doped ZnSe nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry B,* 107, 6309–6317.

183. Sapra, S., Prakash, A. Ghangrekar, A., Periasamy, N. and Sarma, D. D. (2005). Emission properties of manganese-doped ZnS nanocrystals. *Journal of Physical Chemistry B,* 109, 1663–1668.

184. Nag, A., Sapra, S., Gupta, S. S., Prakash, A., Ghangrekar, A., Periasamy, N. and Sarma, D. D. (2008). Luminescence in Mn-Doped CdS nanocrystals. *Bulletin of Materials Science,* 31, 561–568.

185. Wang, C. L., Xu, S. H., Wang, Z. Y. and Cui,Y. P. (2011). Key Roles of Impurities in the stability of ınternally doped Cu:ZnSe nanocrystals in aqueous solution. *Journal of Physical Chemistry C,* 115, 18486–18493.

186. Xie, R. G. and Peng, X. G. (2009). Synthesis of Cu-doped InP nanocrystals (d-dots) with ZnSe diffusion barrier as efficient and color-tunable NIR emitters. *Journal of American Chemical Society*, 131, 10645–10651.

187. Srivastava, B., Jana, S. and Pradhan, N. (2011). Doping Cu in semiconductor nanocrystals: some old and some new physical insights. *Journal American Chemical Society*, 133, 1007–1015.

188. Sarkar, S., Karan, N. S. and Pradhan, N. (2011). Ultrasmall color-tunable copper-doped ternary semiconductor nanocrystal emitters. *Angewandte Chemistry International Edition,* 50, 6065–6069.

189. Shen, Q. H., Liu, Y., Xu, J., Meng, C. G. and Liu, X. Y. (2010). Microwave induced center-doping of silver ions in aqueous CdS nanocrystals with tunable, impurity and visible emission. *Chemical Communications,* 46, 5701–5703.

190. Hao, E., Sun, Y. P., Yang, B. Zhang, X., Liu, J. M. and Shen, J. C. (1998). Synthesis and photophysical properties of ZnS colooidal particles doped with silver. *Journal of Colloid Interface Science,* 204, 369–373.

191. Yang, P., Lü, M., Xü, D., Yuan, D., Chang, J., Zhou, G. and Pan, M. (2002). Strong green luminescence of Ni^{2+}-doped ZnS nanocrystals. *Applied Physics A*, 74(2), 257-259.

192. Jana, S., Srivastava, B. B., Jana, S., Bose, R. and Pradhan, N. (2012). Multifunctional doped semiconductor nanocrystals. *Journal of Physical Chemistry Letters,* 3, 2535–2540.

193. Bol, A. A. and Meijerink, A. (2001b). Luminescence of nanocrystalline ZnS:Pb^{2+}. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 3, 2105–2112.

194. Bol, A. A. and Meijerink, A. (2001c). Luminescence of nanocrystalline ZnS:Pb^{2+}. *Physica Status Solidi B,* 224, 173–177.

195. Beaulac, R., Archer, P. I., Liu, X. Y., Lee, S., Salley, G. M., Dobrowolska, M., Furdyna, J. K. and Gamelin, D. R. (2008). Spin-polarizable excitonic luminescence n colloidal Mn^{2+}-doped CdSe quantum dots. *Nano Letters,* 8, 1197–1201.

196. Beaulac, R., Archer, P. I., Ochsenbein, S. T. and Gamelin, D. R. (2008). Mn^{2+}-Doped CdSe quantum dots: New inorganic materials for spin-electronics and spin-photonics. *Advanced Functional Materials,* 18, 3873–3891.

197. Manna, G., Jana, S., Bose, R. and Pradhan, N. (2012). Mn-doped multinary CIZS and AIZS nanocrystals. *Journal of Physical Chemistry Letters,* 3, 2528–2534.

198. Norberg, N. S., Kittilstved, K. R., Amonette, J. E. Kukkadapu, R. K., Schwartz, D. A. and Gamelin, D. R. (2004). Synthesis of colloidal Mn^{2+}:ZnO quantum dots and High-TC ferromagnetic nanocrystalline thin films. *Journal of American Chemical Society*, 126, 9387–9398.

199. Tanaka, M. and Masumoto, Y. (2001). Energy transfer mechanism in Mn^{2+} doped CdS nanocrystals. *Solid State Communication*, 120, 7–10.

200. Taguchi, S., Ishizumi, A., Tayagaki, T. and Kanemitsu, Y. (2009). Mn–Mn couplings in Mn-doped CdS nanocrystals studied by magnetic circular dichroism spectroscopy. *Applied Physics Letters*, 94, 173101.

201. Zuo, T. S., Sun, Z. P., Zhao, Y. L., Jiang, X. M. and Gao, X. Y. (2010) The big red shift of photoluminescence of mn dopants in strained cds: A case study of mn-doped MnS- CdS heteronanostructures. *Journal of American Chemical Society*, 132(19), 6618-6619.

202. Chen, W., Sammynaiken, R., Huang, Y. N., Malm, J. O., Wallenberg, R., Bovin, J. O., Zwiller, V. and Kotov, N. A. (2001). Crystal field, phonon coupling and emission shift of Mn^{2+} in ZnS: Mn nanoparticles. *Journal of Applied Physics*, 89(2), 1120–1129.

203. Nag, A., Cherian, R. Mahadevan, P., Gopal, A.V., Hazarika, A., Mohan, A., Vengurlekar, A. S. and Sarma, D. D. (2010). Size-dependent tuning of Mn^{2+} d emission in Mn2+-doped CdS nanocrystals: Bulk vs surface. *Journal of Physical Chemistry C*, 114, 18323–18329.

204. Bera, L., Qian, T.K. and Tseng, P.H. (2010). Holloway, Quantum dots and their multimodal applications: A review. *Materials*, 3(4), 2260–2345.

205. Stier, O., Grundmann, M. and Bimberg, D. (1999). Electronic and optical properties of strained quantum dots modeled by 8-band k· p theory. *Physical Review B*, 59(8), 5688.

206. Shukla, S. K. (2014). Recent developments in biomedical applications of quantum dots. *Advanced. Materials Review*, 1(1), 2-12.

207. Matea, C. T., Mocan, T., Tabaran, F., Pop, T., Mosteanu, O., Puia, C. and Mocan, L. (2017). Quantum dots in imaging, drug delivery and sensor applications. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 5421.

208. Yaghini, A.M., Seifalian, A.J. and Mac, R. (2011). In vivo applications of quantum dot nanoparticles for optical diagnostics and therapy. *Nanomedicine*, 21–40.

209. Bajwa, N., Mehra, N. K., Jain, K. and Jain, N. K. (2016). Pharmaceutical and biomedical applications of quantum dots. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 44(3), 758-768.

210. Jamieson, T., Bakhshi, R., Petrova, D., Pocock, R., Imani, M. and Seifalian, A. M. (2007). Biological applications of quantum dots. *Biomaterials*, 28, 4717–4732.

211. Zhu, D., Chen, Y., Jiang, L., Geng, J., Zhang, J.R. and Zhu, J.J. (2011). Manganese doped ZnSe quantum dots as a probe for time resolved fluorescence detection of fluorouracil. *Analytical Chemistry*, 83, 9076–9081.

212. Zhao, Q., Li, F. Y. and Huang., C. H. (2010). Phosphorescent chemosensors based on heavy-metal complexes. *Chemical Society Reviews*, 39, 3007–3030.

213. Dıaz-Garcia, M. E., Fernandez-Gonzalez, A. and Badia-Laino, R. (2007). The triplet state: Emerging applications of room temperature phosphorescence spectroscopy. *Applied Spectroscopy Reviews*, 42, 605–624.

214. Kuijt, J., Ariese, F., Brinkman, U. A. T. and Gooijer, C. (2003). Room temperature phosphorescence in the liquid state as a tool in analytical chemistry. *Analytica Chimica Acta*, 488, 135–171.

215. He, Y., Wang, H.F. and Yan., X.P. (2008). Exploring Mn-doped ZnS quantum dots for he room-temperature phosphorescence detection of enoxacin in biological fluids. *Analytical Chemistry*, 80, 3832–3837.

216. Sotelo-Gonzalez, E., Fernandez-Argu¨elles, M. T., Costa-Fernandez, J. M. and Sanz-Medel, A. (2012). Mn -doped ZnS quantum dots for the determination of acetone by phosphorescence attenuation. *Analytica Chimica Acta*, 712, 120–126.

217. Wang, H.F., He,Y., Ji, T.R. and Yan, X.P. (2009). Surface molecular ımprinting on Mn-doped ZnS quantum dots for room-temperature phosphorescence optosensing of pentachlorophenol in water. *Analytical Chemistry*, 81(4), 1615-1621.

218. Li, H., Shih, W. Y. and Shih, W. H. (2007). Stable aqueous ZnS quantum dots obtained using (3-mercaptopropyl)trimethoxysilane as a capping molecule. *Nanotechnology*, 18, 495605.

219. Liu, J. X., Chen, H., Lin, Z. and Lin, J.M. (2010). Preparation of surface ımprinting polymer capped Mn-Doped ZnS quantum dots and their application for chemiluminescence detection of 4-nitrophenol in tap water. *Analytical Chemistry*, 82, 7380–7386.

220. Chen, Y. P., Wang, D. N., Yin, Y. M., Wang, L. Y., Wang, X. F. and Xie, M. X. (2012). Quantum dots capped with dummy molecularly imprinted film as luminescent sensor for the determination of tetrabromobisphenol a in water and soils. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 60, 10472–10479.

221. Tu, R. Y., Liu, B. H., Wang, Z. Y., Gao, D. M., Wang, F., Fang, Q. L. and Zhang, Z. P. (2008). Amine-capped ZnS−Mn2+ nanocrystals for fluorescence detection of trace TNT explosive. *Analytical Chemistry*, 80, 3458–3465.

222. Zou, W. S., Yang, J., Yang, T. T., Hu, X. and Lian, H. Z. (2012). Magnetic-room temperature phosphorescent multifunctional nanocomposites as chemosensor for detection and photo-driven enzyme mimetics for degradation of 2,4,6-trinitrotoluene. *Journal of Materials Chemistry*, 22, 4720–4727.

223. Wang, H.F., Li, Y., Wu, Y.Y., He, Y. and Yan, X.P. (2010). Ascorbic acid ınduced enhancement of room temperature phosphorescence of sodium tripolyphosphate-capped Mn-doped ZnS quantum dots: Mechanism and bioprobe applications. *Chemistry: A European Journal*, 16, 12988–12994.

224. Zhao,Y. Y., Ma, Y. X., Li, H. and Wang, L. Y. (2012). Composite QDs MIP nanospheres for specific recognition and direct fluorescent quantification of pesticids in aqueous media. *Analytical Chemistry*, 84, 386–395.

225. Zhan, X. S. and Wu, F. Y. (2011). Fluorescent quench assay of sulfadiazine sodium based on Mn-doped ZnS quantum dots. *Fenxi Ceshi Xuebao*, 30, 254–258.

226. Zhang, P., Jin, J. and Yaowu, P. (2011). Doped quantum dots for chemo/biosensing and bioimaging. *Fenxi Zazhi*, 31, 1175–1180.

227. Banerjee, S., Kar, S., Perez, J. M. and Santra, S. (2009). Quantum dot-based OFF/ON probe for detection of glutathione. *Journal of Physical Chemistry C*, 113, 9659–9663.

228. Ma, Q., Yu, W., Huang, H. and Su, X. G. (2011). Determination of l-tyrosine based on luminescence quenching of Mn-doped ZnSe quantum dots in enzyme catalysis system. *Journal of Fluorescence,* 21, 125–131.

229. Gao, X., Tang, G. C. and Su, X. G. (2012). Optical detection of organophosphorus compounds based on Mn-doped ZnSe D-dot enzymatic catalytic sensor. *Biosensors and Bioelectronics,* 36, 75–80.

230. Ren, H.B. and Yan, X.P. (2012). Ultrasonic assisted synthesis of adenosine triphosphate capped manganase-doped zns quantum dots for selective room temperature phosphorescence detection of arginine and methylated arginine in urine based on supramolecular Mg^{+2} adenosine triphosphate. *Talanta*, 97, 16–22.

231. Wu, P., He, Y., Wang, H.F. and Yan, X.P. (2010). Conjugation of glucose oxidase onto Mn-doped ZnS quantum dots for phosphorescent sensing of glucose in biological fluids. *Analytical Chemistry*, 82, 1427–1433.

232. Geszke-Moritz, M., Clavier, G., Lulek, J. and Schneider, R. (2012). Copper- or manganese-doped ZnS quantum dots as fluorescent probes for detecting folic acid in aqueous media. *Journal of Luminescence*, 132, 987–991.

233. Mıstık, R. (2000). Aminoglikozid antibiyotikler ve günde tek doz kullanımları. *Klimik Dergisi*, 13(2), 43-45.

234. De Almeida, A.F. (1991). *Antibiotics in clinical practice.* Basel: Recom Publisher, 49-54.

235. Gilbert, D.N. (1995). *Aminoglycosides: Principles and practice of ınfectious diseases.* (4rd Edition). New York: Churchill Livingstone, 279-306.

236. Kılıçturgay, K. (1992). *Antimikrobiyal kemoterapi: Klinik uygulama ve yenilikler.* Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayınları, 17, 98-103.

237. Willke, A. (1994). *Klinik uygulamada antibiyotikler ve diğer antimikrobiyal ajanlar.* Ankara: Feryal Matbaası, 154-62.

238. Ünal, S. ve Akalın, H. E. (1994). Klinik uygulamada antibiyotikler ve diğer antimikrobiyal ajanlar. Ankara: Ankara Feryal Matbaası, 163-70.

239. Barza, M., Ioannidis, J.P.A., Cappelleri, J.C. and Lau, J. (1996). Single or multiple daily doses of aminoglycosides: a meta-analysis. *British Medical Journal,* 45, 312-338.

240. Drew, R.B. and Susla, G.M. (1974). Once-daily aminoglycoside therapy. *Infectious Diseases in Clinical Practice,* 5, 12-24.

241. Labovitz, E., Levison, M.E. and Kaye, D. (1974). Single-dose daily gentamicin therapy in urinary tract infection. *Antimicrobial Agents and Chemotheraphy*, 6, 463-70.

242. Lacy, M.K., Nicolau, D.P., Nightingale, C.H. and Quintiliani, R. (1998). The pharmacodynamics of aminoglycosides. *Clinical Infectious Disease*, 27, 23-7.

243. Zhanel, G.G. and Craig, W.A. (1994). Pharmacokinetic contibutions to postantibiotic effects: focus on aminoglycosides. *Clincaş Pharmacokinetics*, 27, 377, 92.

244. Cunningham, R., Forero-Martinez, N.C., Hardacre, C., Youngs, T.G.A. and Migaud, M.E. (2016). Solubility study of tobramycin in room temperature ionic liquids: An experimental and computational based study. *Communication*, 6, 107214–107218.

245. Mukhtar, N. H., Mamat, N. A. and See, H. H. (2018). Monitoring of tobramycin in human plasma via mixed matrix membrane extraction prior to capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 158, 184-188.

246. Lode, H. (1998). Tobramycin: A review of therapeutic uses and dosing schedules. *Current Therapeutic Research*, 59, 420-53.

247. Pilcer, G., Sebti, T. and Amighi, K. (2006). Formulation and characterization of lipid-coated tobramycin particles for dry powder inhalation. *Pharmaceutical Research*, 23, 931-940.

248. Neu, H.C. (1976). Tobramycin: An overview. *Journal of Infectious Disease*, 134, 3-19.

249. İnternet: TOBRASED, (2007). *Tobramisin % 0.3, Steril Göz Damlası,* Web: http://www.bilimilac.com.tr/tr/dosyalar/urun-portfoyu/urunler/tobrasedgoz-damlasi-p5v1.pdf, adresinden 26.04.2020'de alınmıştır.

250. Weinstein, M.P., Patel, J. B. and Burnham, C.A. (2009). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, M07, M07-A10.

251. İnternet: Novartis, Web: https://www.novartis.com.tr/sites/www.novartis.com.tr/files/Tobrexcozelti-KT-05.10.2017.pdf, adresinden 26.04.2020'de alınmıştır.

252. Gaikwad, A., Gómez-Hens, A. and Pérez-Bendito, D. (1993). Kinetic fluorimetric method for the determination of tobramycin by stopped-flow mixing methodology. *Analytical Letters*, 26 (1), 97-107.

253. Qiang, M.A., Wang, Y., Jia, J. and Xiang, Y. (2018). Colorimetric aptasensors for determination of tobramycin in milk and chicken eggs based on DNA and gold nanoparticles. *Food Chemistry*, 249, 30, 98-103.

254. Mashat, M., Chrystyn, H., Clark, B.J. and Assi, K.H. (2008). Development and validation of HPLC method for the determination of tobramycin in urine samples post-ınhalation using pre-column derivatisation with fluorescein isothiocyanate. *Journal of Chromatography B*, 15, 869(1-2), 59-66.

255. Russ, H., McCleary, D., Katimy, R., Montana, J.L., Miller, R.B., Krishnamoorthy, R. and Davis, C. W. (1998). Development and validation of a stability-indicating HPLC method for the determination of tobramycin and ıts related substances in an ophthalmic suspension. J*ournal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 21, 14.

256. Megoulas, N. C. and Koupparis, M. A. (2005). Development and validation of a novel HPLC/ELSD method for the direct determination of tobramycin in pharmaceuticals, plasma, and urine. A*nalytical and Bioanalytical Chemistry*, 382, 290–296.

257. Barends, D.M., Zwaan, C.L. and Hulshoff, A. (1981) Micro-determination of tobramycin in serum by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 225(2), 417-426.

258. Keevila, B. G., Lockharta, S. J. and Cooperb, D. P. (2003). Determination of tobramycin in serum using liquid chromatography–tandem mass spectrometry and comparison with a fluorescence polarisation assay. *Journal of Chromatography B*, 794, 2, 329-335.

259. González-Fernández, E., de-los-Santos-Álvarez, N., Lobo-Castañón, M.J., Miranda-Ordieres, A.J. and Tuñón-Blanco, P. (2011). Aptamer-based ınhibition assay for the electrochemical detection of tobramycin using magnetic microparticles. *Electroanalysis*, 23(1), 43-49.

260. González-Fernández, E., Santos-Álvarez, N., JesúsLobo-Castañón, M., Ordieres, A. J. M. and Blanco, P. T. (2011). Impedimetric aptasensor for tobramycin detection in human serum. *Biosensors and Bioelectronics,* 26(5)15, 2354-2360.

261. Chen, L., Xu, F. and Li, J. (2011). Recent advances in molecular imprinting technology: current status, challenges and highlighted applications. *Chemical Society Reviews*, 40, 2922–2942.

262. Sun, N., Mo, W. M, Shen, Z. L. and Hu. B. X. (2005). Adsorptive stripping voltammetric tech-nique for the rapid determination of tobramycin on the hanging mercuryelectrode. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 38, 256-262.

263. Hanko, V.P. and Rohrer, J.S. (2006). Determination of tobramycin and impurities usinghigh-performance anion exchange chromatography with integrated pulsedamperometric detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 40, 1006-1012.

264. Fonge, H., Kaale, E., Govaerts, C., Desmet, K., Van Schepdael, A. and Hoogmartens, J. (2004). Bioanalysis of tobramycin for therapeutic drug monitoring by solid-phase extraction and capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography B,* 810(2), 313-318.

265. Ma, Q., Wang, Y., Jia, J. and Xiang, Y. (2018). Colorimetric aptasensors for determination of tobramycin in milk and chicken eggs based on DNA and gold nanoparticles. *Food Chemistry*, 249, 98-103.

266. Gupta, V.K., Yola, M.L., Özaltın, N., Atar, N., Üstündağ, Z., Uzun, L. (2013). Molecular imprinted polypyrrole modified glassy carbon electrode forthe determination of tobramycin. *Electrochimica Acta,* 112 (2013) 37– 43.

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı	: YILMAZ, Hüma
Uyruğu	: T.C.
Doğum tarihi ve yeri	: 15 / 03 / 1988/ Trabzon
Medeni hali	: Bekar
Telefon	: +90 539 339 14 79
e-mail	: yilmaz.huma@gmail.com

Eğitim Derecesi	**Eğitim Birimi**	**Mezuniyet Tarihi**
Doktora	Gazi Üniversitesi / Analitik Kimya Anabilim Dalı	Devam ediyor
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi / Analitik Kimya Anabilim Dalı	2014
Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi/ Kimya Bölümü	2011
Lise	Trabzon Fatih Lisesi	2005

İş Deneyimi, Yıl	**Yer**	**Görev**
2011-devam ediyor	Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce, Fransızca, Almanca

Yayınlar

Poster Bildirileri

1. Yilmaz, H., Atal, S., Koç, M., Serdaroğlu, V., Tatlıdil, İ,. Buruk, C.K. ve Sökmen, M., (2011). *Preparation and Antibacterial Properties of Silver and Cobalt Loaded Nano TiO2 Particles*. National VII. Nanotechnology Congress, Sabancı Üniversity, İstanbul, 84.

2. Yilmaz, H., Torul, H., Ciftci, H., Boyaci, I. H. ve Tamer, U. (2012*). Floride Ion Determination Based On Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*. 10th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS), Ankara, 258.

3. Gorbani, Y., Yilmaz, H. ve Basan, H. (2014). Selective Extraction of Atenolol Using Molecularly Imprinted Polymers, 1st National Biosensors Symposium, Tekirdağ.

4. Gorbani, Y., Yilmaz, H. ve Basan, H. (2015). *Spectrofluorimetric Determination of Atenolol From Human Urine Using Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction.* 1st Gazi Pharmacy Symposium Series, Antalya.

5. Yilmaz, H. ve Basan, H. (2016). *Preconcentration of indapamide from human urine using molecularly imprinted solid-phase extraction*. The 9th International Conference on Molecular Imprinting (MIP2016), Lund, İsveç.

6. Yilmaz, H., Ertaş, N. ve Basan, H. (2016). *Development of a phosphorescence sensor based on surface molecularly imprinted Mn-dopped ZnS quantum dots for selective recongnition of melamine*. The 9th International Conference on Molecular Imprinting (MIP2016), Lund, İsveç.

7. Yilmaz, H. ve Basan, H. (2016). *Determination of telmisartan using moleculary imprinted solid-phase extraction spectrofluorimetric method from human urine*. The 9th International Conference on Molecular Imprinting (MIP2016), Lund, İsveç.

8. Yilmaz, H., Ertaş, N. ve Basan, H. (2017). *Synthesis of a Phosphorescence Sensor Based on Surface Imprinted Mn-doped ZnS Quantum Dots for Sensing Cefdinir*. 10th Deutsch/1st European Biosensor Symposium, Potsdam, Germany.

9. Yilmaz, H., Ertaş, N. ve Basan, H. (2017). *Surface Molecularly Imprinted Inorganic Polymer Capped Mn-doped ZnS Quantum Dots as a Phosphorescent Sensor for Detecting Tobramycin.* 2. Gazi Pharmacy Symposium Series, Ankara.

10. Aktürk, M., Yılmaz, H., Akbaba, T., Ertaş, N. ve Basan, H. (2017). *Development of hybrid organic-inorganic surface imprinted Mn-doped ZnS QDs as a Phosphorescent Sensor for the Recognition and Detection of Tobramycin.* 2. Gazi Pharmacy Symposium Series, Ankara.

11. Yilmaz, H., Ertaş, N. ve Basan, H. (2019). *A Selective Phosphorescent Sensor for Cefdinir Detection Using Surface Imprinted Polymers Coated Mn-Doped ZnS Quantum Dots*. 4th International Congress on Biosensors, Çanakkale.

Sözlü Bildirileri

1. Yilmaz, H. ve Basan, H. (2013). *Molecularly imprinted solid-phase extraction of indapamide.* 6th Black Sea Basin Conference on Analytical Chemistry, Blacksea Technical University (6BBCAC), Trabzon.

Bilimsel Yayınları

1. Yilmaz, H. ve Basan, H. (2015). Development of a molecularly imprinted solid-phase extraction sorbent for the selective extraction of telmisartan from human urine. *Journal of Separation Science*, 38(8), 1433-1439.

2. Yilmaz, H. ve Basan, H. (2015). Preconcentration of indapamide from human urine using molecularly imprinted solid-phase extraction. *Journal of Separation Science*, 38(17), 3090-3095.

3. Gorbani, Y., Yilmaz, H. ve Basan, H. (2017). Spectrofluorimetric determination of atenolol from human urine using high affinity molecularly imprinted solid-phase extraction sorbent, *Luminescence***,** 32(8), 1391-1397.

4. Basan, H. ve Yilmaz, H. (2020). Molecularly Imprinted Polymers as Recognition and Signaling Elements in Sensors. *Switchable Bioelectronics*. New York: Jenny Stanford Publishing, 161-175.

İlgi (Çalışma) Alanları

Moleküler baskılanmış polimerler, spektroskopik yöntemler, nanopartiküller, floresant ve fosforesant sensörler, biyosensörler, katı faz ekstraksiyonu, kuantum noktacıklar, ilaç etken maddeler.

Hobileri

Resim yapmak, bisiklet yarışları izlemek, bisiklet sürmek, iron maiden sololarını dinlemek, bilim felsefesi ve rus edebiyatı üzerine araştırmalar yapmak, üzüm bağlarını gezmek, seyahat etmek ve fotoğraf çekmek.



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR…

