

# Seçilmiş hedef moleküllere duyarlı polimerik jel sentezi ve fiziksel parametrelerin seçicilik üzerine etkisi

Ali GELİR\*, Yaşar YILMAZ

İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Fizik Mühendisliği Programı, 34469, Ayazağa, İstanbul

## Özet

*Moleküler algılama; farklı türden molekülün bulunduğu bir ortamda, sadece belli bir molekülün, çoğunlukla zayıf fiziksel etkileşimler aracılığıyla algılayıcı sisteme dönüşümlü olarak bağlanması ve salıverilmesi olarak tanımlanır. Biyolojik sistemlerde gözlemlenen moleküller arası özgün etkileşimlerin taklit edilerek endüstriyel amaçlı çalışmalara uygulanması son 20 yılın hızlı gelişen, disiplinler arası çalışma sahası haline gelmiştir. Yapay polimerler ya da polimerik jeller çok farklı özelliklere sahip monomerlerle sentezlenebilmektedir ve bunların özel bir teknikle (kalıplama tekniği) sentezlenmesi durumunda, biyolojik sistemlerde olduğu gibi, doğal seçici sistemlere benzer davranış gösteren yapay sistemlerin geliştirilebileceği düşünülebilir. Bu çalışmada hedef molekül olarak belirlenen floresans özelliğe sahip piranin molekülüne duyarlı jel sentezlenmesi ve bu jelin moleküller algılama kabiliyetinin jelin kompozisyonuna ve sıcaklık, pH, iyon derişimi gibi çevresel faktörlere bağlılığının araştırılması hedeflenmiştir. Karakterizasyon yöntemi olarak floresans spektroskopisi tekniği kullanılmıştır. Bu yöntemin en önemli üstünlükleri etkileşimler hakkında oldukça zengin bilgi vermesi, uygulama kolaylığı ve maliyetinin düşük olmasıdır. Bu yöntem ile elde edilen spektrumlar değerlendirilerek jellerin Hafıza kabiliyetleri belirlenmiştir. Bu işlem bu tez kapsamında önerdiğimiz "Hafıza Parametresi" modeli ile gerçekleştirilmiştir. Hedef molekülün jele difüzyonu sonrası, jellerden alınan spektrumlarda meydana gelen dalgaboyu kaymaları yoluyla jellerin algılama kabiliyetleri tanımlanmıştır. Bu yolla tanımlanan ve ölçülen hafıza parametresinin kalıplanmamış jellerde sıfıra yakın çıkarken kalıplanmış jellerde en az 0.6 olarak bulunmuştur. Tezde sıcaklık, hedef molekül ve tuz derişimi, pH gibi parametrelerin algılama sürecine olan etkileri de ayrıntılı olarak tartışılmaktadır.*

**Anahtar Kelimeler:** Moleküler algılama, moleküler kalıplama, floresans spektroskopisi, polimerik jeller.

\*Yazışmaların yapılacağı yazar: Ali GELİR. gelira@itu.edu.tr; Tel: (212) 285 72 44.

Bu makale, birinci yazar tarafından İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Fizik Mühendisliği Programı'nda tamamlanmış olan "Seçilmiş hedef moleküllere duyarlı polimerik jel sentezi ve fiziksel parametrelerin seçicilik üzerine etkisi" adlı doktora tezinden hazırlanmıştır. Makale metni 16.03.2009 tarihinde dergiye ulaşmış, 09.04.2009 tarihinde basım kararı alınmıştır. Makale ile ilgili tartışmalar 30.04.2011 tarihine kadar dergiye gönderilmelidir.

## Synthesis of imprinted gels which sensitive to specific target molecules and the effect of the physical parameters on the sensitivity

### Extended abstract

The molecular recognition is defined as reversible adsorption -by means of weak physical interactions- of a specific molecule from a medium in which different kinds of molecules are exist together. Imitating the specific interactions available in the biological systems, and applying them to industrial applications have been one of rapidly developing interdisciplinary fields of last 20 years. Synthetic polymers or polymeric gels can be synthesized with monomers which have different functional peripheral groups. The physical interactions, like electrostatic, van der Waals, hydrogen bonding, and hydrophilic or hydrophobic, having different nature are possible between the polymer chains themselves, and also between the polymer chains and the solvent molecules. One of the most important properties of polymeric gels is undergoing phase transitions between collapsed and swollen states as a result of external stimuli. Namely, they are the smart materials which respond to external stimuli. This phase transition can be induced by temperature, solvent composition, pH, ionization degree of network, electric field or light. By synthesizing the polymeric gels with a special technique called as imprinting technique, it is possible to construct artificial systems showing similar behaviors with natural selective systems as in the biological systems. In these systems there are three different interactions between the target molecule and the host molecule. These are the covalent, non-covalent and semi-covalent (hybrid) interactions. The targets can be ions and molecules such as metals, small organic molecules like aminoacids, peptide, sugar and large organic molecules like polypeptide, proteins.

In this work it is aimed to synthesis imprinted gels which can recognize the target molecule, pyranine, which is a fluoroprobe, and to study the strength of the recognition as a function of the composition of the gels and the environmental factors such as the concentration of the target molecule, temperature, pH and the concentration of the replacement molecules (NaCl). In these studies fluorescence technique was used as the experimental technique for characterization. Also absorption measurements were

done to verify some of the fluorescence measurements.

No stable dependence of the recognition on the concentration of the target molecules was observed. This is due to both the absence of replacement molecules and the loose network structure of the gel because of the small amount of crosslinker molecules. Since the network structure is very loose, the gel can not keep its initial conformation when it is collapsed. This means that the volume of the collapsed gel is smaller than the initial volume and also the size of the cavities in the gel is smaller. So this change in the sizes of the cavities destroys the imprinting effect. It was observed that at 60°C, although the gels were in collapsed state, the diffused amount of target molecules was the highest. And also the diffusion into the imprinted gel was much bigger than that of the random gel. At this temperature the imprinted gel has the most convenient conformation for the target molecules. But the random gel is not. Its volume is smaller than that of its initial volume. This smaller volume obstructs the diffusion into the random gel. It was observed that the diffusion into the gels at pH=4 is bigger than the other pH values. Since the pH of the conditions of synthesize of the gels were also around 4, it can be concluded that the microstructures of the gels became the most appropriate conformation at this pH value. Presence of the replacement molecules affects the diffusion of target molecules. At moderate concentrations of replacement molecules they bring the target molecules close to each other via the bridges constructed by the electrostatic interactions between  $\text{Na}^+$  and  $\text{SO}_3^-$ . In this case the fluorescence maximum of the target molecules is observed at both 430nm and 506nm. At high concentrations they separate the clusters and the fluorescence spectrum shift to 515 nm completely. The absorption experiments showed that the number of functionality groups of the target molecules was  $3.1 \pm 0.9$  for imprinted gel and  $0.9 \pm 0.1$  for the random gel. These values are very close the values given in literature. The "Recognition Parameter" was defined first time in terms of the shifts in the wavelength of the fluorescence spectra of the gel in which the target molecules were diffused. It was calculated that it was almost zero for non-imprinted gels while it becomes bigger than 0.6 for imprinted gels.

**Keywords:** Molecular recognition, molecular imprinting, fluorescence spectroscopy, polymeric gels.

## Giriş

Moleküler algılama, bir molekülün belli bir atom veya molekülü, birçok atom veya molekül grupları içinden seçip onunla değişik kimyasal ve fiziksel etkileşmelere girerek kendisine bağlamasıdır. Buradaki etkileşmeler daha çok kovalent olmayan elektrostatik, van der Waals, hidrojen bağı, hidrofobik, yük transferi etkileşmesi, metal koordinasyonu, vb. etkileşmelerdir (Lehn vd., 1996). Bu etkileşmelerle beraber seçici molekül algılamayı gerçekleştirmek için kendi konformasyonunu hedef molekülün konformasyonuna göre düzenler (Komiyama vd., 2003).

Moleküler algılama biyolojik ortamlardaki süreçlerin temelini oluşturur. Antikorun vücuda giren yabancı bir molekülü (antijen) algılayıp onu bağlaması moleküler algılamaya güzel bir örnektir. Yine hücre zarı üzerindeki algılayıcılar birçok tür hormon içerisinden sadece belli bir tür hormonu algılayıp onunla etkileşerek onu bağlar ve hormon konformasyonunu vücudun ihtiyaçları doğrultusunda değiştirir (Komiyama vd., 2003).

Moleküler algılama olayının laboratuvar ortamında gerçekleştirme çalışmaları 1930'lu yıllarda Polyakov (1940)'un silika matrisinde çeşitli katkıları seçebilecek yapılar üzerine yaptığı çalışmalar ile başlamıştır. Bugün kullanılan yöntemlerin temeli ise Kriz ve diğerleri (1995), Haupt ve Mosbach (2000), Whitcombe ve Vulfson (2001), Wulf (2002), tarafından oluşturulmuştur. Bu konudaki çalışmalar özellikle 1990'lı yıllardan itibaren çok hızlı bir artış göstermiştir (Alexander vd., 2006). Moleküler algılama olayının deneysel olarak gerçekleştirilebildiği en uygun ortamlar yapay polimerik yapılardır. Bu amaçla tasarlanan polimerik sistemlere "Kalıplanmış Polimerler" adı verilir. Polimerik sistemler içerisinde ise en önemli yapılardan bir tanesi jellerdir. Jeller birbirlerine çapraz bağlayıcı moleküller ile bağlanmış uzun polimer zincirlerinden oluşan ağ yapılardır. Polimerik jellerin en önemli özelliklerinden biri dış etkiler ile büzülüp ve şişebilmeleri yani fiziksel faz geçişi yaparak dış uyarılara cevap verebilen *akıllı* malzemeler olmalarıdır. Bu faz geçişini tetikleyen dış etkiler sıcaklık, çözelti bileşimi, çözelti pH'ı

vb. olabilir (Whitcombe ve Vulfson, 2001; Qiu ve Park, 2001; Ohmine ve Tanaka, 1982; Siegel ve Firestone, 1988). Bu özelliğinin yanında karakterizasyon açısından elverişli bir ortam olması, dayanıklı olmaları ve maliyetlerinin düşük olması moleküler algılama alanındaki çalışmalarda tercih edilmeleri için diğer sebeplerdir.

Literatürde birçok iyon ve molekül için kalıplanmış polimer ve jel sistemleri tasarlanmıştır. Bu iyon ve moleküller, metaller, aminoasit, peptid ve şeker gibi küçük organik moleküller olabildiği gibi polipeptid gibi büyük organik moleküller ve yüksek molekül ağırlıklı proteinlerde olabilmektedir (Güney vd., 2002; Güney 2003; Rachkov ve Minoura, 2001; Shi vd., 1999). Kalıplanmış jel tasarımında seçici molekül ile hedef molekül arasında kovalent, kovalent olmayan ve yarı kovalent (hibrid kalıplama olarak da adlandırılır) şeklinde üç farklı türden etkileşme olmaktadır. Kovalent etkileşme göz önüne alınarak yapılan kalıplama çalışmalarında hedef molekül seçici molekül ile kovalent bağ yapmaktadır (Wulf, 1982). Sentez sonrası hedef moleküller çeşitli kimyasal işlemler ile sökülmemekte ve kalıplanmış jel oluşturulmaktadır. Bu yöntemin en önemli avantajı seçici moleküllerin sadece hedef moleküller ile etkileşiyor olmasıdır. Kovalent olmayan etkileşmelerde ise hedef molekül seçici molekül ile hidrojen bağı, elektrostatik, dipol-dipol etkileşmeleri gibi etkileşmeler yapar ve sentez öncesi seçici molekül ile hedef molekülün kompleks bir yapı oluşturması gerekir (Sällergren, 1989). Yarı kovalent etkileşmede ise sentez sırasında hedef molekül ile seçici molekül birbirlerine kovalent olarak bağlanmaktadır. Kimyasal işlemler sonucunda hedef moleküllerin temizlenmesi ile kalıplanan jeldeki algılama süreci hedef molekül-seçici molekül arasındaki kovalent olmayan etkileşmelerle meydana gelir (Umpleby vd., 2000). Kalıplanmış polimer ve jellerin teknolojik olarak önemli uygulama alanları vardır. Bunlardan bazıları şunlardır: Kontrollü ilaç salınımı ve taşınması (Peppas vd., 1999, Bures vd., 2001), biyoteknolojik uygulamalar (Lye ve Woodley, 1999, Ramstro vd., 1998), gıda endüstrisi (Delacruz vd., 1999), kromatografi (Shea, 1994), çevresel uygulamalar (Janotta vd., 2001), sensör/biyosensör tasarımı (Kriz vd., 1995), vb.

Kalıplanmış polimerik sistemlerin karakterizasyonunda farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bunlara örnek olarak optik yöntemler, yüzey plazmon rezonans spektroskopisi (SPR) ve elektrokimyasal yöntemleri verebiliriz (Baird ve Myszka, 2001; Homola, 2003; Warsinke vd., 2000). Ancak bunların bir kısmının çok yüksek maliyetli deneysel düzenek gereksinimleri olduğu için, bir kısmının da çok dar bir alanda kullanılabilir olduğu için daha genel, düşük maliyetli, kullanımı kolay olan bir yöntem ihtiyacı vardır (Altschuh vd., 2006). Floresans spektroskopisi yöntemi bu ihtiyacın giderilmesi konusunda oldukça iddialı bir yöntemdir. Çünkü bu yöntem son derece hassas, ucuz ve hem kullanımı hem de analizi çok daha rahat olan bir yöntemdir (Lakowicz, 1983; Valeur, 2002). Ve son zamanlarda bu yöntemi baz alarak yapılan önemli çalışmalar vardır (Flint vd., 1998; Altschuh vd., 2006). Floresans spektroskopisi yönteminin diğer yöntemlere olan en büyük üstünlüğü algılama süreci ile ilgili hızlı ve pratik bir şekilde doğrudan bilgi verebiliyor olmasıdır. Bu hem zaman hem de malzeme tasarrufu demektir. Pratik bir yöntem olması sebebiyle de çok küçük ebatlarda modüler el tipi cihaz tasarımına imkan vermekte ve laboratuvar dışı çalışmaları olanaklı kılmaktadır.

Bu çalışmada, difüzyon sonrası jellerden alınan spektrumlarda meydana gelen dalgaboyu kaymaları jellerin algılama kabiliyetlerinin bir ölçüsü olarak kullanılmıştır. Bu kaymalar baz alınarak oluşturduğumuz hafıza parametresi modeli ile de jellerin molekülleri ne kadar hafızalarında tutup algılayabildikleri belirlenmiş ve bu yöntemin bu araştırmalarda uygulanabilirliği ortaya konulmuştur. Buna ek olarak sıcaklık, hedef molekül derişimi, pH, tuz derişimi gibi bazı dış parametrelerin bu algılama sürecine olan etkileri çalışılmıştır.

## Materyal ve yöntem

Çalışmada kullanılan jellerin sentez koşulları şöyledir. 6 M'lık iki çeşit jel dört farklı çapraz bağlayıcı, BIS (N,N'-metilenbisakrilamid), derişimi için hazırlanmıştır. Bu iki çeşit jel kalıplanmış (K) ve rastgele (R) jellerdir. Bu jellerin bileşimleri, 1ml'lik DMSO (Dimetil sulfoksid)

çözücüsü için Tablo 1'de verilmiştir. Kalıplanmış jeller hazırlanmadan önce Tablo 1'de verilen miktar kadar hedef molekül piranin (8-Hidroksi- 1,3,6 piren trisülfonikası trisodyum tuzu) ve algılayıcı molekül maptak (Metakrilamidopropil trimetil amonyum klorid) ayrı bir kapta iyice karıştırılıp kompleks oluşumu için beklemeye bırakılmıştır. Bu işlemden sonra 2716 mg NIPA (N-isopropilakrilamid) 4 ml DMSO içinde çözülüp içinden 20 dakika kadar azot geçirilmiştir. Dört farklı tüpe sırasıyla 3.1 mg, 9.3 mg, 15.5 mg ve 23.3 mg BIS koyduktan sonra içinden azot geçirilmiş NIPA çözeltisi bu tüplere 1er ml olarak dökülüp ve iyice karıştırılmışlardır. Bu çözeltilere daha önce hazırlanan piranin ve maptak çözeltisi ile 1.64 mg başlatıcı AIBN (Azobisisobutironitril)'de ilave edildikten sonra tüpler vakumlanıp teflon bir kapak ile sıkıca kapatılarak 60°C'de reaksiyon başlatılmıştır. Reaksiyon 24 saat devam ettirilmiştir.

Tablo 1. Kalıplanmış ve Rastgele jellerin kimyasal bileşimleri

jel	NIPA (M)	NIPA (mg)	BIS (mM)	BIS (mg)	AIBN (mM)	AIBN (mg)	MAPTAK (mM)	MAPTAK (µl)	Piranin (mM)	Piranin (mg)
K <sub>1</sub>	6	679	20	3.1	10	1.7	30	12.5	10	5.2
K <sub>2</sub>	6	679	60	9.3	10	1.7	30	12.5	10	5.2
K <sub>3</sub>	6	679	100	15.5	10	1.7	30	12.5	10	5.2
K <sub>4</sub>	6	679	150	23.3	10	1.7	30	12.5	10	5.2
R <sub>1</sub>	6	679	20	3.1	10	1.7	30	12.5	10	5.2
R <sub>2</sub>	6	679	60	9.3	10	1.7	30	12.5	10	5.2
R <sub>3</sub>	6	679	100	15.5	10	1.7	30	12.5	10	5.2
R <sub>4</sub>	6	679	150	23.3	10	1.7	30	12.5	10	5.2
K	2	226	20	3.1	3.3	0.6	30	12.5	10	5.2
R	2	226	20	3.1	3.3	0.6	30	12.5	10	5.2

Rastgele jeller kalıplanmış jeller ile aynı koşullarda sentezlenmişlerdir. Tek fark piranin ve maptak moleküllerinin önceden karıştırılmayıp, diğer tüm moleküller ile beraber konulmuş olmasıdır. Yani jelleşme öncesi piranin ve maptak arasında herhangi bir kompleks oluşturulmamıştır.

Sentezlenen jeller bol miktarda 0.1 M'lık asitte (HCl) ve daha sonra bazda (NaOH) bekletilerek yıkanmışlardır. Yıkamanın başlarında, ilk birkaç gün, yıkama suları sık sık değiştirilmiştir ve yı-

kama işlemi yaklaşık 2 hafta sürmüştür. Difüzyon deneylerinin tamamı 2 ml'lik silindirik cam tüplerde gerçekleştirilmiştir. Örnekler bu tüplere konularak ağızları sıkıca kapatılıp spektrofotometrenin sıcaklık kontrollü ölçüm düzeneğine yerleştirilmiştir. Sıcaklık 60°C'ye ayarlanmış (sıcaklığın değiştirildiği deneylerde uygun sıcaklık değerlerine ayarlanmıştır) ve çözelti sıcaklığı 60°C'ye geldikten sonra daha önce 60°C'deki saf suda çöktürülmüş olan jel çözelti içine atılmıştır. Difüzyon süreci spektrofotometrenin zamana bağlı izleme modunda, çözelti 400 nm'lik uyarma dalgaboyu ile uyarılarak 515 nm'deki emisyon şiddeti izlenmiştir. Çözelti derişiminin değiştirilerek yapılan difüzyon deneyleri,  $10^{-5}$ ,  $5 \times 10^{-6}$ ,  $10^{-6}$ ,  $5 \times 10^{-7}$  M'lık 4 farklı sulu piranin derişiminde gerçekleştirilmiştir. Sıcaklık ve pH'a bağlı yapılan deneyler ise sırasıyla 60°C, 40°C ve 30°C sıcaklık değerlerinde ve pH=2, pH=4, pH=11 değerlerinde yapılmıştır. Çözeltideki tuz derişimine bağlı yapılan difüzyon deneyleri 60°C'lik sıcaklıkta ve 50, 100, 150, 200 mM'lık tuz derişimi içeren  $5 \times 10^{-6}$  M piranin çözeltisi içinde gerçekleştirilmiştir. Deney hem floresans spektroskopisi hem de UV absorpsiyon spektroskopisi yöntemiyle izlenmiştir. Floresans spektroskopisinde difüzyon sonrasında ve jelin şişmiş durumlarında rastgele ve kalıplanmış jellerin spektrumları alınmıştır. UV absorpsiyon çalışmasında ise 60°C'lik bir ısıtıcının üzerinde başlatılan difüzyon deneyinden belli aralıklarla 10'ar mikrolitre örnekler alınıp UV spektrofotometresinin ölçüm kabına eklenerek 403nm'deki absorpsiyon şiddetinin derişimi izlenmiştir.

## Teori

Kalıplanmış jellerin seçeceği molekülleri ne kadar hafızalarında tutup algılayabildiklerinin bir ölçüsü olarak tanımladığımız "hafıza parametresi" aşağıdaki denklem ile verilir:

$$H = \frac{N_3}{N_T} \left[ \frac{4N_3 - N_T}{3N_T} \right] \quad (1)$$

Buradaki  $N_3$ , 3 tane  $SO_3^-$  üzerinden 3 tane maptak molekülü ile etkileşen piranin sayısını,  $N_T$  ise jel içindeki tüm piranin sayısını göstermektedir.

Bazı özel durumlar için hafıza parametresinin hangi değerleri alabileceğine bakalım:

- i)  $N_0 = N_1 = N_2 = 0$ ,  $N_3 = N_T$  olduğu yani bütün piranin moleküllerinin 3 tane  $SO_3^-$  üzerinden etkileştiği durum. Bu durumda  $H = 1$  bulunur. Yani jel tamamen hedef molekülü tanımaktadır.
- ii)  $N_0 = N_1 = N_2 = N_3 = N$  olduğu yani bütün etkileşmeler eşit olasılıkla olmakta olduğu durum. Bu durumda  $H = 0$  olur. Bu durum zaten iyi bir kalıplamanın olmadığı bir durumdur.
- iii)  $N_3 = 0$  olduğu durum. Bu durumda  $H=0$  değeri elde edilir. Buda beklenen bir durumdur. Çünkü eğer jel içerisinde beklenen etkileşme hiç olmuyorsa bu jel rastgele bir jeldir.

Hafıza parametresini floresans emisyon şiddetleri cinsinden verebilmek için aşağıdaki tanımlamaları yapmalıyız:

$$N_T = I_\zeta^b - I_\zeta^s = \Delta I_\zeta \quad (2)$$

Bu denklemdeki  $I_\zeta^b$ ,  $I_\zeta^s$  ve  $\Delta I_\zeta$  sırasıyla çözeltide difüzyon başlangıcında, sonundaki şiddetleri ve bunlar arasındaki farkı göstermektedirler. Olabilecek en fazla fonksiyonel grup üzerinden etkileşen molekül sayısı ise

$$N_3 = \frac{I_g(\lambda_3)}{I_g^T} \Delta I_\zeta \quad (3)$$

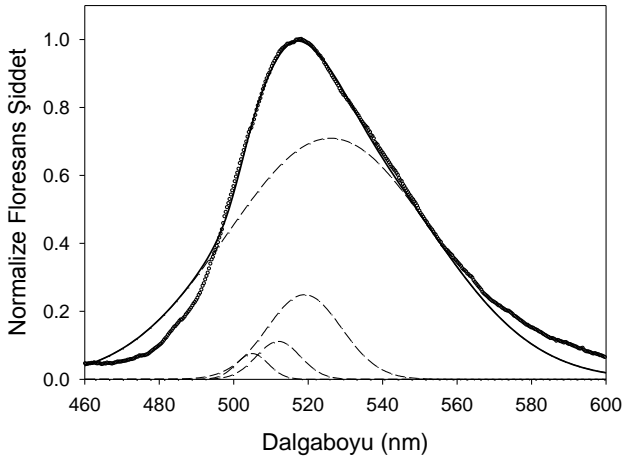
Şeklinde ifade edilir. Buradaki  $I_g^T$  jelden alınan floresans spektrumun toplam şiddetini,  $I_g(\lambda_3)$  ise bu spektrumda hedef molekülün 3 tane fonksiyonel grup üzerinden etkileştiğinde yapacağı emisyon dalgaboyundaki şiddeti göstermektedir. Bu ifadeleri ve  $R = I_g(\lambda_3) / I_g^T$  kullanarak Denklem 4'ü elde edebiliriz.

$$H = \frac{1}{3} R(4R - 1) \quad (4)$$

Hafıza parametresinin hesaplanabilmesi için jelden alınan spektrumun içinde her bir fonksiyonel grup üzerinden etkileşen piranin sayısını çıkartabilmek gerekir. Bunu yapmak için ilk önce piranin molekülünün floresans özellikleri iyi

bilinmeli ve her bir fonksiyonel grup üzerinden yaptığı etkileşimde floresans spektrumunun ne olacağını belirlenmiş olması gerekmektedir. Bu çalışma içerisinde yapılan deneyler sonucunda hiç etkileşime yapmayan piranin molekülünün 505 nm'de emisyon yaptığı ve her bir fonksiyonel grup üzerinden etkileşiminin bu emisyonu 7 nm yüksek dalgaboyuna doğru kaydıracağı belirlenmiştir. Bu gözlem yakın bir zaman yayınladığımız çalışmadaki sonuçlar ile uyumludur (Yılmaz vd., 2009).

Bu adımdan sonra jelden alınan floresans spektrumu, merkezleri 505 nm, 512 nm, 519 nm ve 526 nm'de olan 4 tane Gauss fonksiyonuna fit edilmiştir. Elde edilen 526 nm'deki Gauss fonksiyonunun alanı (maksimum fonksiyonel grup üzerinden etkileşen piranin moleküllerinin sayısı ile orantılı) toplam alana bölünerek ve Denklem 4'de yerine konularak hafıza parametresi hesaplanmıştır. Bu yöntemle ilişkin örnek bir spektrum Şekil 1'de verilmiştir. Bu şekilde içi boş daireler deneysel verileri, kesikli çizgiler bu spektrumu oluşturduğu düşünülen 4 tane Gauss fonksiyonunu ve sürekli çizgide bunların toplamını göstermektedir. Şekle bakıldığında uyumun kuyruklar haricinde gayet iyi olduğu görülmektedir.



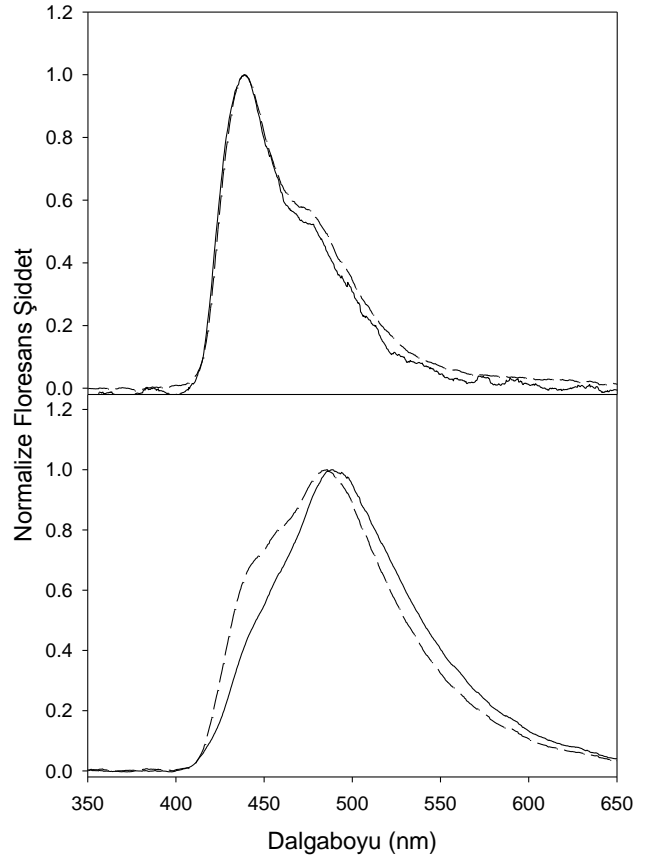
Şekil 1. Jelden alınan spektrumun bileşenlerini gösteren spektrum

## Deneysel çalışma sonuçları

### Jelleşme süreci

Şekil 2'de R4 ve K4 jellerindeki piranin moleküllerinin jelleşme öncesi ve sonrası 400 nm'lik

uyarma dalgaboyu ile alınan normalize floresans şiddetleri verilmiştir. Jelleşme öncesi her iki jel arasında önemli bir fark yokken, jelleşme sonrası farklılıklar görülmektedir. Ekzimer şiddetine göre yapılan normalizasyonda rastgele jelde 430 nm civarında kompleks yapı içindeki piranine ait şiddet yok olurken kalıplanmış jelde bu dalga boyundaki şiddet gözlemlenmektedir (Şekil 3).

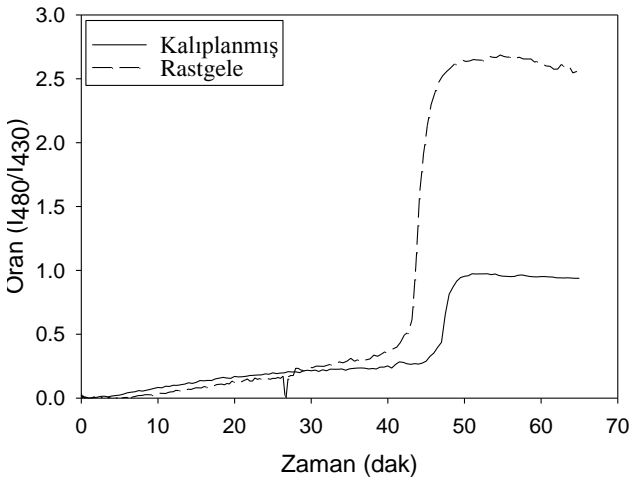


Şekil 2. 6M Rastgele (R4) ve Kalıplanmış (K4) NIPA jellerinin, jelleşme öncesi (a) ve sonrası (b) spektrumları

### Difüzyon süreci

*Piranin derişiminin değiştiği durum-* Şekil 4'te K1 ve R1 jellerinin dört farklı piranin çözeltisi içinde, piraninin 400 nm'lik uyarma sonucunda gönderdiği 515 nm'deki emisyon şiddetinin zamana göre değişimi verilmiştir. Şekillerden görüldüğü gibi 515 nm'deki şiddet bütün örnekler için azalmaktadır. Buda çözelti içindeki piranin moleküllerinin miktarının azaldığını dolayısıyla piranin moleküllerinin jel içine difüzyon yoluyla girdiğini göstermektedir. Bazı piranin derişimlerinde ( $5 \times 10^{-6}M$ ,  $10^{-6}M$ ) jelle giren piranin mole-

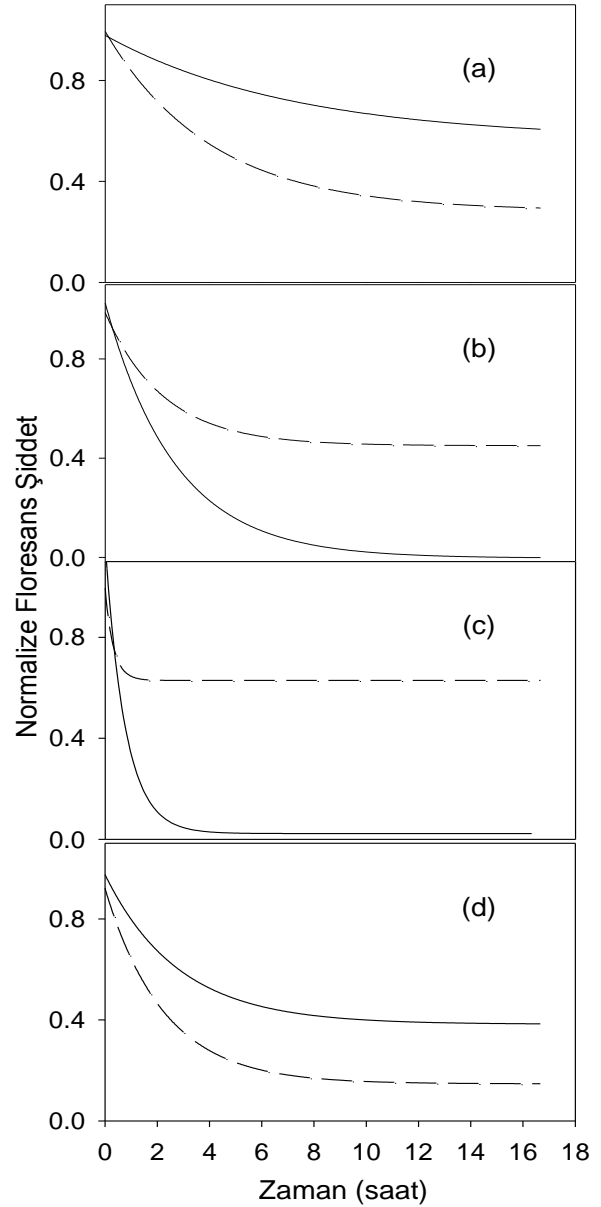
külü miktarı kalıplanmış jel için oldukça fazladır. Diğer iki derişim değeri ise rastgele jel için fazladır. Yani kararlı bir değişim yoktur. Bunun iki nedeni vardır. Birincisi difüzyon deneylerinde herhangi bir elektrolit (tuz) kullanılmamıştır. Elektrolitin yokluğunda pıranin molekülleri bir bacadan da, iki bacadan da, üç bacadan da maptak molekülleri ile etkileşebilmektedirler. Halbuki jelin seçici olabilmesi için çoğunlukla üç bacadan bağlama yapması gerekmektedir.



Şekil 3. R4 ve K4 jellerinin jelleşme sürecinde Ekzimer ( $I_{480}$ )/Monomer ( $I_{430}$ ) oranının zamanla değışimi

Belli miktardaki elektrolitin varlığı seçiciliği mümkün hale getirebilmektedir (Ito vd., 2003). İkinci bir etkide çapraz bağlayıcı (BIS) derişiminin az yani jeldeki ağ yapının daha gevşek olmasıdır. Düşük BIS derişimlerinde jel içerisinde yeteri kadar büyük boşluklar kalabilmekte ve bu boşluklar özel geometrik şekil kazanmamaktadır (Oya vd., 1998; Ito vd., 2003). Reaksiyon anında istenilen geometriyi kazanmış bölgelerde tekrar şişme ve çökme durumunda geometrilerini koruyama-maktadırlar. Buda jelin seçicilik özelliğinin azalması hatta yok olması demektir.

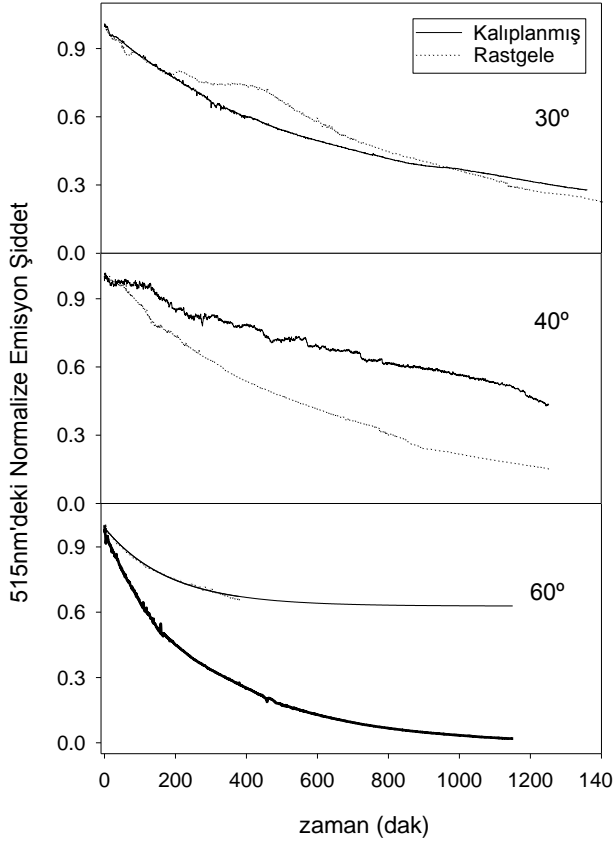
*Sıcaklığın değıştirildiği durum-* Difüzyon süreci boyunca pıranin molekülünün 515nm'deki emisyon şiddeti zamana bağlı olarak gözlemlenmiş ve sonuçlar tüm sıcaklıklar için K4 ve R4 jellerini içerecek şekilde Şekil 5'te verilmiştir.



Şekil 4. İçinde aynı ölçü ve miktarlarda K1 ve R1 jeli bulunan değışik pıranin derişimlerinde floresans şiddetlerinin zamanla değışimi (Pıranin derişimleri: (a)= $10^{-5}M$ , (b)= $5 \times 10^{-6}M$ , (c)= $10^{-6}M$ , (d)= $5 \times 10^{-7}M$ )

30°C'deki difüzyona bakıldığında kalıplanmış ve rastgele jeller arasında herhangi bir fark görülmemektedir. Çünkü her iki jelde şişmiştir ve pıranin moleküllerinin difüzyonunun kolay olabilmesi için yeteri kadar geniş gözeneklere sahiptirler. 40°C'de ise rastgele jelde daha fazla pıranin molekülü difüzyonunun görmekteyiz. Bu sonucun kalıplanmış ve rastgele jellerin mikro yapılarının zaman içinde nasıl düzene girdiği





Şekil 5. Değişik sıcaklıklarda K4 ve R4 jelleri için difüzyon süresince piranin çözeltisinden alınan spektrumun 515nm'deki emisyon şiddetinin zamanla değişimi

hakkında hatta kalıplama etkisi ile ilgili bilgi verebileceği düşünülebilir. Çünkü 40°C jelin tam çökme sıcaklığı değildir. Jel hala belli miktar şişmiş durumdadır. Ancak kalıplanmış jelde jelin reaksiyon anındaki geometrik düzenine doğru hızlı bir gidiş söz konusudur. Rastgele jelde ise böyle bir durumdan bahsedemeyiz. Ayrıca rastgele jel bu sıcaklıkta kalıplanmış jele göre daha büyük gözeneklere sahiptir. Bundan dolayı da daha fazla piranin molekülü difüzyonu gözlemlenmektedir. 60°C'de ise kalıplanmış jel reaksiyon (kalıplama) anındaki çökme durumuna yani en uygun geometrik düzene gelmiştir. Rastgele jelin ise başlangıçtaki geometrik yapısından daha küçük bir geometrik yapıya geldiğini söyleyebiliriz. Çünkü reaksiyon anında jel içinde piranin molekülleri vardı ancak difüzyon deneyleri öncesinde jeller tamamen yıkanmış ve piranin moleküllerinin büyük bir çoğunluğu çıkartılmıştır. Daha önce piranin molekülleri bulunan gözenekler piranin moleküllerinin dışarı

çıkması sonucu çökmüşler ve jelin daha küçük bir hacime gelmesine neden olmuşlardır. Kalıplanmış jelde de piranin molekülleri yıkama sonucu dışarı çıkartılmışlardır. Ancak reaksiyon anında oluşan ve 3 pozitif yüklü maptak molekülü içeren piranin yuvalarının geometrisi korunmaktadır. Bu 3 pozitif yüklü maptak moleküllerinin arasındaki elektrostatik etkileşme jelin büzülme yönünde yaptığı baskıyı dengelemekte ve yuvaların geometrisini koruyarak jelin en uygun geometrik düzende kalmasını sağlamaktadırlar. Yıkanmış rastgele jelin daha küçük bir geometrik yapıya gelmesi piranin moleküllerinin bu jel içine difüzyonunu zorlaştırmakta ve bu yüzden kalıplanmış jelde difüzyon yoluyla giren piranin miktarı çok daha fazla olmaktadır.

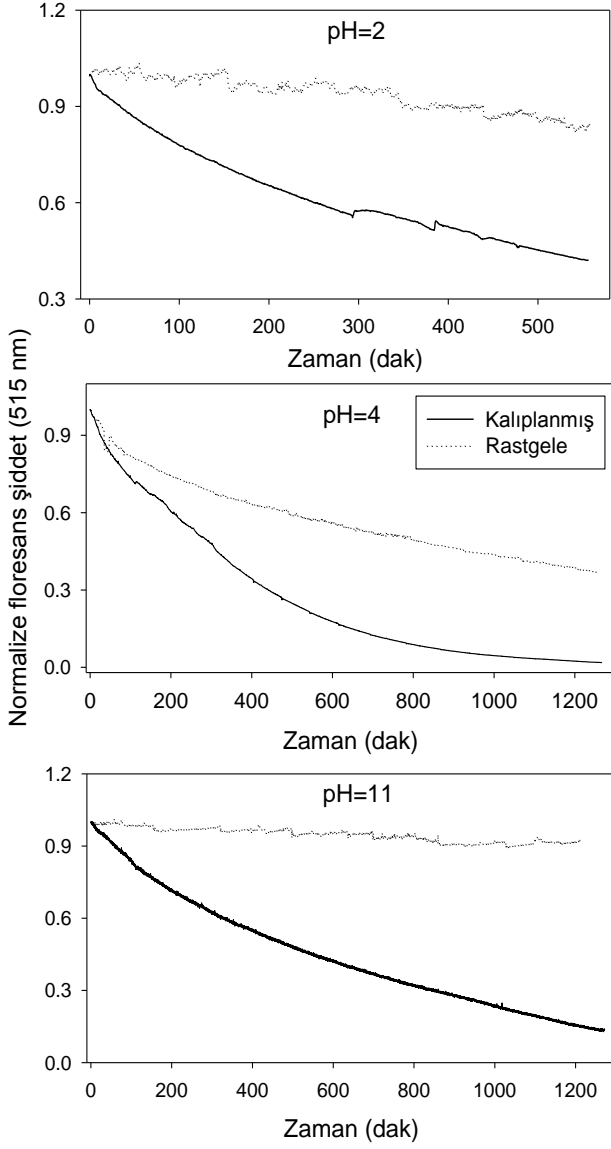
*pH'in değiştirildiği durum-* Şekil 6'da her pH değeri için K3 ve R3 jellerine piranin difüzyonunun zamanla değişimi karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Zamanla izlenen büyüklük, çözelti içindeki piranin molekülünün 515 nm'deki emisyon şiddetidir. Zaman ilerledikçe bu şiddet azalmakta buda piranin moleküllerinin jel içine difüzyon yoluyla girdiğini göstermektedir.

Bu şekilden her pH değeri için kalıplanmış jele difüzyon yolu ile giren piranin miktarı rastgele jelden daha büyüktür. Bunun en önemli sebebi jellerin mikro yapılarının birbirlerinden farklı olmalarıdır. Rastgele jel içinde oldukça büyük gözenekler mevcuttur, yani daha heterojen bir yapıya sahiptir. Bu büyük gözeneklerin sebebi reaksiyon anında kümeler haline gelip jelin bazı bölgelerinde biriken moleküllerdir. Jel yıkanınca bunlar dışarı çıkmış ve yerlerinde büyük boşluklar bırakmışlardır. İşte difüzyon esnasında bu boşluklarda biriken moleküller jelin içi ve dışı arasında meydana getirdikleri iyon dengesi dolayısıyla difüzyonun yavaşlayıp sonlanmasına neden olmaktadır.

*Tuz derişiminin değiştirildiği durum-* Şekil 7 ve 8'de R4 ve K4 jellerindeki piranin moleküllerinin 403nm'deki absorpsiyon değerinin tuz derişimi logaritmasına göre değişimi verilmiştir.

Tanaka tarafından oluşturulan duygunluk modeline göre duygunluğun tuz derişimi ile değişimi Denklem 5 ile verilir (Ito, vd., 2003).





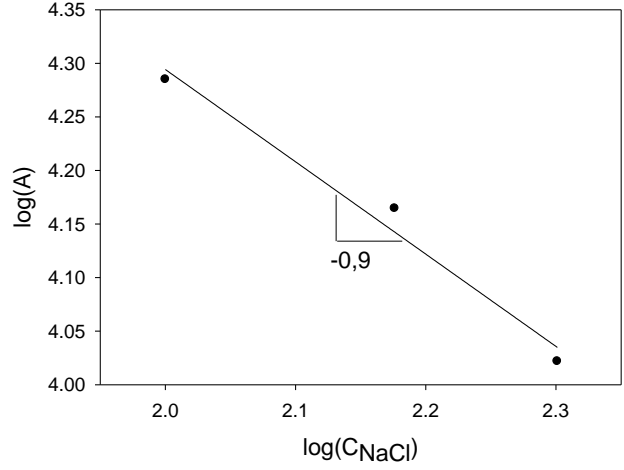
Şekil 6. Değişik pH değerlerindeki  $5 \times 10^{-6} M$  piranin çözeltisi içindeki K3 ve R3 jellerine piranin difüzyonu sürecinde piranin molekülünün 515nm'deki emisyon şiddetinin zamana göre değişimi

$$A \propto C_{NaCl}^{-p} \quad (5)$$

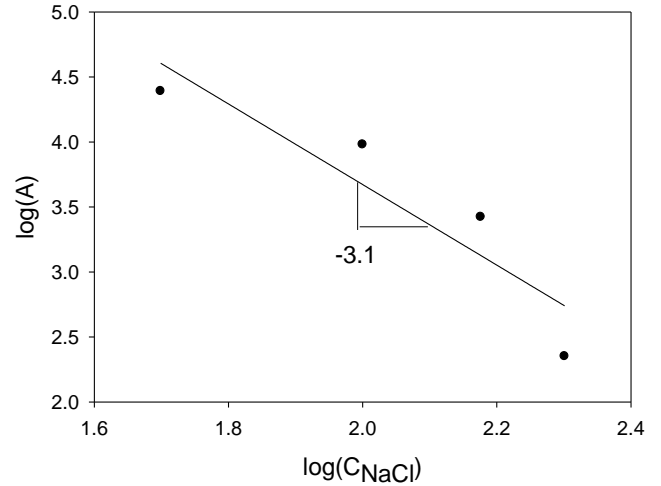
Bu denklemdaki  $A$ ; duyarlılığı,  $p$  ise hedef molekülün yapabileceği etkileşme sayısını vermektedir.

DeneySEL sonuçlarımızı Tanaka modeline göre değerlendirildiğimizde  $p$  değeri rastgele jel için 0.9, kalıplanmış jel içinse 3.1 bulunmuş ve bu değerler daha önce Tanaka tarafından bulunan sonuçlara Ito ve diğerleri (2003) oldukça yakındır. Kalıplanmış jel için 3.1 değerrinin bulun-

muş olması bu jel içinde piranin moleküllerinin kompleks yapı içinde maptak molekülleri ile etkileştiğini göstermektedir. Yani jel oldukça iyi kalıplanmıştır.



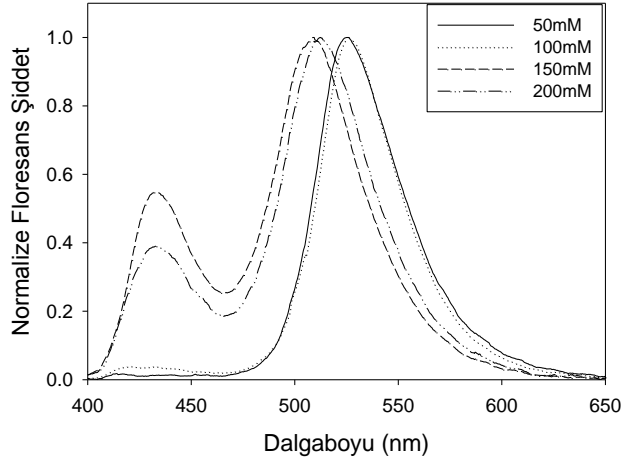
Şekil 7. Rastgele jelin piranin moleküllerine olan duyarlılığının NaCl derişimi ile değişimi



Şekil 8. Kalıplanmış jelin piranin moleküllerine olan duyarlılığının NaCl derişimi ile değişimi

Şekil 9 ve 10'da R4 ve K4 jellerinden difüzyon sonrası alınan spektrumlarında düşük tuz derişimlerinde 525nm civarında gözlemlenen emisyon bize ilk olarak piranin moleküllerinin jel içinde üç tane  $SO_3^-$  grubu üzerinden elektrostatik etkileşme yaptığını göstermektedir. Kalıplanmış jelde bu etkileşmeler jelleşme anında piranin moleküllerine göre uygun geometride oluşan özel boşluklara (kalıplara) giren piranin moleküllerinin buradaki üç tane maptak molekül ile yaptığı elektrostatik etkileşmelerdir. Ancak

rastgele jelde durum biraz farklıdır. Çünkü rastgele jelde kalıplanmış jelde olduğu gibi piranin molekülleri için üç tane maptak molekülünün olduğu özel boşluklar yoktur. Belki çok az miktarda oluşmuş olabilir ancak spektrumda önemli değişikliğe sebep verecek kadar olmadığını tuz derişimini arttırdığımızda spektrumdaki kaymalardan anlamaktayız.

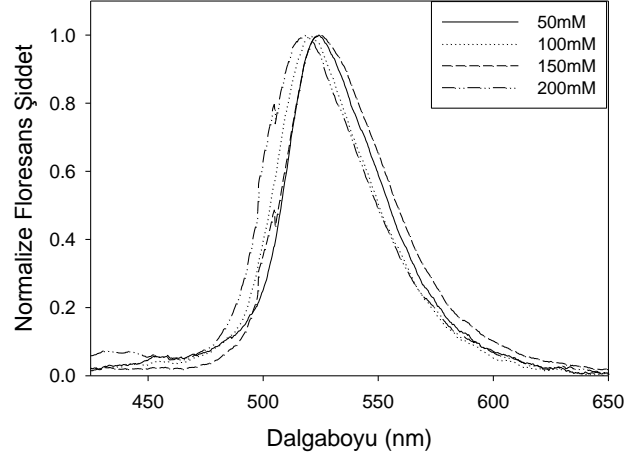


Şekil 9. Değişik tuz derişimlerinde rastgele jelle piranin difüzyonu sonunda jelden alınan floresans spektrumları (uyarma dalgaboyu 400nm'dir)

Rastgele jelde düşük tuz derişimlerinde 525 nm civarındaki emisyon jelin büyük gözenekleri içinde tuz moleküllerinin oluşturduğu köprüler üzerinden kümelenmiş piranin moleküllerinden geldiği olasılığı yüksektir. Piranin molekülleri arasındaki tuz köprüleri piraninin  $SO_3^-$  grupları üzerinden elektrostatik bağlarla gerçekleşmekte ve gözenekler içindeki piranin molekülleri proton transferi yapabilmektedirler. Bu yüzden bu piranin moleküllerinin emisyonu kalıplanmış jelde özel geometrik boşluklarda üç tane maptak ile elektrostatik etkileşerek 525 nm'de emisyon yapan piranin molekülleriyle aynıdır.

Ancak tuz derişimini arttırdığımızda durum farklılaşmaktadır. Yüksek tuz derişiminde piranin kümeleri dağılıp parçalanmış olup her bir  $SO_3^-$  grubu ucunda bir tuz kümesi bulunan piranin molekülleri vardır. Bunların bir kısmı da yüksek  $Na^+$  derişimi dolayısıyla da  $OH$  grubundaki hidrojenini  $Na^+$  ile yer değiştirir. Daha ön-

ce yaptığımız çalışmada da gözlemlediğimiz üzere hidrojenini sodyum ile değiştiren piranin molekülleri 430 nm civarında emisyon yaparlar (Gelir vd., 2007).



Şekil 10. Değişik tuz derişimlerinde kalıplanmış jelle piranin difüzyonu sonunda jelden alınan floresans spektrumları (uyarma dalgaboyu 400 nm'dir)

Yüksek tuz derişiminde gözlemlenen 430 nm'deki emisyon ucunda tuz kümeleri bulunan piranin moleküllerinden gelmektedir. 525 nm'deki emisyonun 510 nm civarına kayması ise  $SO_3^-$  gruplarına takılı olan tuz kümeleri ile olan etkileşme hızının sadece  $Na^+$  ile olan etkileşme hızından daha yavaş olması ve floresans gözlem zamanı içerisinde bu etkileşmelerin sanki yokmuş gibi davranmasından kaynaklanıyor olabilir.

Kalıplanmış jelde ise artan tuz derişimi ile spektrumda birkaç nanometrelik çok küçük kaymalar olmuştur. Bunun sebebi ortamda bulunan bol miktardaki  $Cl^-$  iyonlarının özel geometrideki boşluklarda maptak molekülleri ile etkileşen piranin moleküllerinin bir kısmının  $SO_3^-$  etkileşmelerini yok etmesidir. Ancak bu oran çok miktardaki  $Cl^-$  iyonuna rağmen fazla değildir. Çünkü fazla olsaydı spektrum Şekil 3.38'deki gibi 510 nm civarına kayması gerekliyordu. Değişimin az olması piranin moleküllerinin jelin sahip olduğu özel geometrik yuvalarda, kalıplarda, maptak molekülleri vasıtasıyla korunuyor olmasıdır.

## Sonuçlar

Elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibi özetlenebilir: Jellerin hedef molekül kullanılarak kalıplama çalışmalarında en önemli nokta jelleşme sırasında hedef molekül ile algılayıcı ünite arasındaki kompleks yapının bozulmaması yani kararlı olmasıdır. Bu ölçümlere göre rastgele jellerdeki piranin moleküllerinin floresans spektrumları jelleşme sonuna doğru hızlı bir şekilde ekzimer doğru kaymaktadır. Bunun en önemli sebebi bu jeller içinde kompleks yapıların oluşmaması ve serbest kalan piranin moleküllerinin de birbirlerine yeteri kadar yakın gelebilmesidir. Kalıplanmış jellerde ise durum biraz farklıdır. Bu jellerde belirgin olarak maptak molekülleri ile etkileşen kompleks yapıdaki piranin moleküllerinin emisyonu gözlemlenmektedir. Aynı zamanda bu jellerde de ekzimer emisyonu gözlemlenmektedir. Ancak bu jellerde gözlemlenen ekzimer emisyonu normal bir sonuçtur. Çünkü komplekslerin tamamının yaşaması mümkün değildir. Bunların bir kısmı dağılarak serbest kalan piranin molekülleri bir araya gelip, ekzimer emisyonu yapmışlardır.

Jellere piranin (hedef molekül) difüzyonu çalışması farklı koşullarda gerçekleştirilmiştir. Bunlardan ilki; dış çözültideki piranin derişiminin değiştiği difüzyon deneyleridir. Bu deneylerde kalıplanmış ve rastgele jeller arasındaki farklılık kararlı olmadığı gözlemlenmiştir. Bu kararlılık hem BIS derişiminin az olması yani gevşek ağ yapılı jel olması hemde çözülti içinde herhangi bir elektrolitin (tuz) olmamasındandır.

Sıcaklığa bağlı olarak yapılan difüzyon deneylerinde rastgele ve kalıplanmış jeller arasında farklılık 60°C'de çok net olarak gözlemlenmiştir. Diğer sıcaklıklarda ise bu fark kararlı değildir. 60°C'ye gelindiğinde kalıplanmış jele difüzyon yoluyla giren piranin miktarı oldukça artmıştır. Bunun en önemli nedeni 60°C'de kalıplanmış jelin reaksiyon (kalıplama) anındaki çökme durumuna yani en uygun geometrik düzene gelirken, rastgele jel ise başlangıçtaki geometrik yapısından daha küçük bir geometrik yapıya gelmesidir. Kalıplanmış jelde reaksiyon anında oluşan ve 3 pozitif yüklü maptak molekülü içeren piranin yuvalarının geometrisi ko-

runmaktadırlar. Bu 3 tane pozitif yüklü maptak moleküllerinin arasındaki elektrostatik etkileşme jelin büzülme yönünde yaptığı baskıyı dengelemekte ve yuvaların geometrisini koruyarak jelin en uygun geometrik düzende kalmasını sağlamaktadırlar. Değişik pH değerlerinde yapılan difüzyon deneylerinde her pH değeri için kalıplanmış jele olan difüzyon rastgele jele olan difüzyondan daha büyüktür. Bunun en önemli sebebi rastgele jelin içinde oldukça büyük gözeneklerin olması yani daha heterojen bir yapıya sahip olmasıdır. Difüzyon esnasında bu boşluklarda biriken moleküller jelin içi ve dışı arasında bir çeşit perdeleme etkisi yapması sebebiyle difüzyonun yavaşlayıp sonlanmasına neden olmaktadır.

Tuz derişimine bağlı olarak yapılan difüzyon deneyleri hem UV hem de floresans spektroskopisi yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. UV sonuçlarının Tanaka modeline göre değerlendirilmesi ile  $p$  (hedef molekül üzerindeki fonksiyonel grup sayısı) üsteli rastgele ve kalıplanmış jeller için sırasıyla  $0.9 \pm 0.1$  ve  $3.1 \pm 0.9$  çıkmıştır. Kalıplanmış jel için bulunan değer oldukça gerçekçi bir sonuçtur ve kullandığımız hedef molekül olan piranin'in fonksiyonel grup sayısı olan 3'e, nispeten daha büyük deneysel hata içermesine rağmen, çok yakındır. Bu sonuç bize piranin moleküllerinin kalıplanmış jel içerisinde çoğunlukla 3 grup üzerinden etkileştiğini yani kalıplamanın gerçekleşmiş olduğunu göstermektedir. UV çalışmasının yanında rastgele ve kalıplanmış jellerin difüzyon başlangıcı ve sonrasında floresans spektrumları alınmıştır. Bu spektrumlar kullanılarak hesaplanan hafıza parametreleri Tablo 2'de kalıplanmış ve rastgele jeller için verilmiştir. Buradaki değerlere göre kalıplanmış jeldeki hafıza rastgele jele göre oldukça fazladır.

Sonuç olarak yaptığımız bu çalışmada floresans özelliğe sahip hedef molekül veya floresans moleküllerle etiketlenmiş hedef moleküllerin tanınması ve dönüşümlü adsorpsiyonlarının incelenmesi konusunda yeni bir yöntem önerilmektedir. Floresans yönteminin diğer yöntemlere olan üstünlüğü açıkça ortaya konulmaktadır. Diğer yöntemlerde hedef molekülün kaç bacak-

tan bağlandığı açıkça gösterilememesine karşın bizim geliştirdiğimiz yöntemde floresans spektromlarındaki kaymalarla bu durum açıklanabilmektedir. Teknik olarak birçok molekül ya da proteinin floresans gruplarla etiketlenmesinin mümkün olduğu düşünüldüğünde, bizim geliştirdiğimiz bu yöntemin daha da geliştirilebileceği beklenebilir.

Tablo 2. Kalıplanmış (KJ) ve rastgele (RJ) jeller için değişik tuz derişimindeki hafıza parametreleri

Tuz derişimi (mM)	H <sub>KJ</sub>	H <sub>RJ</sub>
50	0.999	-
100	0.998	-
150	0.836	0.0003
200	0.678	0

## Kaynaklar

- Alexander, C., Andersson, H.S., Andersson, L., Ansell, R.J., Kirsch, N., Nicholls, I.A., O'Mahony, J. ve Whitcombe, M.J., (2006). Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003, *Journal of Molecular Recognition*, **19**, 106-180.
- Altschuh, D., Oncul, S. ve Demchenko, A.P., (2006). Fluorescence sensing of intermolecular interactions and development of direct molecular biosensors, *Journal of Molecular Recognition*, **19**, 459-477.
- Baird, C.L. ve Myszka, D.G., (2001). Current and emerging commercial optical biosensors, *Journal of Molecular Recognition*, **14**, 261-268.
- Bures, P., Huang, Y.B., Oral, E. ve Peppas, N.A., (2001). Surface modifications and molecular imprinting of polymers in medical and pharmaceutical applications, *Journal of Controlled Release*, **72**, 25-33.
- DelaCruz, E.O., Muguruma, H., Jose, W.I. ve Pedersen, H., (1999). Molecular imprinting of methyl pyrazines, *Analytical Letters*, **32**, 5, 841-854.
- Flint, N.J., Garderrecht, S. ve Swanson, L., (1998). Fluorescence Investigations of Smart Microgel Systems, *Journal of Fluorescence*, **8**, 4, 343-353.
- Gelir, A., Yılmaz, I. ve Yılmaz, Y., (2007). In situ monitoring of the synthesis of a pyranine-substituted phthalonitrile derivative via the steady-state fluorescence technique, *Journal of Physical Chemistry B*, **111**, 2, 478-484.
- Guney, O., Yılmaz, Y. ve Pekcan, O., (2002). Metal ion templated chemosensor for metal ions based on fluorescence quenching, *Sensors and Actuators B*, **85**, 86-89.
- Guney, O., (2003). Multiple-point adsorption of terbium ions by lead ion templated thermosensitive gel: elucidating recognition of conformation in gel by terbium probe, *Journal of Molecular Recognition*, **16**, 67-71.
- Haupt, K. ve Mosbach, K., (2000). Molecularly imprinted polymers and their use in biomimetic sensors, *Chemical Reviews*, **100**, 2495-2504.
- Homola, J., (2003). Present and future of surface plasmon resonance biosensors, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **377**, 528-539.
- Ito, K., Chuang, J., Alvarez-Lorenzo, C., Watanabe, T., Ando, N. ve Grosberg, A. Y., (2003). Multiple point adsorption in a heteropolymer gel and the Tanaka approach to imprinting: experiment and theory, *Progress in Polymer Science*, **28**, 1489-1515.
- Janotta, M., Weiss, R., Mizaikoff, B., Bruggemann, O., Ye, L. ve Mosbach, K., (2001). Molecularly imprinted polymers for nitrophenols - an advanced separation material for environmental analysis, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, **80**, 2, 75-86.
- Komiyama, M., Takeuchi, T., Mukawa, T. ve Asanuma, H., (2003). *Molecular imprinting: from fundamentals to applications*, Wiley-VCH.
- Kriz, D., Ramström, O., Svensson, A. ve Mosbach, K., (1995). Introducing biomimetic sensors based on molecularly imprinted polymers as recognition elements, *Analytical Chemistry*, **67**, 2142-2144.
- Lakowicz, J.R., (1983). *Principles of fluorescence spectroscopy*, Plenum Press, New York.
- Lehn, J.-M., Atwood, J.L., Davies, J.E.D. ve MacNicol, D.D., (1996). *Comprehensive supramolecular chemistry*, Pergamon, Oxford.
- Lye, G.J. ve Woodley, J.M., (1999). Application of in situ product-removal techniques to biocatalytic processes, *Trends in Biotechnology*, **17**, 395-402.
- Ohmine, I. ve Tanaka, T., (1982). Salt effects on the phase transitions of polymer gels, *Journal of Chemical Physics*, **77**, 5725-5729.
- Oya, T., et al., (1998). Reversible molecular adsorption based on multiple-point interaction by shrinkable gels, *Science*, **286**.
- Polyakov, M.V., (1940). Adsorption properties and structure of silica gel, *Zhurnal Fizieskoj Khimii/Akademiya SSSR*, **2**, 799-805.
- Peppas, N.A., Keys, K.B., Torres, L.M. ve Lowman, A.M., (1999). Poly(ethylene glycol)-containing

- hydrogels in drug delivery, *Journal of Controlled Release*, **62**, 81-87.
- Qiu, Y. ve Park, K., (2001). Triggering in drug delivery systems environment-sensitive hydrogels for drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **53**, 321-339.
- Rachkov, A ve Minoura, N., (2001). Towards molecularly imprinted polymers selective to peptides and proteins. The epitope approach, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1544**, 255-266.
- Ramstro, O., Ye, L., Krook, M. ve Mosbach, K., (1998). Applications of molecularly imprinted materials as selective adsorbents: emphasis on enzymatic equilibrium shifting and library screening, *Chromatographia*, 465-469.
- Shea, K.J., (1994). Molecular imprinting of synthetic network polymers: The de novo synthesis of macromolecular binding and catalytic sites, *Trends in Polymer Science*, **2**, 166-173.
- Sellergren, B., (1989). Molecular imprinting by non-covalent interactions-tailor-made chiral stationary phases of high selectivity and sample load-capacity, *Chirality*, 63-68.
- Shi, H.Q., Tsai, W.B., Garrison, M.D., Ferrari, S. ve Ratner, B.D., (1999). Template-imprinted nanostructured surfaces for protein recognition. *Nature*, **398**, 593-597.
- Siegel, R.A. ve Firestone, B.A., (1988). pH-dependent equilibrium swelling properties of hydrophobic poly-electrolyte copolymer gels, *Macromolecules*, **21**, 3254-3259.
- Umpleby, R.J., Bode, M. ve Shimizu, K.D., (2000). Measurement of the continuous distribution of binding sites in molecularly imprinted polymers, *Analyst*, **125**, 1261-1265.
- Valeur, B., (2002). *Molecular fluorescence: principles and applications*, Wiley-VCH, Weinheim.
- Warsinke, A., Benkert, A. ve Scheller, F.W., (2000). Electrochemical immunoassays, *Journal of Analytical Chemistry*, **366**, 622-634.
- Whitcombe, M.J. ve Vulfson, E.N., (2001). Imprinted polymers, *Advanced Materials*, **13**, 467-478.
- Wulff, G., (2002). Enzyme-like catalysis by molecularly imprinted polymers, *Chemical Reviews*, **102**, 1-28.
- Wulff, G., (1982). Selective binding to polymers via covalent bonds-the construction of chiral cavities as specific receptor-sites, *Pure Applied Chemistry*, 2093-2102, *Wastewater Management*, EPA832-B-93-005.
- Yilmaz, Y., Uysal, N., Gelir, A., Guney, O., Aktas, D.K., Gogebakan, S. ve Oner, A., (2009). Elucidation of multiple-point interactions of Pyranine fluoroprobe during gelation, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **72**, 2, 332-338.