



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



KİRAL BİLEŞİKLERİN ENANTİYOMERLERİNİN ANALİZİ İÇİN ELEKTROKİMYASAL SENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

Leyla KARADURMUŞ

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN**

**ANKARA
2021**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİRAL BİLEŞİKLERİN ENANTİYOMERLERİNİN
ANALİZİ İÇİN ELEKTROKİMYASAL SENSÖR
GELİŞTİRİLMESİ**

Leyla KARADURMUŞ

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN**

**ANKARA
2021**

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Kiral bileşiklerin enantiyomerlerinin analizi için elektrokimyasal sensör geliştirilmesi” başlıklı tez, bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan hazırlanmıştır. Tezimin fikri tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Leyla KARADURMUŞ

Tarih: 21.12.2021

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalında Leyla KARADURMUŞ tarafından hazırlanan “Kiral bileşiklerin enantiyomerlerinin analizi için elektrokimyasal sensör geliştirilmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir

Tez Savunma Tarihi: 21.12.2021

Prof. Dr. Bengi USLU
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN
Ankara Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Emirhan NEMUTLU
Hacettepe Üniversitesi
Üye

Doç. Dr. Mehmet GÜMÜŞTAŞ
Ankara Üniversitesi
Üye

Doç. Dr. Nurgül KARADAŞ BAKIRHAN
Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	xi
Şekiller	xiv
Çizelgeler	xvii
1. GİRİŞ	1
1.1. Giriş ve amaç	1
1.2. Kiralite	2
1.3. Tez kapsamında kullanılan etken maddelerle ilgili bilgiler	6
1.3.1. Psödoefedrin ve enantiyomerleri	6
1.3.2. Omeprazol ve enantiyomerleri	7
1.3.3. Sitalopram ve enantiyomerleri	9
1.4. Moleküler baskılama teknolojisi	10
1.4.1. Moleküler baskılı polimerlerin bileşenleri	12
1.4.1.1. Hedef (kalıp) molekül	12
1.4.1.2. Fonksiyonel monomerler	13
1.4.1.3. Çapraz bağlayıcılar	14
1.4.1.4. Çözücü	14
1.4.1.5. Başlatıcılar	15
1.4.2. Moleküler baskılama yöntemleri	16
1.4.2.1. Kovalent baskılama	16
1.4.2.2. Kovalent olmayan baskılama	17
1.4.3. Kiral ayrımlar için moleküler baskılanmış teknikler	18
1.4.3.1. MIP temelli sıvı kromatografisi	18
1.4.3.2. MIP temelli kapiler elektrokromatografi	19
1.4.3.3. Optik MIP tabanlı kirial sensörler	20
1.4.3.4. Elektrokimyasal MIP tabanlı kirial sensörler	20
1.5. Elektrokimya	21
1.5.1. Elektrokimyasal hücreler	21
1.5.2. Elektrokimyasal yöntemler	22
1.6. Voltametri	24
1.6.1. Sabit elektrot voltametrisi	26
1.6.1.1. Doğrusal taramalı voltametri	26
1.6.1.2. Dönüşümlü voltametri	26
1.6.2. Puls voltametrik yöntemler	27
1.6.2.1. Diferansiyel puls voltametri	27
1.6.2.2. Kare dalga voltametri	27
1.6.3. Sıyırma voltametri	28
1.6.3.1. Anodik sıyırma voltametrisi	28
1.6.3.2. Katodik sıyırma voltametrisi	29
1.6.3.3. Adsorptif sıyırma voltametrisi	29
1.6.4. Polarografi	29

1.6.5.	Voltametri yönteminde kullanılan elektrotlar	30
1.6.5.1.	Voltametri yönteminde kullanılan çalışma elektrotları	30
1.6.5.2.	Voltametride kullanılan referans elektrotları	30
1.6.5.3.	Voltametride kullanılan yardımcı (karşıt) elektrot	31
1.7.	Analitik yöntem validasyonu	31
1.7.1.	Doğruluk	32
1.7.2.	Kesinlik	33
1.7.3.	Seçicilik	35
1.7.4.	Doğrusallık	35
1.7.5.	Duyarlılık	36
1.7.6.	Çalışma Aralığı	36
1.7.7.	Teşhis ve tayin alt sınırı	36
1.7.8.	Sağlamlık	37
1.7.9.	Tutarlılık	38
1.7.10.	Stabilite	38
1.8.	Tez maddeleri ile yapılmış literatürdeki çalışmalar	39
1.8.1.	Psödoefedrin enantiyomerleri için mevcut analiz yöntemleri	40
1.8.2.	Omeprazol enantiyomerleri için mevcut analiz yöntemleri	40
1.8.3.	Sitalopram enantiyomerleri için mevcut analiz yöntemleri	41
2.	GEREÇ VE YÖNTEM	42
2.1.	Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler	42
2.2.	Tez çalışmasında kullanılan ekipmanlar	43
2.3.	Tez çalışmasında kullanılan elektrokimyasal sistem ve bileşenleri	44
2.4.	Tez çalışmasında kullanılan çözeltilerin hazırlanması	44
2.4.1.	Destek elektrolitlerin hazırlanması	44
2.4.2.	Potasyum ferrisiyanür çözeltisinin hazırlanması	45
2.4.3.	İlaç etken maddelerinin standart çözeltilerinin hazırlanması	45
2.4.4.	Serum çözeltilerinin hazırlanması	46
2.4.5.	Girişim çalışmalarında kullanılan çözeltilerin hazırlanması	46
2.5.	Tez çalışmasında kullanılan voltametrik yöntemler	47
2.5.1.	(1S,2S)-PSDO analizinde kullanılan voltametrik yöntemler	47
2.5.1.1.	Dönüşümlü voltametri	47
2.5.1.2.	Diferansiyel puls voltametri	47
2.5.2.	ESOM'un analizinde kullanılan voltametrik yöntemler	48
2.5.3.	ESCIT'in analizinde kullanılan voltametrik yöntemler	48
2.6.	Tez çalışmasında kullanılan moleküler baskılama temelli elektrokimyasal kiral sensörlerin hazırlanması	48
2.6.1.	(1S,2S)-PSDO için moleküler baskılama temelli elektrokimyasal kiral sensörlerin hazırlanması	48
2.6.2.	ESOM moleküler baskılı temelli elektrokimyasal kiral sensörlerin hazırlanması	49
2.6.3.	ESCIT moleküler baskılama temelli elektrokimyasal kiral sensörlerin hazırlanması	50
2.6.4.	Moleküler baskılanmış elektrokimyasal sensör yüzeylerin karakterizasyonu	50
3.	BULGULAR	52

3.1.	(1S,2S)-PSDO etken maddesine ait bulgular	52
3.1.1.	(1S,2S)-PSDO karakterizasyonu	52
3.1.1.1.	Elektrokimyasal karakterizasyon	52
3.1.1.2.	Yüzey karakterizasyon	54
3.1.2.	DeneySEL koşulların optimizasyonu	56
3.1.2.1.	Monomer/hedef molekül oranının etkisi	56
3.1.2.2.	o-PD polimerizasyonu için döngü sayısı ve tarama hızının etkisi	56
3.1.2.3.	Hedef molekülün desorpsiyon işlemi	59
3.1.2.4.	Bağlanma süresinin optimizasyonu	61
3.1.3.	Geliştirilen sensörlerin seçiciliklerinin incelenmesi	62
3.1.4.	Girişim etkisi	64
3.1.5.	(1S,2S)-PSDO'nun elektrokimyasal olarak tanınması	64
3.1.6.	(1S,2S)-PSDO@MIP/CKE uygulamaları	67
3.1.7.	Stabilite	69
3.2.	ESOM etken maddesine ait bulgular	70
3.2.1.	ESOM karakterizasyonu	70
3.2.1.1.	Elektrokimyasal karakterizasyon	70
3.2.2.	DeneySEL koşulların optimizasyonu	72
3.2.2.1.	Monomer/hedef molekül oranının etkisi	72
3.2.2.2.	Hedef molekülün desorpsiyon işlemi	73
3.2.2.3.	Bağlanma süresinin optimizasyonu	75
3.2.3.	Geliştirilen sensörlerin seçiciliklerinin incelenmesi	76
3.2.4.	Girişim etkisi	77
3.2.5.	ESOM'un elektrokimyasal olarak tanınması	78
3.2.6.	ESOM/β-CD/TEOS/CTAB@MIP/CKE uygulamaları	81
3.2.7.	Stabilite	83
3.3.1.1.	Elektrokimyasal karakterizasyon	84
3.3.2.	DeneySEL koşulların optimizasyonu	87
3.3.2.1.	Monomer/hedef molekül oranının etkisi	87
3.3.2.2.	Hedef molekülün desorpsiyon işlemi	88
3.3.2.3.	Bağlanma süresinin optimizasyonu	90
3.3.3.	Geliştirilen sensörlerin seçiciliklerinin incelenmesi	91
3.3.4.	Girişim etkisi	93
3.3.5.	Sitalopram enantiyomerlerinin elektrokimyasal olarak tanınması	93
3.3.6.	ESCIT/C1/EPI@MIP/CKE uygulamaları	96
3.3.7.	Stabilite	98
4.	TARTIŞMA	100
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	108
	ÖZET	111
	SUMMARY	112
	KAYNAKLAR	113
	ÖZGEÇMİŞ	Error! Bookmark not defined.

ÖNSÖZ

Günümüz ilaç piyasasında kullanımda olan ilaçların yarısından fazlası kiral bileşikler içermektedir. Aynı molekül şekline sahip bu bileşikler farmakolojik, farmakokinetik ve toksikolojik açıdan birbirlerinden farklı etkiler göstermektedir. Kiral ayırım için kullanılan tekniklerin çoğu, pahalı enstrümantasyon, karmaşık numune ön işlemi veya zaman alıcı bir işlem gerektirir. Bu çalışmada kiral bileşik enantiyomerlerinin analizi için moleküler baskılama temelli elektrokimyasal kiral sensör geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntemlerin biyolojik numunelere ve piyasa preparatlarına uygulanabilirliği de araştırılmıştır.

Lisans ve doktora eğitimim boyunca beni her zaman destekleyen, büyük bir sabırla tüm bildiklerini bana aktarmaya çalışan, bütün laboratuvar imkânlarını sunan, her gün yeni bilgiler öğreten, olumsuzluklar karşısında beni sürekli cesaretlendiren, ufkumu ve bakış açımı değiştiren, gösterdiği sabır ve anlayışı nedeniyle danışmanım sayın Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN' a sonsuz teşekkür ederim.

I gratefully thank to my precious co-advisor, Prof. Dr. Bezhan CHANKVETADZE who has always supported me and opened his lab to me. I would like to thank my dear Dr. George JIBUTI, Nana KHUNDADZE and all my teammates for their help in the Tbilisi part of my thesis work.

I gratefully thank to my precious co-advisor, Prof. Dr. Arben MERKOÇI who made everything possible for me. I am thankful to him, for his guidance and advices, neverending support, valuable discussions, patience during my studies and for being there whenever I need. I would also like to thank to my precious Postdocs, Dr. Emily P. NGUYEN, Dr. Lourdes RIVAS and Dr. Giulio ROSATI for their eternal support, motivation and valuable discussions. I would also like to thank to my best lab partner and friend Jose MARRUGO-RAMÍREZ. I would also like to thank to all members of Nanobioelectronics & Biosensors Group.

Bu çalışmanın ilerlemesi ve tamamlanması süresince engin bilgi ve desteklerini esirgemeyen değerli hocam Prof.Dr. Bengi USLU'ya sonsuz teşekkür ederim.

Değerli bilgi ve deneyimlerini esirgemeyip, bana her zaman yol gösteren, beni her düştüğümde kaldıran, bir hocadan çok bana gerçek bir abi olan, her zaman yanımda olan, manevi desteğini hep hissettiğim değerli hocam Doç. Dr. Mehmet GÜMÜŞTAŞ'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Kendisiyle karşılaşmayı bir şans olarak gördüğüm, hiç bıkmadan usanmadan tezimin her ayrıntısıyla ilgilenen, aklıma gelen tüm soruları rahatça tartışabildiğim, bilgisi ve insanlığı çok yüksek olan değerli hocam Doç. Dr. Mehmet Emin ÇORMAN'a ve doktora çalışmalarımın karakterizasyon kısımlarını büyük bir özveri ve sabırla gerçekleştiren değerli eşi Dr. Canan ARMUTÇU ÇORMAN'A en içten teşekkürlerimi sunarım.

Her sorumda ve sorunumda desteklerini yanımda hissettiğim hocalarım ve arkadaşlarım Doç. Dr. M. Gökhan ÇAĞLAYAN, Doç. Dr. Nurgül KARADAŞ BAKIRHAN, Doç. Dr. Sevinç KURBANOGĞLU, Dr. Burçin BOZAL-PALABIYIK, Doç. Dr. Burcu DOĞAN-TOPAL, Doç. Dr. Özgür ÜSTÜNDAĞ, Dr. Engin ER, Göksu ÖZÇELİKAY'a yardım ve destekleri için teşekkür ederim. Aynı çalışma grubunda bulunan bütün lab arkadaşlarıma desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Doktora öğrenimime sağladıkları katkılardan dolayı Analitik Kimya Anabilim Dalı'nın öğretim üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Sevgili dostlarım, Dr. Z. Ceren ERTEKİN, Dr. Gülin AMASYA, Dr. G. Rüya ÇAMCA TOPAL, Dr. Ali Kemal ATEŞ ve D. Emine BULUT ATEŞ'e her türlü üzüntümde ve mutluluğumda yanımda oldukları için, eşsiz yardımları ve daha birçok güzel anı için çok teşekkür ederim.

Küçük bir köy okulunda 8 yaşında bir kız çocuğuna sadece çok iyi bir eğitim değil bir göz, bir ideal ve vizyon verdiği, bana ikinci bir baba gibi olduğu için çok değerli ilkokul öğretmenim Ata SAVRUN'a sonsuz minnettarım. Umarım sizin gibi idealleri uğruna savaşan, doğrunun peşinden ayrılmayan birisi olurum.

Hiç olmayan kızın yerine koyup beni kızın gibi sevdiğin için, bana idealler aşılayıp bir kadının herşeyi yapabileceğini gösterdiğin için, herşey ama herşey için minnettar olduğum rahmetli Aygün SEĞMEN'e sonsuz minnetleri sunuyorum. Umarım çok güzel bir yerden beni izleyip kızınla gurur duyuyorsundur.

15 yaşında bana evini açan, kendi kızları gibi benimseyen, bana anne, baba, kardeş, arkadaş olan Emine, Hacı, Ayşenur ve Oğuz KONDAKÇI'ya sonsuz teşekkür ederim. Hayatta karşımıza çıkan insanlar en büyük şansımızdır ve siz benim bu hayattaki en büyük şanssınız.

Beni her zaman destekleyen, güvenen ve inanan çok değerli hocam Ebru LOĞOĞLU ve ailesine çok teşekkür ederim.

Eğitimim boyunca beni destekleyen, eczanesinin kapılarını sonuna kadar bana açan değerli eczacım Tolga YONCA ve değerli eşi Güzin YONCA'ya çok teşekkür ederim. Ayrıca YONCA eczanesinde çalışan, bana desteklerini esirgemeyen tüm çalışanlarına çok teşekkür ederim.

En tatlı lab arkadaşım, dert ortağım, en yakın dostum ve biricik kız kardeşim Selva BİLGE YÜCEL'e, her zaman destek olan ve bütün nazımı çeken canım arkadaşlarım Abdullah YÜCEL ve Mehmet TURHAN'a çok teşekkür ederim.

Liseden bu yana birlikte büyüdüğüm, ailemizden uzakta birbirimize aile olduğumuz, her zaman desteğini arkamda hissettiğim canım dostlarım, Ankara'daki

ailem Fatmanur PAMPAL DURNAGÖL'ü ve Feridun DURNAGÖL'ne sonsuz teşekkür ederim.

Canım dostum, Eren'imın annesi, dert ortağım, papatyam, nergizim Nazlı İHSAN BAYRAKTAR'a bana her zaman destek olduğı için çok teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca bana ellerinden gelenin en fazlasını veren, imkansızlıkların içinde bana imkan yaratan, bana güvenen, inanan canım anne ve babama sozsuz teşekkür ederim. En önemlisi bana sadece abla ve abi değil, aynı zamanda bana anne ve baba olan, kendi hayallerini bir kenara bırakıp benim hayallerim için çalışan, beni her konuda destekleyen, ben kendime inanmayı bıraktığımda bile bana inanan ve güvenen canım abime ve ablalarımına minnettarım. Bu doktora 5 kardeşin doktorasıdır.

Finally, I would like to thank Daniel Quesada-González for his love, understanding, patience and support throughout this process.

Doktora çalışmalarım sırasında bana burs desteğı veren TÜBİTAK - Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na (BİDEB) teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

AA	Askorbik asit
ACN	Asetonitril
BH	Bağıl hata
BSS	Bağıl standart sapma
β -CD	β -siklodekstrin
<i>c</i>	Derişim
CEC	Kapiler elektrokromatografi
CKE	Camsı karbon elektrot
CTAB	Setiltrimetilamonyum bromür
C1	Selüloz tris-3,5-dimetilfenil-karbamat
DPV	Diferansiyel puls voltametri
<i>D</i>	Difüzyon sabiti
DCE	Damlayan civa elektrodu
DOP	Dopamin
DTV	Doğrusal taramalı voltametri
DV	Dönüşümlü voltametri
EIS	Elektrokimyasal impedans spektroskopisi
ESCIT	Essitalopram
ESOM	Esomeprazol
EtOH	Etanol
FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
GD	Gerçek değer
GK	Geri kazanım
Hac	Asetik asit

HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
<i>I</i>	Akım
<i>I_p</i>	Pik akımı
KDV	Kare dalga voltametri
KS	Kütle spektrometri
LC	Sıvı kromatografisi
LC-MS	Sıvı kromatografi-kütle spektrometrisi
<i>m</i>	Eğim
MEOH	Metanol
MIP	Moleküler baskılanmış polimer
NaOH	Sodyum hidroksit
NIP	Baskılanmamış polimer
PAR	Parasetamol
PPI'ler	Proton pompası inhibitörleri
PSDO	Psödoefedrin
R^2	Korelasyon katsayısı
R-CIT	R-sitalopram
R-OM	(R)-(+)- omeprazol
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SS	Standart sapma
SV	Sıyırma voltametri
TAS	Tayin alt sınırı
TEOS	Tetraetil ortosilikat
THF	Tetrahidrofuran
TS	Teşhis sınırı
UA	Ürik asit

Xort	Ortalama değeri
XPS	X-ışınları fotoelektron spektroskopi



ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Elin ayna görüntüsü ve bunun moleküler düzeyde örneklenmesi	2
Şekil 1.2. İzomerlerin sınıflandırılması	3
Şekil 1.3. 1R,2S-(-)-efedrin, 1S,2R-(+)-efedrin, (1S,2S)- PSDO ve (1R,2R) - PSDO'nun kimyasal yapısı	6
Şekil 1.4. ESOM ve (R)-omeprazol (R-OM)'un kimyasal yapısı	8
Şekil 1.5. ESCIT ve R-CIT'in kimyasal yapısı	10
Şekil 1.6. MIP hazırlığının şematik gösterimi	11
Şekil 1.7. Elektroanalitik yöntemlerin sınıflandırılması	23
Şekil 3.1. (1S,2S)-PSDO@MIP/CKE elektrokimyasal kiral sensörü oluşturmak için her adımda elde edilen elektrokimyasal impedans spektroskopisi	53
Şekil 3.2. (1S,2S)-PSDO@MIP/CKE elektrokimyasal kiral sensörünün her adımının elde edilen dönüşümlü voltamogramları	54
Şekil 3.3. (1S,2S)-PSDO@MIP/CKE yüzeyinin karakterizasyonu: SEM görüntüsü (A); Raman spektrumları (B); çıplak CKE (C) ve (1S,2S)-PSDO@MIP/CKE (D) temas açıları görüntüleri	55
Şekil 3.4. (1S,2S)-PSDO@MIP/CKE elektrokimyasal kiral sensörünün , -0,2 - 0,8 V arasındaki potansiyel aralığında 1mM o-PD ve 1mM (1S,2S)-PSDO içeren PB'de (pH 7,4) ortamında 10 döngü sayısı ile elde edilen dönüşümlü voltamogramları	57
Şekil 3.5. (1S,2S)-PSDO@MIP/CKE elektrokimyasal kiral sensörünün , -0,2 - 0,8 V arasındaki potansiyel aralığında 1mM o-PD ve 1mM (1S,2S)-PSDO içeren PB'de (pH 7,4) ortamında döngü sayısı etkisi	58
Şekil 3.6. (1S,2S)-PSDO@MIP/CKE elektrokimyasal kiral sensörünün , -0,2 - 0,8 V arasındaki potansiyel aralığında 1mM o-PD ve 1mM (1S,2S)-PSDO içeren PB'de (pH 7,4) ortamında hız taraması etkisi	59
Şekil 3.7. (1S,2S)-PSDO@MIP/CKE elektrokimyasal kiral sensörünün , A) desorpsiyon çözeltisi, B) desorpsiyon zamanı	60
Şekil 3.8. Farklı bağlama sürelerine karşı 5×10^{-15} M (1S,2S)-PSDO'nun çıkarılmasından ve bağlanmasından sonra ΔI_p değerlerinin grafiği	62
Şekil 3.9. (1S,2S)-PSDO ve benzer bileşikler için IF değerlerinin değerlendirilmesi	63
Şekil 3.10. (1S,2S)-PSDO'nun farklı derişimlerinin bağlanmasıyla (1S,2S)-PSDO@MIP/CKE'nin DPV'si (A) ΔI ve (1S,2S)-PSDO derişimleri arasında ('deki doğrusal bir ilişki) 1S,2S)-PSDO@MIP/CKE ve NIP/CKE (B)	65

Şekil 3.11. (1S,2S)-PSDO (A)'nın standart eklenmesiyle (1S,2S)-PSDO@MIP/CKE'nin DPV'si ve (1S'deki ΔI ve (1S,2S)-PSDO derişimleri arasındaki doğrusal bir ilişki Eklenmiş serum örneklerinde ΔI ve (1S,2S)-PSDO@MIP/CKE ve NIP/CKE (B)	67
Şekil 3.12. ESOM/ β -CD/TEOS/CTAB@MIP/CKE elektrokimyasal kiral sensörü oluşturmak için her adımda elde edilen elektrokimyasal impedans spektroskopisi	71
Şekil 3.13. ESOM/ β -CD/TEOS/CTAB@MIP/CKE elektrokimyasal kiral sensörünün her adımının elde edilen dönüşümlü voltamogramları	72
Şekil 3.14. ESOM/ β -CD/TEOS/CTAB@MIP/CKE elektrokimyasal kiral sensörünün desorpsiyon çözeltisi optimizasyonu	73
Şekil 3.15. ESOM/ β -CD/TEOS/CTAB@MIP/CKE elektrokimyasal kiral sensörünün desorpsiyon süresi optimizasyonu	74
Şekil 3.16. Farklı bağlama sürelerine karşı 5×10^{-14} M ESOM'nun çıkarılmasından ve bağlanmasından sonra ΔI_p değerlerinin grafiği	75
Şekil 3.17. ESOM ve R-OM, S-Lansoprazol ve R-Lansoprazol gibi benzer bileşikler için IF değerlerinin değerlendirilmesi	76
Şekil 3.18. ESOM'un farklı derişimlerinin bağlanmasıyla ESOM/ β -CD/TEOS/CTAB@MIP/CKE'nin DPV'si (A) ΔI ve ESOM derişimleri arasında ESOM/ β -CD/TEOS/CTAB@MIP/CKE'nin ve NIP/CKE (B)	79
Şekil 3.19. ESCIT@MIP/CKE elektrokimyasal kiral sensörü oluşturmak için her adımda elde edilen elektrokimyasal impedans spektroskopisi	80
Şekil 3.20. ESCIT@MIP/CKE elektrokimyasal kiral sensörünün her adımının elde edilen dönüşümlü voltamogramları	84
Şekil 3.21. Farklı bağlama sürelerine karşı 5×10^{-11} M ESCIT'ın çıkarılmasından ve bağlanmasından sonra ΔI_p değerlerinin grafiği	86
Şekil 3.22. ESOM ve R-OM, S-Lansoprazol ve R-Lansoprazol gibi benzer bileşikler için IF değerlerinin değerlendirilmesi	87
Şekil 3.23. ESCIT'ın farklı derişimlerinin bağlanmasıyla (1S,2S)-PSDO@MIP/CKE'nin DPV'si (A) ΔI ve (1S,2S)-PSDO derişimleri arasında ('deki doğrusal bir ilişki) 1S,2S)-PSDO@MIP/CKE ve NIP/CKE (B)	88
Şekil 3.24. ESCIT/C1/EPI@MIP/CKE elektrokimyasal kiral sensörünün , A) desorpsiyon çözeltisi, B) desorpsiyon zamanı	89
Şekil 3.25. Farklı bağlanma sürelerine karşı 5×10^{-11} M ESCIT'ın çıkarılmasından ve bağlanmasından sonra ΔI_p değerlerinin grafiği	91
Şekil 3.26. ESCIT ve R-CIT gibi benzer bileşikler için IF değerlerinin değerlendirilmesi	92

Şekil 3.27. ESCIT'in farklı derişimlerinin bağlanmasıyla ESCIT/C1/EPI@MIP/CKE 'nin DPV'si (A) ΔI ve ESCIT derişimleri arasında ESCIT/C1/EPI@MIP/CKE'nin ve NIP/CKE (B) 94

Şekil 3.28. ESCIT (A)'nın standart eklenmesiyle ESCIT/C1/EPI@MIP/CKE'nin DPV'si ve (1S'deki ΔI ve ESCIT derişimleri arasındaki doğrusal bir ilişki Eklenmiş serum örneklerinde ΔI ve ESCIT/C1/EPI@MIP/CKE ve NIP/CKE (B) 95

Şekil 3.29. ESCIT/C1/EPI@MIP/CKE sensörünün stabilite çalışması 99



ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. (1S,2S)-PSDO için geliştirilen analitik yöntemler	40
Çizelge 1.2. ESOM için geliştirilen analitik yöntemler	40
Çizelge 1.3. ESCIT için geliştirilen analitik yöntemler	41
Çizelge 2.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeleri	42
Çizelge 2.2. Deneysel çalışmalarda kullanılan cihaz ve diğer ekipmanlar	43
Çizelge 2.3. Tez çalışması kapsamında kullanılan elektrokimyasal sistem ve bileşenleri	44
Çizelge 3.1. Girişim maddelerinin (1S,2S)-PSDO'nin cevabı üzerindeki etkisi	64
Çizelge 3.2. Standart çözelti ve serum numunelerinde (1S,2S)-PSDO@MIP/CKE sensörü ile (1S,2S)-PSDO için elde edilen kalibrasyon eğrisine ait regresyon analizi sonuçları ve validasyon parametreleri	68
Çizelge 3.3. Deloday Plus® efervesan tablet dozaj formundan ve eklenmiş insan serum örneklerinden (1S,2S)-PSDO için elde edilen analiz bulgularının sonuçları	69
Çizelge 3.4. Girişim maddelerinin ESOM'un cevabı üzerindeki etkisi	77
Çizelge 3.5. Standart çözelti ve serum numunelerinde ESOM/β-CD/TEOS/CTAB@MIP/CKE sensörü ile ESOM için elde edilen kalibrasyon eğrisine ait regresyon analizi sonuçları ve validasyon parametreleri	82
Çizelge 3.6. ESOM® tablet dozaj formundan ve eklenmiş insan serum örneklerinden ESOM için elde edilen analiz bulgularının sonuçları	83
Çizelge 3.7. Girişim maddelerinin ESCIT'in cevabı üzerindeki etkisi	93
Çizelge 3.8. Standart çözelti ve serum numunelerinde ESCIT/C1/EPI@MIP/CKE sensörü ile ESCIT için elde edilen kalibrasyon eğrisine ait regresyon analizi sonuçları ve validasyon parametreleri	97
Çizelge 3.9. Ciprallex® tablet dozaj formundan ve eklenmiş ticari serum örneklerinden ESCIT için elde edilen analiz bulgularının sonuçları	98

1. GİRİŞ

1.1. Giriş ve amaç

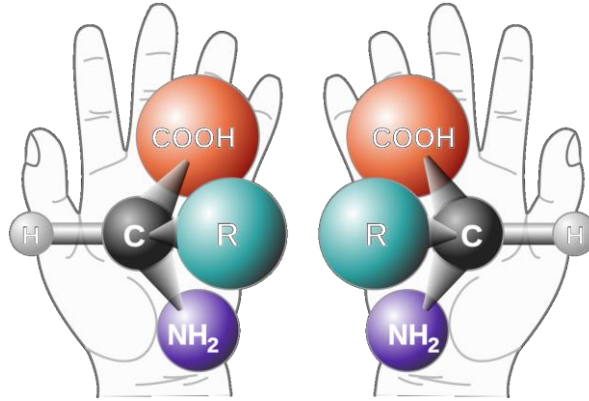
Günümüz ilaç piyasasında kullanımda olan ilaçların yarısından fazlası kiral bileşikler içermektedir. Aynı molekül şekline sahip bu bileşikler farmakolojik, farmakokinetik ve toksikolojik açıdan birbirlerinden farklı etkiler göstermektedir. Genellikle, enantiyomerlerden biri hastalık tedavisinde etkili olabilir ve kiral tanıma sürecinde istenen özellikleri sergileyebilirken, diğeri etkisiz olabilir veya hatta ciddi yan etkilere ve toksisiteye neden olabilir. Bu sebeple, rasemik karışımlardaki istenmeyen enantiyomerin uzaklaştırılması, gerek klinik açıdan gerekse ilaç endüstrisi açısından çok büyük önem taşımaktadır. Kiral ayırım için kullanılan tekniklerin çoğu, pahalı enstrümantasyon, karmaşık numune ön işleme veya zaman alıcı bir işlem gerektirir. Günümüzde, elektrokimyasal sensör, yüksek duyarlılık, hızlı yanıt ve görece basitlik avantajlarıyla, kiral tanıma için umut verici bir yaklaşım olarak dikkate değer bir ilgi görmüştür.

Bu amaçla araştırma önerisinde kiral bileşik enantiyomerlerinin analizi için moleküler baskılama temelli elektrokimyasal kiral sensör geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada üzerinde çalışılması planlanan ilaç etken maddeler (1S,2S)-psödoefedrin ((1S,2S)-PSDO), esomeprazol (ESOM) ve essitalopram (ESCIT) enantiyomerleridir. Bu tez araştırması ile seçilen ilaç etken maddelerinin tayini için seçici, hassas, duyarlı, hızlı ve tamamen valide edilmiş elektrokimyasal analiz yöntemlerinin geliştirilmiştir. Tez araştırması konumuz olan kiral ilaçların enantiyomerlerinin moleküler baskılama temelli elektrokimyasal kiral sensörle tayin edilmesi ile sağlık alanında çok önemli gelişmeler sağlanacaktır. Tez araştırmasında kullanılacak maddelerle ilgili elektrokimyasal kiral sensör çalışmalarının yapılmamış olması çalışmanın özgünlüğünü ortaya koymaktadır. Bu maddelere özgü elektrokimyasal kiral sensör geliştirebilmek literatüre önemli katkılar sağlayacaktır. Hem moleküler baskılama tekniği hem de elektrokimyasal yöntemler sayesinde daha az

madde kullanarak, daha seçici ve hassas ve daha çevreci sensörlerle analizler gerçekleştirilmiştir.

1.2. Kiralite

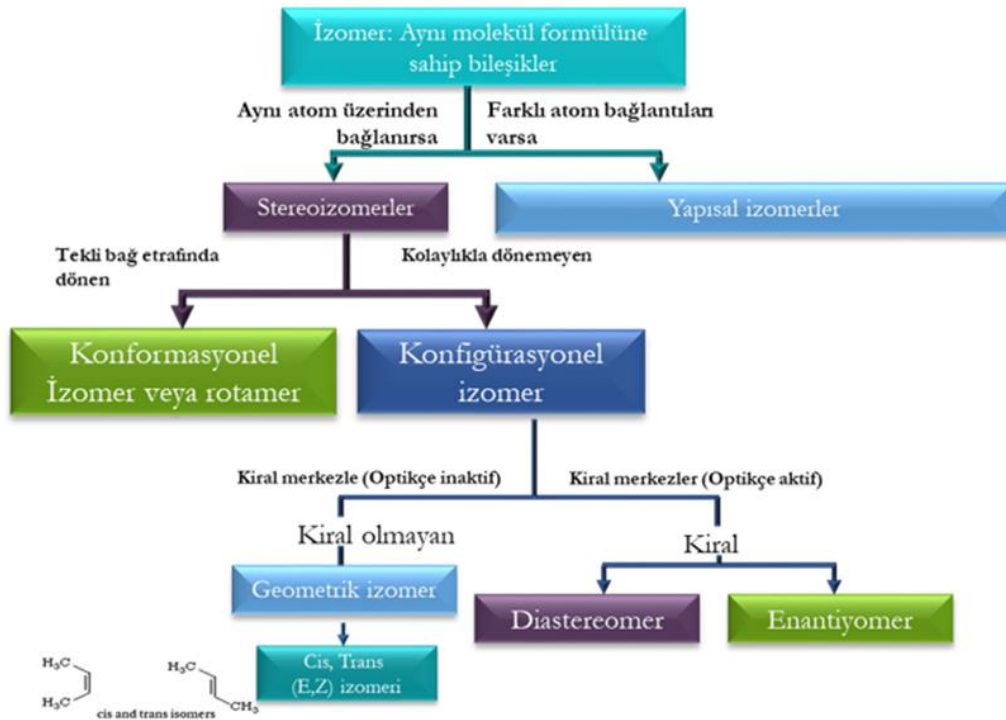
Pasteur'ün optik izomerleri ayırması ile organik kimya ve biyokimya alanında önemli olan bir kimyasal yapı alanı açılmıştır. Pasteur'ün başarısı, kiralite kavramını ortaya çıkarmanın temelini oluşturdu. Pasteur'ün zamanında "kiralite" kelimesi yoktu. Pasteur "dissimetri" kelimesini kullandı. Lord Kelvin ve William Thompson, "kiral" ve "kiralite" kelimelerini 1884 yılında tanıttı. "Kiral" ve "kiralite", "el" anlamına gelen Yunanca "cheir" kelimesinden klasik bir türemiştir. İnsan eli (ve ayakları) çiftleri, Kelvin'in geometrik tipinin en yaygın ve belirgin örnekleridir; bunlar birbirlerinin ayna görüntüleridir, "özdeş zıtlıklar"dır. Kiralite ile yakından ilişkili olan "enantiomorph" kelimesi, Yunancadan türetilen "zıt biçim" (enantios morphe) anlamında tam da bu özü yakalar (Mauskopf, 2006; Gal, 2011; Gerlach, 2013).



Şekil 1.1. Elin ayna görüntüsü ve bunun moleküler düzeyde örneklenmesi.

Günümüzde enantiyoayırım için analitik yöntemler ve sensörler geliştirmenin önemi kimya ve ilaç endüstrisinde iyi bilinmektedir. Bu amaçla elektrokimyasal ve optik sensörler, yüksek performanslı sıvı kromatografisi, kılcal elektrokromatografi, kılcal elektroforez ve süperkritik sıvı kromatografisi gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (Chankvetadze, 2012).

Aynı molekül formülüne sahip farklı bileşiklere yaygın olarak izomer denir ve iki ana gruba ayrılabilir: Yapı izomerleri ve stereoizomerler. Yapı izomerleri, atomların farklı bir düzende bağlanması nedeniyle farklılık gösteren izomerlerdir, diğer yandan stereoizomerler, atomlarının uzaydaki düzeniyle farklılık gösterir. Stereoizomerler ayrıca iki ana sınıfa, geometrik ve optik izomere ayrılabilir. Optik izomerler başlığı altında enantiyomerler ve diastereomerler incelenir. Enantiyomerler, molekülleri birbirinin ayna görüntüsü olan ancak örtüşmeyen stereoizomerlerdir. Diastereomerler, molekülleri birbirinin ayna görüntüsü olmayan stereoizomerlerdir. Enantiyomerler sadece molekülleri kiral olan bileşiklerde görülür. Bu moleküllerin en iyi bilinen örneği, tetrahedral karbon atomuna bağlı dört farklı grup içeren moleküllerdir. Asimetrik merkez (stereo merkez) olmak sadece karbonun bir özelliği değildir, fosfor, kükürt ve azotun asimetrik bir merkez olarak bulunduğu kiral bileşikler mevcuttur (Mislow ve Siegel, 2002).



Şekil 1.2. İzomerlerin sınıflandırılması.

Kiralite olgusu, doğanın ve insanlığın birçok alanında mevcuttur. Enantiyomerler olarak da bilinen kiral moleküller, atomların uzaydaki yapısının ve yerleşiminin birbirinin ayna görüntüsü olduğu ve örtüşmediği bir çift molekülü ifade eder. Yan zinciri H olan glisin hariç, doğal proteinleri oluşturan yirmi amino asidin tümü kiraldır. Kiral moleküller birçok aktif bileşende bulunur ve farmasötik gibi birçok endüstri için büyük ilgi görmüş akademik olarak heyecan verici ve ilginç bir konudur. Bugün piyasada bulunan ilaçların yarısından fazlası kiral bileşikler içermektedir. Rasemik karışımlarda, özellikle ilaçlar için, her enantiyomer biyolojik aktivitelerinde farmakolojik, toksikolojik, farmakokinetik ve metabolik farklılıklar gösterir. Bu farklılıklar bir enantiyomerde iyileştirici bir etki olarak görünse de, aynı bileşiğin diğer enantiyomeri mutajenik etkileri mevcut olabilir. Biyolojik aktivitedeki farklılıklarla ilgili birçok dramatik ve hatta ölümcül zararın örnekleri mevzuatta bulunmaktadır (Bentley, 2006; Altshuler ve ark., 2013; Engel, 2020).

İlaçlar arasında kiralitenin önemini ve genellikle ölümcül etkilerini gösteren trajik bir örnek, 1950'lerde meydana gelen talidomid vakasıdır. Talidomid, kararsız olan ve iki enantiyomerin bir arada bulunmasına izin veren kiral bir karbona sahiptir. Bir tablet olarak üretilmiştir ve hamile kadınlara sabah bulantılarını gidermek için reçete edilmiştir. Ancak ilacın öngörülemeyen bir yan etkisi, anomalilerle doğan binlerce bebeğin doğmasına neden oldu. Ancak daha sonra, talidomidin S-enantiyomerinin teratojen olduğu, R-enantiyomerinin yatıştırıcı olarak hareket ettiği ve anne ile fetus arasındaki plasenta bariyerini geçerek doğuştan deformitelere neden olduğu keşfedildi. İlaç o zamandan beri tüm dünyada piyasadan çekildi. İlacın yarattığı anomalilerle yaklaşık 50 ülke ve 10.000'den fazla bebek dünyaya geldi ve bunların büyük çoğunluğu yüksek ölüm oranı nedeniyle yetişkinliğe ulaşmadan vefat etti. Talidomid trajedisi, kiral ilaçların önemini anlamada ana faktördü ve ilaç üreticilerini tek enantiyomer içeren ilaçların üretimine yönlendirdi (Islam ve ark., 1997; Kim ve Scialli, 2011; Chhabra ve ark., 2013; Gandhi ve ark., 2020).

Genel olarak, enantiyomerlerden biri hastalıkların tedavisinde aktif olabilir ve tanıma işlemi sırasında istenen özellikleri gerçekleştirebilir. Diğer aktif olmayabilir, hatta ciddi yan etkilere ve toksisiteye neden olabilir. Bu nedenle rasemik karışımlarda

istenmeyen enantiyomerin uzaklaştırılması hem klinik hem de farmasötik endüstriler için büyük önem taşımaktadır (Islam ve ark., 1997; Chhabra ve ark., 2013; Gandhi ve ark., 2020).

Birçok hastalığın tedavisinde kullanılan farmasötik aktif maddelerin rasemik olduğu düşünüldüğünde, bu bileşiklerin enantiyomerlerinin her birinin hassas analizlerinin yapılması ve bu enantiyomerlerin farmakolojik etkilerinin değerlendirilmesi önemlidir. Bu sayede hastalara daha etkin bir tedavi yaklaşımı uygulanacak ve gereksiz yabancı maddeler vücuda daha az girecek ve yan etkiler azaltılacaktır. Enantiyomerik olarak saf ilaçların geliştirilmesi, rasemik ilaçların etkin bir şekilde ayrıştırılması ve analiz yöntemlerinin geliştirilmesi günümüz araştırmalarında ve gelecekte çok önemlidir (Islam ve ark., 1997; Chhabra ve ark., 2013; Gandhi ve ark., 2020).

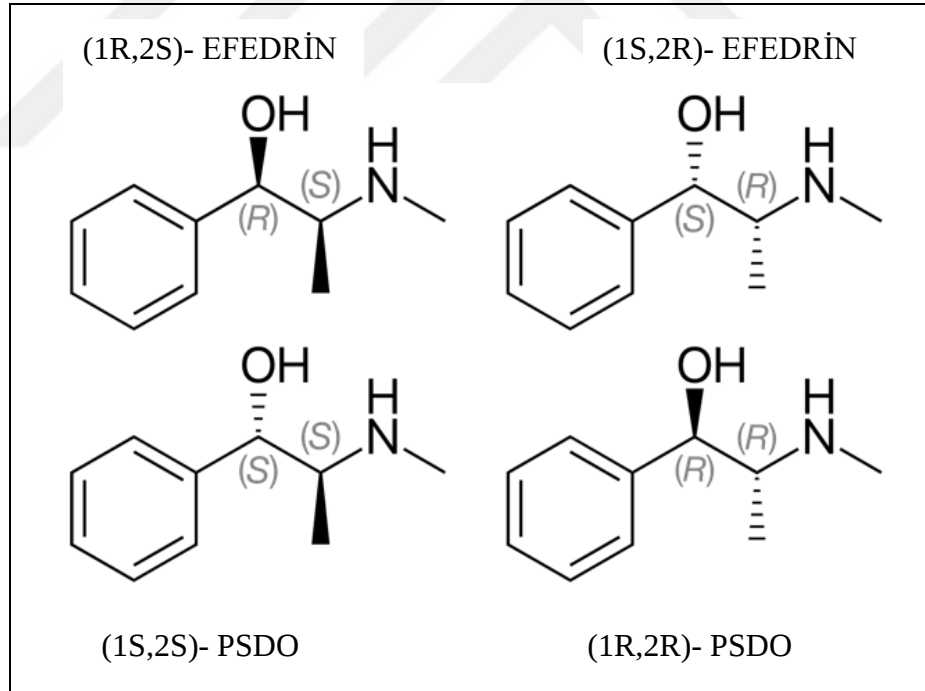
Dünyada birçok ülkenin düzenleyici yönergeleri incelendiğinde, bir enantiyomerin diğer enantiyomere ait bir safsızlık olarak nitelendirildiği açıktır. Bu nedenlerle hem ilaç endüstrisinde hem de klinik çalışmalarda kiral ayırma yöntemleri giderek önem kazanmaktadır. İstenmeyen enantiyomerler rasemik formülasyondan uzaklaştırıldığında doğru tedavi yaklaşımını sağlamak mümkündür. Aynı zamanda, en önemli kiral maddeler biyoilişkili moleküllerdir ve bunların algılanması biyoloji, biyoteknoloji ve eczacılığa büyük ölçüde katkıda bulunur (Chankvetadze, 2013; Chhabra ve ark., 2013).

Kiral ayırım için kullanılan tekniklerin çoğu, pahalı enstrümantasyon, karmaşık numune ön işlemi veya zaman alıcı bir işlem gerektirir. Günümüzde, elektrokimyasal sensör, yüksek duyarlılık, hızlı yanıt ve görece basitlik avantajlarıyla, kiral tanıma için umut verici bir yaklaşım olarak dikkate değer bir ilgi görmüştür.

1.3. Tez kapsamında kullanılan etken maddelerle ilgili bilgiler

1.3.1. Psödoefedrin ve enantiyomerleri

Efedrin iki kiral merkeze sahiptir ve bu nedenle dört stereoizomer şeklinde var olabilir: 1R,2S-(-)-efedrin, 1S,2R-(+)-efedrin, 1S,2S-(+)-psödoefedrin ((1S,2S)-PSDO) ve 1R,2R-(-)-psödoefedrin ((1R,2R)-PSDO) (Şekil 1.3.). Psödoefedrin (PSDO), sempatomimetik özelliklere sahip bir efedrin diastereomeridir. PSDO'nun vazokonstriktör aktivitesi ve sempatik sinir sistemi etkileri efedrine göre daha düşük olmasına rağmen efedrine benzer etkileri vardır. Bununla birlikte, yalnızca iki stereoizomerin: 1R,2S-(-)-efedrin ve (1S,2S)-PSDO'nun efedra gibi doğal kaynaklarda bulunduğu inanılmaktadır (Iwanicki ve ark., 1999; Kasprzyk-Hordern ve Baker, 2012).



Şekil 1.3. 1R,2S-(-)-efedrin, 1S,2R-(+)-efedrin, (1S,2S)-PSDO ve (1R,2R)-PSDO'nun kimyasal yapısı.

(1S,2S)-PSDO dekonjestan olarak kullanılır. PSDO'nun dekonjestan etkisi ilk olarak 1927'de köpeklerde gözlenmiştir. PSDO, burun mukozası dahil olmak üzere

kan damarlarında vazokonstriksiyona, kan içeriğinde azalmaya ve b    lmeye neden olur. Öte yandan, PSDO bronkodilatasyona neden olabilir ve hava akımına direnci azaltabilir. PSDO genellikle soğuk algınlığı ve grip tedavisi için ateş düşürücü ilaç ve alerjik reaksiyonların azaltılması için antihistaminikler ile birlikte alınır. PSDO, idrar pH'ına göre 4-6 saatlik bir eliminasyon yarı ömrüne sahiptir. Yarı   mr  n eliminasyonu idrar pH <6'da azalırken, idrar pH>8'de artar (Kanfer ve ark., 1993; Ma, Bavadekar ve ark., 2007; Schwelm ve ark., 2020).

(1R,2R)-PSDO, esas olarak asimetrik sentez için kiral bir yardımcı olarak kullanılan bir efedrin enantiyomeridir. (1R,2R)-PSDO, karşılıklı gelen ikincil alkole yol açan aldehitlere dietil inko ilavesini katalize edebilen kiral ligandlarının hazırlanmasında kullanılabilir. Merrifield re enesi üzerinde PSDO'ın immobilizasyonu, katı faz yaklaşımıyla amidlerin asimetrik alkilasyonu için kullanılabilen bir kiral bağlayıcı oluşturur (Kanfer ve ark., 1993; Iwanicki ve ark., 1999; Ma ve ark., 2007; Kasprzyk-Hordern ve Baker, 2012).

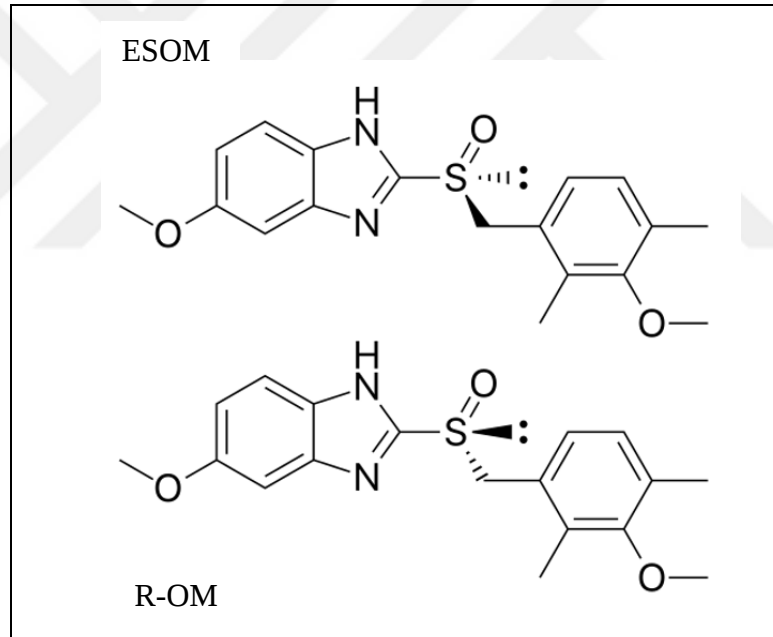
PSDO, sporcularda yaygın olarak kötüye kullanılan uyarıcılar olarak bilinir. PSDO, alkaloid türevlerini içerir. Ayrıca PSDO uluslararası olimpiyat komitesi ve spor federasyonları tarafından yasaklanmış maddeler listesinde yer almaktadır. Bu nedenle PSDO'ın hızlı ve hassas analitik tespiti spor alanında çok önemli bir yere sahiptir (Kanfer ve ark., 1993; Iwanicki ve ark., 1999; Kasprzyk-Hordern ve Baker, 2012).

1.3.2. Omeprazol ve enantiyomerleri

Günümüz ilaç pazarında kullanılan ilaçların yarısından fazlası kiral bileşikler içerir, ancak bu ilaçların çoğu rasemik karışım yani enantiyomerlerinin 50/50 karışımını olarak uygulanır. Bir istisna dışında, gastrik asit ile ilgili hastalıkların tedavisinde kullanılan, şu anda pazarlanan tüm proton pompası inhibitörleri (PPI'ler) rasemik bir karışım içindedir. Tek enantiyomerli bir ilaç olarak geliştirilen tek PPI olan

omeprazolün S-enantiyomeri olan S-omeprazol istisnadır (ESOM) (Hancu ve ark., 2015; Ahmed ve ark., 2021).

Omeprazol, piramidal bir yapıda üç koordineli kükürt içerir. (S) ve (R) enantiyomerleri olarak oluşabilir. Kiral olarak saf ESOM metabolik ve farmakokinetik profilleri ve terapötik etkinliği, rasematlarıkinden üstündür. Omeprazol, tedavide hem saf enantiyomer (ESOM) hem de rasemat olarak kullanılır. ESOM, onu rasemat omeprazolden ayıran benzersiz metabolik özelliklere sahiptir. Karşılaştırılabilir dozlarda, bu özellikler, hastaların çoğunda daha yüksek biyoyararlanım gibi çeşitli klinik avantajlara yol açmıştır (Rohss ve ark., 2000; Andersson, 2004; Ahmed ve ark., 2021).



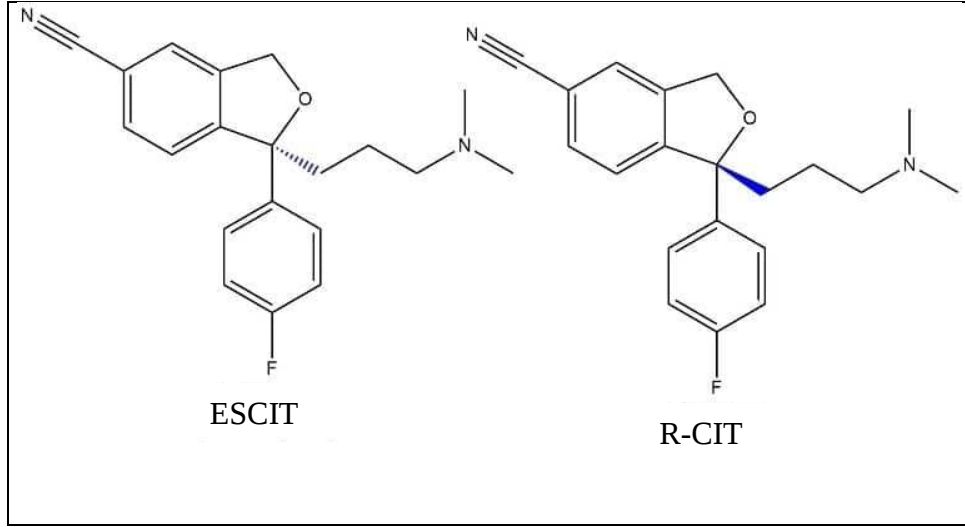
Şekil 1.4. ESOM ve (R)-omeprazol (R-OM)'un kimyasal yapısı.

Omeprazol peptik ülser, mide ülseri ve gastroözofageal reflü hastalığı gibi gastrik asit sekresyonunu azaltmak olduğu, asitle ilgili tüm hastalıkların tedavisinde endikedir. Kiral bir ilaçtır ancak tıbbi amaçlar için rasemik bir karışım ve saf enantiyomer olarak kullanılır. Genellikle, bir kiral ilacın farmakodinamiği ve farmakokinetiği, optik izomerler arasında potansiyel olarak farklıdır. Bu nedenle,

herhangi bir kiral ilacın farmakokinetiği ve farmakodinamiği hakkında net bilgi edinmek için bireysel enantiyomerleri incelemek önemlidir. Omeprazol ilacında ESOM daha iyi etki göstermiş ve AstraZeneca tarafından Nexium® ticari adı altında enantiyo-saf ilaç olarak formüle edilmiştir (Rohss ve ark., 2000; Andersson, 2004; Ahmed ve ark., 2021).

1.3.3. Sitalopram ve enantiyomerleri

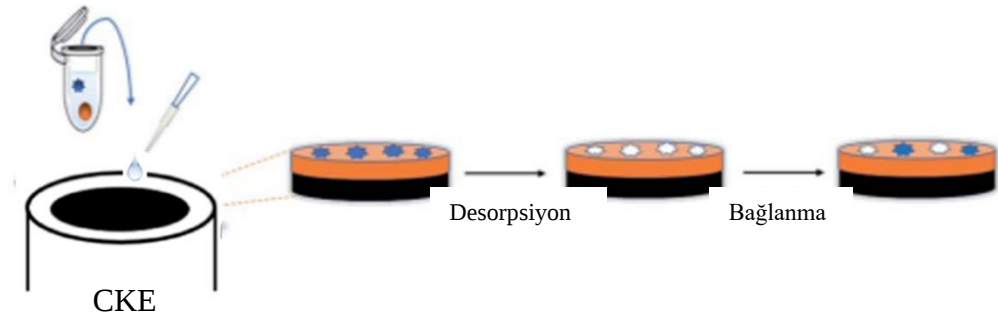
Seçici serotonin (5-hidroksitriptofan, 5-HT) geri alım inhibitörü sitalopram, bir S(+)-enantiyomeri (essitalopram) (ESCIT) ve bir R(-)-enantiyomeri (R-sitalopram) (R-CIT) içeren bir rasemattır. Bu iki enantiyomerin ayrılması, bireysel özelliklerinin incelenmesini sağlamıştır. Sitalopram'ın farmakolojik aktivitesi, S enantiomerinin sitalopramın iki katı ve R-sitalopramdan 30 ila 40 kat daha yüksek olan serotonin taşıyıcıya olan yüksek afinitesine odaklanır. Bu, sitalopram ile karşılaştırıldığında essitalopram için iki kat daha fazla serotonin geri alımının engellenmesine yol açar ve sitalopramın farmakolojik aktivitesinin S-enantiyomerinden kaynaklandığını doğrular. Sitalopramın referans ilaç veya aktif karşılaştırıcı olarak dahil edildiği klinik çalışmalar, esitalopram ile hastaların tedavisinin sitalopram ile karşılaştırıldığında sayısal olarak tutarlı bir şekilde üstün olduğunu göstermiştir. Analizler, essitalopramın sitaloprama kıyasla klinik avantajının istatistiksel olarak anlamlı olduğunu bulmuştur (Haupt, 1996; Sánchez ve ark., 2004; Sánchez, 2006b,a; Budău ve ark., 2020).



Şekil 1.5. ESCIT ve R-CIT'in kimyasal yapısı.

1.4. Moleküler baskılama teknolojisi

Moleküler baskılanmış polimerler (MIP'ler), boyut, şekil ve fonksiyonel gruplar açısından hedef moleküllerle eşleşen belirli bölgeler veya boşluklar içeren polimerik yapılardır. Bu boşluklar tipik olarak hedef molekülün, polimer matrisine damgalandığı ve daha sonra desorpsiyon aşamaları yoluyla çıkarıldığı polimerizasyon işlemi sırasında oluşturulur (Şekil 1.6.). Bu boşluklar spesifik moleküllere dayandığından, baskılı boşluk artık hedef molekül için spesifik bağlanma afinitelerine sahiptir. Bu boşlukların hedef moleküle yönelik etkileşimleri, non-kovalent baskılama yöntemi için hidrojen bağları, van der Waals etkileşimleri, elektrostatik ve hidrofobik etkileşimlerden oluşur. Bu nedenle MIP'ler, küçük molekül tespiti için seçiciliği ve/veya duyarlılığı artırmanın umut verici bir yolu olarak kabul edilir (Kempe, 2001; Hu ve ark., 2013; Rutkowska ve Namieśnik, 2019; Włoch ve Datta, 2019; Bahrani ve ark., 2021).



Şekil 1.6. MIP hazırlığının şematik gösterimi.

MIP'lerin algılama uygulamaları için önemli bir avantajı, moleküler tasarım veya baskılama özgünlüğüdür. Polimerizasyon süreci ve MIP çerçevesi, proteinler veya ilaçlar gibi bir molekül tipiyle sınırlı değildir. Çeşitli monomerler kullanılabilir ve gereksinimlere göre uyarlanabilir (Haupt ve Mosbach, 2000; Chen ve ark., 2011; Chen ve ark., 2016).

Sentez sırasında monomer ve çapraz bağlayıcı seçimi, MIP'lerin performansında hayati bir rol oynar. Monomerin hedef molekülle tamamlayıcı etkileşimlere sahip olması önemlidir. Monomerin fonksiyonel grupları ile hedef molekül arasındaki kovalent ve kovalent olmayan etkileşimler, MIP'in seçiciliğini ve hassasiyetini büyük ölçüde etkiler. Ayrıca, çapraz bağlama maddesinin tipi ve miktarı da seçiciliği etkiler. MIP'lerin diğer avantajları, basitlikleri, hızları, düşük maliyetleri ve daha yüksek algılama limitlerinden kaynaklanmaktadır ve enantiyomerleri ayırt etmek için çok uygundur (Haupt ve Mosbach, 2000; Alexander ve ark., 2006; Chen ve ark., 2011; Whitcombe ve ark., 2014; Chen ve ark., 2016; Kutner ve Sharma, 2018).

1.4.1. Moleküler baskılı polimerlerin bileşenleri

1.4.1.1. Hedef (kalıp) molekül

Moleküler baskılama yönteminin çekici özelliklerinden bir tanesi, çok çeşitli analitlere uygulanabilmesidir. Küçük organik moleküllerin (örneğin, farmasötikler, pestisitler, amino asitler ve peptitler, nükleotid bazlar, steroidler ve şekerler) baskılanması neredeyse rutin olarak kabul edilmektedir. Proteinler, hücreler ve hatta mineral kristaller için özel olarak uyarlanmış protokoller önerilmiş olsa da, daha büyük organik bileşikler (örneğin peptitler) de benzer yaklaşımlarla baskılanabilirken, çok daha büyük yapıların baskılanması hala bir zorluktur (Haupt ve Mosbach, 2000; Chen ve ark., 2016).

Bir MIP, genellikle belirli bir hedef molekülün seçimini ima eden belirli bir analitik kullanım için sentezlenir. Bu molekülün yapısı ve işlevsellikleri, bağlanma yerlerinin sonraki özelliklerini tanımlar. Hedef bir molekül seçilirken göz önünde bulundurulması gereken kriterler, maliyeti, mevcudiyeti ve elbette, monomerlerle güçlü bir şekilde etkileşime girme yeteneğini tanımlayan kimyasal işlevleridir. Kovalent olmayan baskılamada, ilgili etkileşimler zayıftır; bu nedenle, hedef molekül fonksiyonel monomer düzeneklerinin gücünü artırmak için hedef molekül, birden fazla işlevsel bölgeye sahip olmalıdır (Chen ve ark., 2011; Chen ve ark., 2016; Kutner ve Sharma, 2018).

Pahalı veya başka şekilde elde edilmesi zor hedef analitler için, materyalin maliyetini azaltmak amacıyla sentez için hedef molekül olarak yapısal bir analog kullanılabilir. Bu sahte molekül şekil, boyut ve işlevsellik açısından hedef meleküle benzemelidir. Ortaya çıkan MIP, hedef moleküle bağlama kabiliyetine sahip boşlukların oluşmasına yol açmalıdır. Ayrıca sahte yaklaşım, özellikle bileşiklerin eser tayininde polimerden sızan ve hatalı sonuçlara neden olan kalıntı kalıp riskini önlemek için kullanılır. Gerçekten de hedef molekülün MIP'den tamamen çıkarılmasının başarılması zordur ve bazik veya asidik koşullarda çeşitli organik çözücüler ile

kapsamlı yıkama aşamalarını gerektirir. Herhangi bir sızıntı analitten farklı olacağından, sahte bir molekülün kullanılması bu sorunu aşmanın kolay bir yolunu oluşturur. Son olarak, hedef molekülün çok düşük çözünürlüğü MIP sentezi için kullanımına izin vermediğinde sahte yaklaşım da kullanılabilir (Chen ve ark., 2011; Chen ve ark., 2016; Kutner ve Sharma, 2018).

1.4.1.2. Fonksiyonel monomerler

Moleküler baskılama için her türlü polimerizasyon kullanılabilir. Tek şart, polimerizasyonun, tüm bileşenlerin (hedef molekül, çapraz bağlama ajanları, kovalent olmayan baskılamada monomer ve kalıp arasındaki kovalent olmayan eklentiler ve diğerleri) sağlam kaldığı koşullar altında kararlı bir şekilde gerçekleşebilmesidir (Selligren ve ark., 1988; Karim ve ark., 2005; Spivak, 2005).

Fonksiyonel monomerler, polimerizasyon veya kopolimerizasyonda spesifik fonksiyonel gruplar sağlayabilirler. Polimerizasyon işleminde, hedef molekülün ve fonksiyonel monomerin mol oranı, spesifik boşlukların oluşumunda çok önemli bir etkiye sahiptir. Genel olarak, fonksiyon monomerinin kalıp moleküle oranı arttıkça, kalıp molekülün fonksiyonel monomere kendi kendine baskılanması kolay ve tam olarak tamamlanabilir. Bir yandan, fonksiyonel monomer oranının çok yüksek olması polimerizasyona zarar verir, çünkü fonksiyonel monomerin fazlalığı, polimerde birleştirilmemiş fonksiyonel monomer kalıntıları tarafından üretilen seçici olmayan bağlanma bölgelerinde bir artışa yol açar. Öte yandan, fazla fonksiyonel monomer, seçici bağlanma bölgelerinin azalmasıyla sonuçlanan kendi kendine toplanmaya neden olabilir. Ayrıca baskılanmış moleküllerin fonksiyonel grupları ve çözücülerin özellikleri de hazırlama sırasında dikkate alınmalıdır (Selligren ve ark., 1988; Lu ve ark., 2003; Ansell, 2005; Karim ve ark., 2005; Spivak, 2005).

1.4.1.3. Çapraz bağlayıcılar

Çapraz bağlayıcılar, bir ağ oluşturmak için moleküller arasında birbirine bağlanacak şekilde doğrusal molekülleri köprüler ve ayrıca polimer zincir oluşmasını teşvik eder veya düzenler. Çapraz bağlayıcılar, baskılanmış polimerlerin sentezine üç yönden etki ederler. MIP'lerin morfolojisini kontrol ederler. Baskılı tanıma bölgelerini düzeltirler ve MIP dizisinin mekanik stabilitesini etkilerler (Sibrian-Vazquez ve Spivak, 2004; Zhang ve ark., 2005; Shoravi ve ark., 2010; Golker ve Nicholls, 2016).

Çapraz bağlayıcı miktarı, baskılı polimerin birim kütlesindeki aktif fonksiyonel monomerlerin sayısını ve çapraz bağlanma derecesini doğrudan etkilerken, aktif fonksiyonel monomer sayısı ve çapraz bağlama derecesi, MIP'lerin seçiciliğini ve bağlama kapasitesini doğrudan etkiler. Fonksiyonel monomerin çapraz bağlayıcıya oranı, moleküler baskılanmış polimerlerin özellikleri üzerinde çok büyük bir öneme sahiptir. Çapraz bağlayıcı miktarı daha az olduğunda, MIP'lerin boşluk konfigürasyonu, yetersiz çapraz bağlama nedeniyle kendisini kararlı bir durumda tutamaz. Sonuç olarak, moleküler baskılanmış polimerin tanıma kabiliyetini azaltır. Bununla birlikte, çapraz bağlayıcının fazlalığı, birim kütledeki fonksiyonel monomerlerin sayısını azaltır ve ardından tanıma alanlarının sayısını azaltır. Özellikle kovalent olmayan moleküler baskılama için, çapraz bağlayıcı, MIP'lerin farklı çözücülerde şişmesini azaltabilir, seçiciliği iyileştirebilir ve yapısal analogları ayırt etme yeteneğini geliştirebilir. Ayrıca polimer zincir boşluğunu artırarak hedef molekülün tanıma bölgelerine hızla yayılmasını sağlar. MIP'lerin çapraz bağlanma derecesi genellikle %80'den yüksek olmalıdır (Sibrian-Vazquez ve Spivak, 2004; Zhang ve ark., 2005; Shoravi ve ark., 2010; Golker ve Nicholls, 2016).

1.4.1.4. Çözücü

Çözücü, gözenekli yapı polimeri sağlayabilir ve hedef moleküllerin bağlanmasını teşvik edebilir. Çözücü moleküller, polimerizasyon sırasında polimerin içine girer ve daha sonra desorpsiyon işleminde çıkarılır. Başlangıçta çözücü

molekülleri tarafından işgal edilen boşluk, boşluklar haline gelir ve polimerin içinde bırakılır. Çözücü eksikliği ile polimerizasyonda elde edilen polimer, bağlanma ve desorpsiyon sırasında hedef moleküllerin difüzyonu için uygun olmayan yoğun hale gelecektir. Kovalent olmayan MIP'ler için, hedef moleküller ve fonksiyonel monomer arasındaki etkileşim üzerinde çözücünün önemli etkileri vardır. Çözücü, baskılanmış molekül üzerinde yalnızca yüksek çözünürlüğe sahip olmakla kalmamalı, aynı zamanda hedef moleküller ve fonksiyonel monomerler arasındaki etkileşimi de desteklemelidir. Genel olarak, polar çözücü özellikle hedef moleküllerin ve fonksiyon monomerlerinin kombinasyonunu azaltabilir ve hidrojen bağlarının oluşumunu etkileyebilir, bu da MIP'lerin tanıma performansının daha da kötüleşmesine neden olur. Bu nedenle kloroform, toluen, benzen, metilen klorür ve ksilen gibi düşük dielektrik sabiti olan çözücüler sıklıkla kullanılır (Ansell ve Mosbach, 1997; Dong ve ark., 2007; Piletska ve ark., 2009; Ansell, 2015).

Çözücü seçimi, skılamaba türüne bağlıdır. Kovalent baskılamada, tüm bileşenleri tatmin edici bir şekilde çözdükleri sürece birçok çözücü türü kullanılabilir. Kovalent olmayan baskılamada, çözücü seçimi, fonksiyonel monomer ve hedef molekül arasında kovalent olmayan bağlanmanın oluşumunun teşvik edilmesi ve dolayısıyla baskılama verimliliğinin artırılması için daha kritiktir. Kloroform, birçok monomeri ve hedef molekülü başarılı bir şekilde çözdüğü ve hidrojen bağına güçlükle bastırdığı için en yaygın kullanılan çözücülerden biridir (Ansell ve Mosbach, 1997; Dong ve ark., 2007; Piletska ve ark., 2009; Ansell, 2015).

1.4.1.5. Başlatıcılar

MIP'lerin hazırlanmasında kullanılan başlatma yöntemleri temel olarak elektrokimyasal polimerizasyon, radikal polimerizasyon ve radyasyon polimerizasyon yöntemlerine ayrılır. Radikal polimerizasyon başlatıcısı, polimerizasyonda kullanılan serbest radikal başlatıcı olarak bilinir. Vinil radikal polimerizasyonunun ve kopolimerizasyonunun başlatılması için ve ayrıca doymamış poliester kürleme çapraz bağlama ve polimer çapraz bağlama reaksiyonu için kullanılabilen, termal olarak

serbest radikallere (yani birincil radikal) ayrışma eğiliminde olan bileşiklerdir. Moleküler yapıya göre, başlatıcılar genellikle benzoil peroksit (yağda çözünür), potasyum persülfat (suda çözünür); azobisisobütironitril (yağda çözünür), V-50 başlatıcı (suda çözünür) gibi azo bileşiği başlatıcısı; hidrojen peroksit demir tuzu (suda çözünür) ve benzeri gibi redoks başlatıcı. Azobisisobütironitril ve azobisisobütironitril G nitril, genellikle radikal polimerizasyonda başlatıcı olarak kullanılır. Yaygın olarak kullanılan başlatma yöntemleri, termal başlatma (60 °C) ve genellikle 0 °C'de foto başlatmadır. Başlatma yönteminin benimsenmesi büyük ölçüde hedef moleküllerin özelliklerine bağlıdır (Mijangos ve ark., 2006; Çakir ve ark., 2013; Liu ve ark., 2020).

1.4.2. Moleküler baskılama yöntemleri

1.4.2.1. Kovalent baskılama

Polimerizasyondan önce, fonksiyonel monomer ve şablon, kovalent bağ ile birbirine bağlanır. Daha sonra bu kovalent konjugat, kovalent bağın sağlam olduğu koşullar altında polimerleştirilir. Polimerizasyondan sonra kovalent bağ parçalanır ve hedef molekül polimerden çıkarılır. Baskılanmış polimerler tarafından konuk bağlanması üzerine, aynı kovalent bağ oluşur (Komiya ve ark., 2003).

Kovalent baskılamanın avantajları:

1. Monomer-hedef molekül konjugatları kararlı ve stokiyometriktir ve bu nedenle moleküler baskılama süreçleri (ayrıca polimerdeki konuk bağlama bölgelerinin yapısı) nispeten nettir.
2. Çok çeşitli polimerizasyon koşulları (yüksek sıcaklık, yüksek veya düşük pH ve yüksek polar çözücü vb.) kullanılabilir, çünkü konjugatlar kovalent bağlarla oluşturulur ve yeterince kararlıdır (Komiya ve ark., 2003).

Kovalent baskılamanın dezavantajları:

1. Monomer-kalıp eşleniğinin sentezi genellikle sorunludur ve daha az ekonomiktir.
2. Mevcut tersinir kovalent bağların sayısı sınırlıdır.
3. Baskı etkisi, bazı durumlarda, oldukça şiddetli koşullar gerektiren 3. adımda (kovalent bağların bölünmesi) azalır.
4. Hedef molekülü bağlama ve bırakma, kovalent bir bağlantının oluşumunu ve parçalanmasını içerdiğinden yavaştır (Komiya ve ark., 2003).

1.4.2.2. Kovalent olmayan baskılama

Fonksiyonel bir monomeri bir hedef molekül ile bağlamak için burada kovalent olmayan etkileşimler (örneğin, hidrojen bağı, elektrostatik etkileşim ve koordinasyon bağı oluşumu) kullanılır. Böylece, katkı maddeleri, bileşenlerin reaksiyon karışımlarına eklenmesiyle yerinde elde edilebilir (adım 1). Polimerizasyondan sonra (adım 2), uygun çözücüler ile hedef molekül çıkarılır (adım 3). Polimer tarafından hedef molekül bağlanması, kovalent olmayan etkileşimler yoluyla tekrar gerçekleşir (Komiya ve ark., 2003).

Kovalent olmayan baskılamanın avantajları

1. Kovalent monomer-hedef molekül konjugatlarının sentezi gereksizdir.
2. Hedef molekül, kovalent olmayan etkileşimlerle yalnızca zayıf bir şekilde bağlandığından, çok yumuşak koşullar altında polimerden kolayca çıkarılır.
3. Kovalent olmayan etkileşimlerden yararlanan hedef molekülü bağlama ve bırakma hızlıdır (Komiya ve ark., 2003).

Kovalent olmayan baskılamanın dezavantajları

1. Baskılama işlemi daha az nettir (monomer-hedef molekül etkileşimi kararsızdır ve kesinlikle stokiometrik değildir).
2. Polimerizasyon koşulları, karışımlarda kovalent olmayan etkileşim oluşumunu en üst düzeye çıkarmak için dikkatlice seçilmelidir.

3. Çok fazla miktarda bulunan fonksiyonel monomerler (eklenme oluşumu için dengeyi değiştirmek için) sıklıkla spesifik olmayan bağlanma bölgeleri sağlayarak bağlanma seçiciliğini azaltır (Komiya ve ark., 2003).

1.4.3. Kiral ayırımlar için moleküler baskılanmış teknikler

Kiral sensörler, bir numune veya rasemik karışım içindeki enantiyomerlerin miktarını tanıyabilen ve belirleyebilen cihazlardır. Bir kiral sensör enantioselektif tanıma yüzeyi ve dönüştürücü eleman olarak üzere genellikle iki bölümden oluşur. Tanıma bölümünün özgüllüğünü artırmak için çeşitli modifikasyonlar uygulanabilir. Bu modifikasyonlar arasında MIP'ler, kolay hazırlanma, yüksek dayanıklılık ve düşük maliyet gibi birçok avantajı nedeniyle en umut verici malzeme olarak kabul edilir. Genel olarak, MIP tabanlı kiral sensörler, MIP polimerlerini dönüştürücünün yüzeyine birleştirilerek üretilir ve hedef molekül ile etkileşim veya bağlanma gibi polimer matrisindeki değişiklikler ölçülebilir bir sinyale dönüştürülebilir. Sinyal iletimi açısından elektrokimyasal veya optik sensörler gibi çeşitli ölçüm teknikleri kullanılabilir (Sellers ve ark., 1988; Ansell, 2005; Liu ve ark., 2020).

1.4.3.1. MIP temelli sıvı kromatografisi

Kromatografi, bir karışımdaki çeşitli bileşenlerin ayrılmasını gerçekleştirmek için kullanılan, kalitatif ve kantitatif analizlerin yapıldığı bir grup yöntemin genel adıdır. Günümüzde kromatografi, karmaşık bir numune içindeki birçok farklı molekülün tanımlanması ve nicelenmesi için en çok kullanılan analiz yöntemlerinden biri haline gelmiştir. Bu tekniklerden yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), kiral bileşiklerin ayrılması ve tanınması için yaygın olarak kullanılmaktadır. Genel olarak, enantiyomerlerin tanınması, kromatografi ile kiral durağan fazdaki rasemik karışımda gerçekleştirilebilir (Maier ve Lindner, 2007; Yang ve ark., 2016; Rutkowska ve ark., 2018).

MIP'ler ayrıca kromatografiye bağlanmıştır ve sabit faz olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Geleneksel enantioselektif tekniklerle karşılaştırıldığında, polimerlerin kiral baskılanmasının birçok avantajı vardır: hazırlama kolaylığı, düşük malzeme maliyetleri ve özellikle zorlu ortamlarda çalışmaya uygunluk. Bu reaktif, enantiyomerik olarak zenginleştirilmiş veya kiral ayırma sağlayan saf bir madde olabilir. Ek olarak, bir enantioselektif katalizör kiral sabit fazın veya mobil faza eklenen katkı maddesinin ayrılmasında da rol oynayabilir. HPLC'yi hazırlayıcı olarak kullanmanın en önemli avantajı, enantiyomerlerin tamamen kiral seçici kayıp olmadan ve kiral seçiciden analite kontaminasyon riski olmadan elde edilebilmesidir. Enantiyoayırma ek olarak, kiral bileşiklerde bulunabilen diğer safsızlıklar da bu yöntemle giderilebilir (Maier ve Lindner, 2007; Yang ve ark., 2016; Rutkowska ve ark., 2018).

1.4.3.2. MIP temelli kapiler elektrokromatografi

Kapiler elektrokromatografi (CEC), oldukça seçici durağan fazlarda yaygın olarak kullanılan bir hibrit ayırma tekniğidir ve sıvı kromatografisi (LC) ile elektroforezin avantajlarını birleştirir. Bu teknik, yüksek etkinliği, basit enstrümantasyon gereksinimleri, kısa analiz süresi, düşük çözücü tüketimi ve yüksek seçiciliği nedeniyle avantajlıdır. Moleküler tanıma yetenekleri ve kararlılıkları nedeniyle, MIP'lerin kapiler elektrokromatografide de kullanıldığı bulunmuştur. CE ve CEC'de enantiyomerlerin ayrılması için MIP uygulamaları, yüksek ayırma verimliliği, yüksek seçicilik ve CE ve CEC'deki MIP şablonu miktarının minimum gerekliliği gibi ana özelliği nedeniyle LC'yi geride bırakarak daha kullanışlı hale gelmektedir. CEC uygulamalarına uygun MIP yüklü kapilerler üretmek için özel MIP formatlarının geliştirilmesi gerekmektedir (Maier ve Lindner, 2007; Yang ve ark., 2016; Rutkowska ve ark., 2018).

1.4.3.3. Optik MIP tabanlı kiral sensörler

Kiral moleküller için optik sensörlerin geliştirilmesi biyolojik, kimyasal ve farmasötik bilimlerde çok önemlidir. Optik ve özellikle floresan yöntemler, MIP tabanlı sensörler için etkili araçlardır. Optik MIP sensörleri, bir numunedeki optik sinyalleri ölçer ve bunu bir elektronik çıktıya dönüştürür. Optik sensörler, basitlikleri, hassasiyetleri, iyi seçicilikleri ve maliyet etkinlikleri nedeniyle özellikle kiral tanıma için analitlerin eser analizi için ilgi çekicidir (Chen ve ark., 2018; Ahmad ve ark., 2019).

1.4.3.4. Elektrokimyasal MIP tabanlı kiral sensörler

Kromatografik ve spektrofotometrik tekniklerle karşılaştırıldığında, kiral sensörler için elektrokimyasal yöntemler, kolay hazırlama, nispeten düşük maliyet ve küçük numune hacimleri gerektirmesi gibi avantajları nedeniyle büyük ilgi görmüştür. Karmaşık numunelerin elektrokimyasal analizi, yüksek seçicilikle ve herhangi bir ön saflaştırma aşamasına ihtiyaç duymadan harika sonuçlar göstermiştir. Moleküler baskılama teknolojisine dayalı kiral elektrokimyasal sensörlerin tasarımına olan ilgi, özellikle kiral ayırma için son yıllarda önemli ölçüde artmıştır. Öte yandan, enantiyomer tanımlaması, verimli tekniklerin eksikliğinden dolayı hala oldukça zordur (Prasad ve ark., 2017; Beluomini ve ark., 2017; Jaiswal ve ark., 2019; Duan ve ark., 2019).

Enantiyomer tespiti için MIP'leri ve elektrokimyasal sensörleri birleştirmek, en umut verici yaklaşımlardan biri haline geldi. Geçtiğimiz birkaç yıl içinde, voltametrik/potansiyometrik ölçümler kullanılarak MIP tabanlı kiral elektrokimyasal algılamaya dayalı birçok çalışma yayınlanmıştır. MIP tabanlı kiral ayırımların artan araştırmalarından farklı olarak, MIP tabanlı elektrokimyasal kiral sensörlerin araştırılması hala sınırlıdır (Prasad ve ark., 2017; Beluomini ve ark., 2017; Jaiswal ve ark., 2019; Duan ve ark., 2019).

1.5. Elektrokimya

Elektrokimya; maddenin elektrik enerjisiyle etkileşmesi ve bunun sonucunda meydana gelen fiziksel değişiklikleri, kimyasal dönüşümleri ve kimyasal enerjinin elektrik enerjisine çevrilmesini inceleyen bilim dalıdır. Elektrokimya, bir maddeden diğer maddeye elektron geçişini inceler ve bu elektron geçişi tayini yapılan analiz hakkında bilgi verecek akım meydana getirir (Skoog ve ark., 1998).

Elektrokimyasal tepkimeler, yükseltgenme-indirgenme yani redoks tepkimeleridir ‘elektrokimyasal hücre’ adlı bir hücrede gerçekleşir. Elektrokimyasal bir hücrede, iki metalik iletken (elektrot) uygun bir elektrolit çözeltisine daldırılmış şekilde bulunur (Skoog ve ark., 1998; Ozkan ve ark., 2015b).

1.5.1. Elektrokimyasal hücreler

Elektrokimyasal bir hücrede, iki elektrot uygun bir elektrolit çözeltisine daldırılmış şekilde bulunur. Sistemde bir elektrik akımı oluşturmak için elektrotların dıştan bir iletken yardımıyla bağlanması ve elektrolit çözeltisinin, iyonların birinden diğerine hareketi sağlayacak şekilde birbiriyle bağlantılı bir şekilde bulunması gerekir.

Elektrokimyasal bir hücrenin anodunda yükseltgenme, katotunda indirgenme reaksiyonu oluşur. Bu tanım elektrolitik ve galvanik hücreler içinde geçerlidir. Elektrokimyasal hücreler dış kaynaktan elektrik alıp harcıyorsa “elektrolitik”, elektrik enerjisi üretiminde kullanılıyorsa "galvanik" ismini alır (Skoog ve ark., 1998; Ozkan ve ark., 2015b).

Bir elektrokimyasal tepkimenin oluşması için, maddenin kimyasal dönüşüme uğradığı elektrot sistemi (genellikle üçlü elektrot sistemi), incelenen maddeyi içeren bir çözelti ve bu elektrotları birbirine bağlayan bir dönüştürücü sistemi gereklidir.

Elektriksel iletkenliği sağlamak amacıyla tampon çözelti kullanılmaktadır. Çeşitli elektroanalitik yöntemler ile dönüşümlü voltametri (DV), diferansiyel puls voltametrisi (DPV), kare dalga voltametrisi (KDV) gibi belirli potansiyel aralığında akım ölçölür (Brett ve Brett, 1993; Ozkan ve ark., 2015a).

Elektroanalitik kimya; analizi yapılacak olan çözelti, bir elektrokimyasal hücrenin parçası olduğunda çözeltinin elektrokimyasal özelliklerine dayanan bir grup kantitatif analit yöntemi kapsar. Elektroanalitik teknikler kullanılarak çok düşük tayin sınırları ve elektrokimyasal yöntemlerin uygulanabildiği sistemler hakkında çok fazla bilgi elde edinilir (Brett ve Brett, 1993; Skoog ve ark., 1998; Ozkan ve ark., 2015a).

Geleneksel analiz yöntemleriyle kıyaslandığında, elektroanalitik yöntemler birçok avantaja sahiptir. Elektrokimyasal ölçümler genellikle bir moleküle veya tepkime sonunda oluşacak ürüne özel bir yükseltgenme basamağı için spesifikdir. Diğer bir avantajı da, kullanılan ekipmanların nispeten daha ucuz olmasıdır (Brett ve Brett, 1993; Skoog ve ark., 1998).

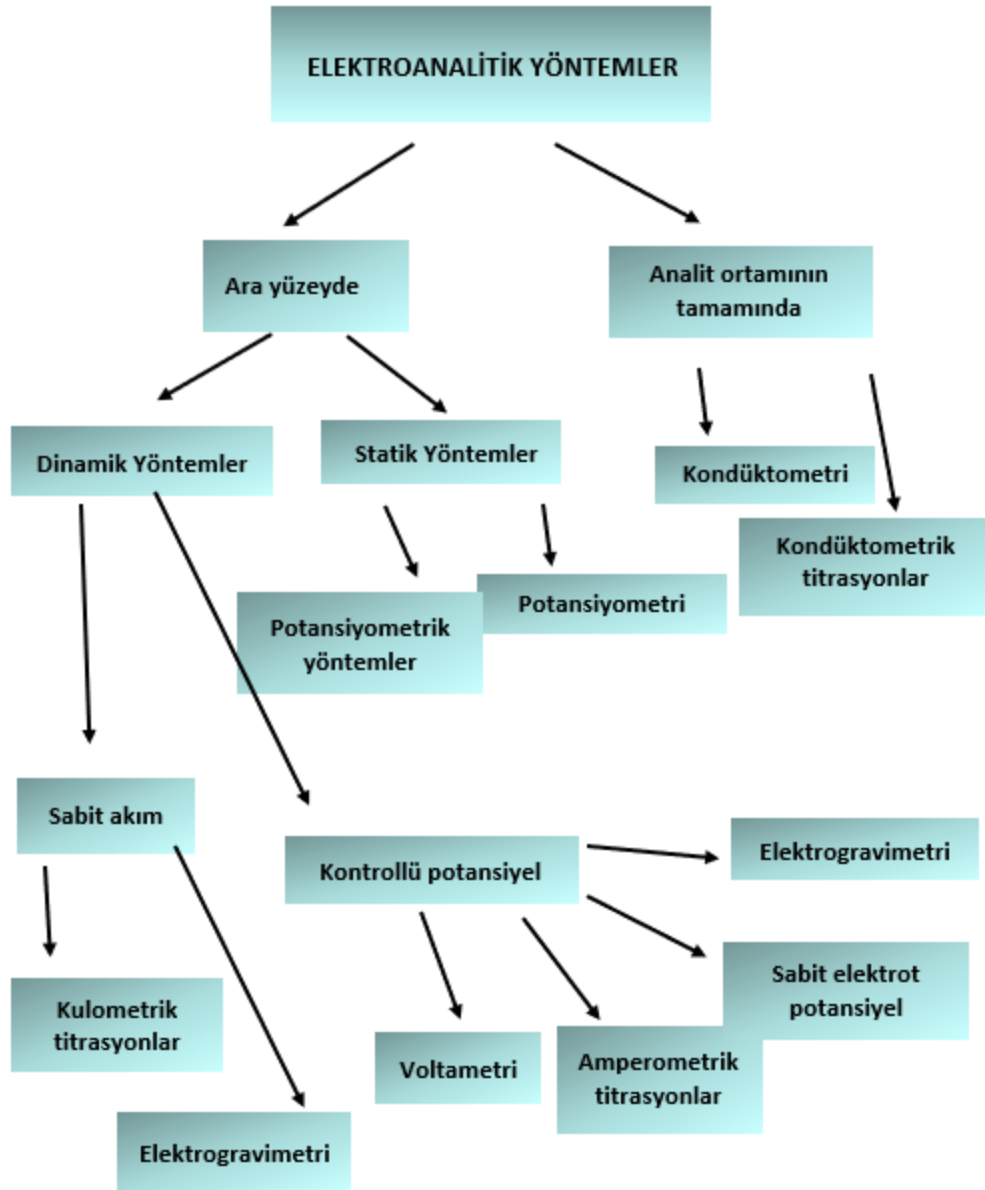
1.5.2. Elektrokimyasal yöntemler

Elektrokimyasal yöntemler, çözelti-elektrot sistemine elektriksel bir etki uygulanarak yük, akım, potansiyel gibi elektriksel niceliklerin ölçölmesi esasına dayanır. Bir başka deyişle numunedeki analit miktarının ilgili bir elektriksel özellik yardımı ile ölçölmesidir (Skoog ve ark., 1998).

Elektrokimyasal yöntemler ile çok düşük tayin sınırlarında da ölçüm yapılabilir ve bu yöntemlerin uygulandığı sistemler hakkında; kütle aktarım hızı, ara yüzeyde yük aktarımının hızı, kimyasal reaksiyonların denge ve hız sabitleri, adsorbsiyon derecesi gibi çok sayıda karakteristik sistem bilgilerini verir (Skoog ve ark., 1998)

Elektrokimyasal yöntemler endüstri alanlarında materyal izlenmesinde, çevrenin izlenmesinde ve bilimsel alanlardaki çalışmalarda oldukça kullanılmaktadır. En çok tercih edilen yöntemlerden birisi de voltametridir.

Elektrokimyasal yöntemler dengeden uzakta net akımın bulunduğu dinamik ($i \neq 0$) yöntemler ve denge durumunda statik yani net akımın sıfır olduğu ($i = 0$) yöntemler olarak ikiye ayrılır (Kissinger ve Heineman, 1996).



Şekil 1.7. Elektroanalitik yöntemlerin sınıflandırılması.

1.6. Voltametri

Voltametri derişim, akım ve gerilim ilişkilerinin çalışma elektrodu olarak isimlendirilen polarize bir elektrot yardımı ile incelenmesi esasına dayanan elektrokimyasal bir yöntemdir. Uygulanan gerilimin ölçülen akıma karşı grafiğe geçirilmesine de voltamogram denir (Bond, 1980).

Voltametri çok düşük derişimlerde çalışılabilinmesi, fazla maddeye ihtiyaç duyulmaması, birden çok numunelerin analizine imkân vermesi analizlerin tekrarlanabilir ve hızlı olması gibi nedenlerle diğer elektrokimyasal yöntemlere üstündür (Bond, 1980).

Voltametrinin çalışma prensibi; elektrokimyasal hücrede bir referans (karşılaştırma) ile polarize olabilen bir indikatör (çalışma) elektrodu arasında değeri zamanla değiştirilen potansiyel uygulanması ile ortaya çıkan akımın üç elektrotlu hücrelerde çalışma elektrodu ile karşıt (yardımcı) elektrot, iki elektrotlu hücrelerdeyse karşılaştırma elektrodu ile çalışma elektrodu arasında ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Bond, 1980).

Voltametri, analit hakkındaki bilgilerin, bir göstergenin veya çalışan elektrotun polarizasyonunu teşvik eden koşullar altında elde edilen uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak akımın ölçümünden türetildiği bir grup elektroanalitik yöntem içerir. Genel olarak, polarizasyonu arttırmak için voltametrinde çalışan elektrotlar, yüzey alanları en fazla birkaç milimetre kare ve bazı uygulamalarda birkaç mikrometre kare veya daha az olan mikro elektrotlardır (Skoog ve ark., 1998).

Tarihsel olarak, voltametri alanı, 1920'lerin başında Çekoslovak kimyager Jaroslav Heyrovsky tarafından keşfedilen özel bir voltametri türü olan polarografiden geliştirildi. Halen voltametrinin önemli bir dalı olan polarografi, çalışan mikroeletrotların damlayan cıva elektrotu şeklini almasıyla diğer voltametri türlerinden farklıdır (Skoog ve ark., 1998).

Bir voltametrik deneyde, iki elektrot (bir çalışma elektrotu ve bir referans elektrot) kullanılarak bir sisteme (örneğin, çözeltideki bir geçiş metali kompleksi) bir potansiyel uygulanır ve akım yanıtı, çalışma elektrotu ve üçüncü bir elektrot kullanılarak ölçülür, yardımcı elektrot. Akım, çalışma elektrotunun enerji seviyeleri ile incelenen sistemin moleküler enerji seviyeleri arasındaki elektron transferinden kaynaklanır. Bu akıma genellikle faradaik akım denir. Elektronların doldurulmuş elektrot orbitallerinden boş moleküler orbitallere aktarılmasına indirgeme, doldurulmuş moleküler orbitallerden boş elektrot orbitallerine elektron aktarımı ise oksidasyon olarak adlandırılır. Oksidasyon veya indirgemenin gerçekleşip gerçekleşmeyeceği, elektrotun Fermi seviyesinin nispi enerjilerine (yani, işgal edilen en yüksek elektrot orbitalinin enerjisi) ve sınır moleküler orbitallerine bağlıdır; örneğin, Fermi seviyesi en düşük boş moleküler orbitalden daha yükseğe indirgeme meydana gelebilirken oksidasyon, Fermi seviyesinin dolu en yüksek moleküler orbitalden daha düşük olmasını gerektirir. Fermi seviyesi, elektrota uygulanan potansiyel tarafından belirlenir; yani uygulanan potansiyelin değiştirilmesi elektrotun oksitleme/indirgeme kabiliyetini değiştirir. Örneğin, daha fazla negatif potansiyel, elektrotun indirgeme kabiliyetini artırır. Buna karşılık, moleküler sınır orbitallerinin enerjileri moleküler yapı tarafından belirlenir ve sabit olarak kabul edilebilir. Bu nedenle, voltametri deneylerinde yaygın bir yaklaşım, uygulanan potansiyeli değiştirmek ve bir akım yanıtının tespit edildiği potansiyeli kaydetmektir; yani, oksidasyon veya indirgemenin meydana geldiği enerji. Redoks potansiyeli bu enerjinin bir ölçüsüdür (Bond, 1980; Skoog ve ark., 1998; Bagotsky, 2006).

Voltametri, çeşitli ortamlarda oksidasyon ve indirgeme süreçleri, yüzeyler üzerinde adsorpsiyon süreçleri ve kimyasal olarak değiştirilmiş elektrot yüzeylerinde elektron transfer mekanizmalarının temel çalışmaları dahil olmak üzere, inorganik, fiziksel ve biyolojik kimyagerler tarafından analitik olmayan amaçlar için yaygın olarak kullanılmaktadır (Bond, 1980; Skoog ve ark., 1998; Bagotsky, 2006).

Kontrollü potansiyel elektroanalitik deneylerin amacı, hedef analitin derişimi ile ilgili bir akım yanıtı elde etmektir. Böyle bir amaç, analitin redoks işlemi sırasında elektron(lar)ın transferini izleyerek gerçekleştirilir:

1.6.1. Sabit elektrot voltametrisi

1.6.1.1. Doğrusal taramalı voltametri

Miktar tayinlerinde kullanılması sınırlı olsa da metal organik sistemlerin yükseltgenme ve indirgenme işlemlerinin mekanizmalarının aydınlatılmasında önemlidir (Brett ve Brett, 1993; Skoog ve ark., 1998; Bard ve Faulkner, 2001; Ozkan ve ark., 2015a).

1.6.1.2. Dönüşümlü voltametri

Çok sık kullanılan bir yöntemdir. Değiştirilen potansiyele karşı elde edilen akımın ölçülmesine dayanır. Bu yöntemde potansiyel belli bir değere çıkarılır ve ardından ilk değere ya da başka bir değere döndürülür. Potansiyel-akım grafiği uygulanan potansiyele karşı akımın ölçülmesi ile elde edilir. Bu yöntemin kullanılması sonucu elektron transferinin kinetiği gösterilir. Ayrıca bu teknik adsorpsiyon hakkında da bilgi verir. Bu yöntem, maddeye ait olduğu düşünülen pikin düzgün ve ölçülebilir olup olmadığını ve reaksiyonun ilerleme yönünü gösterir (Brett ve Brett, 1993; Skoog ve ark., 1998; Bard ve Faulkner, 2001; Ozkan ve ark., 2015a).

Bu teknik kullanılarak çalışılan madde pikinin anodik mi yoksa katodik mi olduğu da kolayca anlaşılabilir. Elektrot yüzeyinde meydana gelen reaksiyonun tersinir ve ya tersinmez olduğu da belirlenir. Negatif alanda çıkan pik daima katodik, pozitif alanda çıkan pik ise daima anodiktir. Sadece katodik ya da sadece anodik pik varsa bu reaksiyonlar geri dönüşümsüz yani tersinmez reaksiyonlardır. Hem katodik hem anodik pik varsa bu reaksiyonlar geri dönüşümlü yani tersinir reaksiyonlardır. Bunun sonucunda elektrot yüzeyinde oluşan reaksiyonun mekanizması çözümlenebilir (Brett ve Brett, 1993; Skoog ve ark., 1998; Bard ve Faulkner, 2001; Ozkan ve ark., 2015a).

1.6.2. Puls voltametrik yöntemler

Doğrusal taramalı voltametrinin yavaş olması ve hassasiyetinin düşük olması nedeniyle bu metodun yerine kullanılması amacıyla geliştirilen bir metottur. İlk olarak damlayan civa elektrot için geliştirilmiş ve zamanla diğer elektrotların kullanıldığı sistemlerde de kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntemler yapılan analizin duyarlılığını da artırmaktadır (Brett ve Brett, 1993; Skoog ve ark., 1998).

1.6.2.1. Diferansiyel puls voltametri

Diferansiyel puls voltametrisi, birçok elektroaktif maddenin eser miktarlarının tayininde sıklıkla kullanılır. Bu teknikte yavaşça yükselen bir doğru akım (DA) sinyali üzerine yükseklikleri sabit voltaj pulslarının biniştirilmesi ile oluşan uyarıcı sinyal kullanılmaktadır. Pulstan önce ve pulsun sonuna doğru akım, iki kere ölçülüp bunların farkı sinyal olarak kaydedilmektedir.

Akımın örneklendiği noktada kapasitif akımın minimum olması avantajıdır. Bu nedenle sinyal/gürültü oranı iyileştirilmiş olup, çok düşük tayinlere imkân vermektedir (Skoog ve ark., 1998; Bard ve Faulkner, 2001).

1.6.2.2. Kare dalga voltametri

Kare dalga voltametri de pulstan önce ve sonra akım değerleri ölçülerek farkı alınır. Bunun sonucunda duyarlılık artar, kapasitif akım giderilir. Bu yöntem çok düşük derişimlerde bile doğru ve hassas analize olanak sağladığı için pek çok analizde tercih edilir. Ayrıca çok kısa sürede sonuç verir (Skoog ve ark., 1998; Bard ve Faulkner, 2001).

Pek çok yönden diferansiyel puls voltametriye benzer. Bu yöntemde de pulstan sonra ve önce akım değerleri ölçülerek farkı alınır. En belirgin fark ise DPV ye göre daha kısa sürede sonuç vermesidir. KDV çok düşük derişimlerde bile hassas ve doğru bir analiz sağladığı için birçok analizde kullanılır (Skoog ve ark., 1998; Bard ve Faulkner, 2001).

1.6.3. Sıyırma voltametri

Bu yöntemin temeli elektroaktif bir maddenin elektrot yüzeyinde birikmesi sonucu tayin edilmesi işlemine dayanır. Burada madde biriktirilirken uygulanacak potansiyelin hangi yönde taranması gerektiği son derece önemlidir. Potansiyel sıyırma işlemi katotta olacaksa katodik yönde, anotta olacaksa anodik yönde taranır (Skoog ve ark., 1998; Bard ve Faulkner, 2001).

1.6.3.1. Anodik sıyırma voltametrisi

Genelde metal tayinleri için kullanılan bir yöntemdir. Sebebi çok kk miktarlardaki derişimlerde bile tayin yapılabilmesine imkân sağlar.

Bu yöntemde önce negatif yönde potansiyel uygulanır ve tayin edilecek analitin çalışma elektrodu üzerine birikmesi sağlanır. Daha sonra pozitif yönde potansiyel uygulanarak elektrot yzyinde biriken analitin yüzeyden ayrılması sağlanır. Voltamogramda çözeltideki analit derişimlerinin tayin edilmesini sağlayacak pikler elde edilir. Bu piklerin yüksekliği ölçülerek çözeltideki elektroaktif maddenin kantitatif analizi hassas bir şekilde yapılır.

1.6.3.2. Katodik sıyırma voltametrisi

Anodik sıyırma voltametrisinde uygulanan işlemlerin tam tersi uygulanır. Yani önce pozitif yönde potansiyel uygulanır. Çalışma elektrodu yüzeyinde ölçülmek istenen analitin tuz oluşturması sağlanır. Daha sonra negatif yönde potansiyel uygulanıp oluşan bu tuzun elektrot yüzeyinden ayrılması sağlanır.

1.6.3.3. Adsorptif sıyırma voltametrisi

Çok düşük miktarlardaki maddelerin doğru ve güvenilir bir şekilde analiz edilebilmesine imkân sağladığı için son yıllarda kullanımı oldukça yaygınlaşmıştır. Bu yöntemde genelde modifiye elektrotların kullanımı tercih edilir. Önce analit elektrot yüzeyinde adsorblanır, daha sonra da sıyırma işlemi yapılır. Yüksek hassasiyetle ölçüm yapılabilmesine imkân sağladığı için ilaç analizlerinde kullanımı fazladır.

1.6.4. Polarografi

Voltametrik metotta damlayan civa elektrodu (DCE) çalışma elektrodu olarak kullanılıyor ise metot polarografi adını alır. Uygulanan potansiye karşı elde edilen akımların grafiğe geçirilmesi sonucu polarogram denilen grafikler elde edilir. Bu yöntemde en çok kullanılan elektrot damlayan civa elektrottur. Civa elektrodun çok yüksek potansiyellere çıkabilmesi nedeniyle polarografik yöntemler oldukça kullanışlı yöntemlerdir. Fakat civanın toksik etkileri nedeniyle son yıllarda bu elektrodun kullanımı sınırlanmıştır (Bond, 1980).

1.6.5. Voltametri yönteminde kullanılan elektrotlar

1.6.5.1. Voltametri yönteminde kullanılan çalışma elektrotları

Referans elektrota karşı potansiyeli zamanla doğrusal olarak değişen elektrotlara çalışma elektrodu denir. Bu elektrotların polarize olma eğilimlerini arttırmak için boyutları küçük tutulmaktadır. Analit çalışma elektrodunun yüzeyinde indirgenir veya yükseltgenir ve analit derişimindeki değişmelere göre zamanla potansiyeli değişir. Bu elektrotların polarlanabilme özellikleri vardır. Voltametrde kullanılan elektrotların elektrokimyasal ve kimyasal özellikleri önemlidir (Ozkan, 2012).

Çalışma elektrodu olarak civa elektrotlar (Damlayan civa, asılı civa, civa film), metal temelli katı elektrotlar (Au, Pt, Ag), ve karbon temelli katı elektrotlar kullanılmaktadır.

1.6.5.2. Voltametrde kullanılan referans elektrotları

Deney süresince potansiyeli sabit olan elektrota referans elektrot denir. Bu elektrotlara polarizlenmeyen elektrotta denir. Bu elektrotlar pil hücresindeki potansiyeli ölçülen diğer elektrotlarla karşılaştırma yapmak için kullanılır. En çok kullanılan referans elektrotlar doymuş Ag/AgCl elektrot ve kalomel elektrottur.

Gümüş-gümüş klorür elektrot: En yaygın kullanılan referans elektrotlardandır ve Ag bir telin, elektrolitik yoldan AgCl ile kaplanarak klorür iyonu içeren bir çözeltiye daldırılmasıyla elde edilir.

Kalomel elektrot: Bu elektrodun potansiyeli klorür iyonlarının aktifliğine bağlıdır. Kolay hazırlanır ve kalomel ve metalik cıvadan oluşmuş bir karışım ve KCl çözeltisinden oluşur. En yaygın kullanılanı, içerisinde doymun KCl çözeltisi bulunan doydun kalomel elektrottur.

Civa-civa sülfat elektrot: Doygun kalomel elektroda benzer bir elektrottur. Potansiyeli, sülfat iyonlarının aktifliğine bağlıdır.

1.6.5.3. Voltametrinde kullanılan yardımcı (karşıt) elektrot

Kullanım amacı elektronlar için bir havuz ve kaynak oluşturmaktır. Bunun sayesinde akım geçmesi sağlanır. Yardımcı elektrotlar ölçülen potansiyelin büyüklüğünün tayininde rol almazlar ve çalışma elektrodu ile çift oluşturur. Akımın yardımcı yardımcı elektrodun üzerinden geçmesinden dolayı kullanılan bu elektrotların soy metal olması gerekir. Bu yüzden grafit, tantal, platin ya da tungsten teller kullanılır (Ozkan, 2012).

1.7. Analitik yöntem validasyonu

Kliniksel çalışmaların en önemli basamaklarından biri analizdir. Bu noktada, biyolojik öneme sahip moleküllerin ve ilaç moleküllerinin nitel ve nicel analizleri, metabolit tayinleri, biyoeşdeğerlik ve biyoyararlanım çalışmaları gibi kliniksel öneme sahip çalışmalarda analitik yöntemlerin gereksinimi ön plana çıkmaktadır. Ancak bahsi geçen bu çalışmaların yapılabilmesi noktasında kullanılan analitik yöntemin doğru ve güvenilir olması gerekir. Bir analitik yöntemin doğruluğunu ve güvenilirliğini ortaya koymak için yapılan işlemlerin bütününe “validasyon” adı verilir (Huber, 2003).

1.7.1. Doğruluk

Doğruluk, gerçekleştirilen analiz yöntemi sonucu elde edilen değerin gerçek değer yakınlığının ölçüsü olarak tanımlanır. Yöntem doğruluğu, % geri kazanım değerleri ile belirlilir. Geri kazanım çalışmaları, analitin en az 3 farklı derişiminde gerçekleştirilir.

- Düşük derişim (tavin alt sınırında veya yakın bir değerde)
- Orta derişim (çalışma aralığının ortasında yer alan bir derişim değesinde)
- Yüksek derişim (çalışma aralığının üst sınırında veya yakın bir bir değerde)

Seçilen her bir derişim için en az 5 tekrarlı analiz yapılmalıdır. Elde edilen sonuçlar geri kazanım değerlerine dönüştürölür ve geri kazanım değeri %100'e ne kadar yakınsa yöntemin o kadar doğru olduğu düşünölür. Doğruluğun tespiti için aşağıda belirtilen 3 yol izlenebilir (Ozkan, 2012). Bunlar;

Referans standart bir yöntem ile karşılaştırmak: Geliştirilen analitik yöntem kullanılarak, analitin 3 farklı derişiminde 3'er kez ölçüm gerçekleştirilir ve %geri kazanım değerleri hesaplanır. Elde edilen sonuçlar referans yöntemin sonuçları ile istatikselsel olarak karşılaştırlılır. Bu karşılaştırmma işleminde student-t ve F testleri kullanılır. Student-t testi ile iki yöntemin sonuçlarının ortalamaları kıyaslanırken, F testi ile de yöntemlerin standart sapmaları arasındaki farklılıklar karşılaştırlılır. Hesaplanan t ve F değerleri, teorik t ve F değerleri ile karşılaştırlılarak geliştirilen yöntemin doğruluğu hakkında bilgi edinilir. Eğer elde edilen değerlerin teorik değerlerden küçük veya yakın olması durumunda geliştirilen yöntemin en az referans alınan yöntem kadar hassas olduğu teşhisine varılır. bağılı olarak yöntemin doğruluğu hakkında bilgi edinilir. Elde edilen sonuçların ortalamaları, aşağıdaki eşitliklerde belirtilen % bağılı standart sapma (% BSS) ve/veya % bağılı hata (% BH) ile birlikte verilir.

$$\% BSS = \frac{SS}{X_{ort}}$$

$$\% BH = \frac{GD - X_{ort}}{GD} \times 100$$

Eşitlikte GD: Gerçek değer, SS: Standart sapma, Xort: Ortalama değeri ifade etmektedir.

Standart ekleme yöntemi ile saf madde ilave etmek: Analiz edilecek maddenin bilinen miktardaki çözeltisi, bir matriks içerisindeki miktarı bilinmeyen veya daha öncesinde tayin edilmiş aynı maddenin üzerine eklenir. Numunedeki analiz maddesinin miktarı deneysel veriler kullanılarak matematiksel işlem yardımıyla belirlenir. Saf madde ilavesinde genel yaklaşım, analiz ortamındaki maddenin %25, 50 ve 100 oranındaki ilaveleri olarak belirtilir. Her bir basamakta en az 3'er ölçüm yapılır. Bu teknik genellikle matriks ortamındaki katkı ve yardımcı maddelerin bilinmediği durumlarda kullanılır. Elde edilen sonuçların ortalamaları, % BSS ve/veya % BH değerleriyle birlikte verilir.

Kör matriks ortamına analizi yapılan maddenin ilavesi: Analiz ortamındaki matriksin numuneyi etkilediği durumda tercih edilen bir tekniktir. Matriks içermeyen ortama farklı derişimlerde analit ilavesi ile analiz gerçekleştirilir. Her basamakta en az 3'er kez ölçüm yapılmalıdır. Elde edilen sonuçlar % geri kazanım olarak, % BSS ve/veya % BH değerleri ile birlikte raporlandırılır.

1.7.2. Kesinlik

Geliştirilen bir analitik yöntemin çalışma koşullarındaki tekrarlanabilirliğinin bir ölçüsüdür. Diğer bir ifadeyle, analitin tayini için uygulanan yöntem sonucu elde edilen sonuçların birbirine yakınlığının ölçüsüdür ve % BSS olarak ifade edilir. Kesinlik, 3 temel bölümde incelenir (Ozkan, 2012).

- ✓ Tekrarlanabilirlik

- ✓ Orta kesinlik
- ✓ Tekrar elde edilebilirlik

Tekrarlanabilirlik: Kısa zaman zarfında aynı koşullar altında aynı numunenin kullanılması sonucu elde edilen kesinliği ifade eder. En az 10 adet ölçüm yapılarak %BSS değerinin raporlanması önerilir. Bu değer, eser miktar analizlerinde, safsızlık tayininde ve biyolojik matriks içerisindeki analizlerde maksimum %5 olmalıdır.

Orta kesinlik: Laboratuvar içinde gerçekleştirilen deneylerdeki farklılıklar sonucu ortaya çıkan bir kesinlik derecesidir. Bu ifade çalışmalar arası, deneyler arası veya günler arası kesinliği gösteren bir ifade olarak da tanımlanır. Orta kesinlik, analiz edilecek maddeye ait çözeltinin farklı günlerde ve/veya farklı analizciler tarafından ve/veya farklı cihazlarla en az 3'er ölçüm gerçekleştirilerek %BSS değeriyle birlikte sonuçlandırılır. Biyolojik numunelerle çalışıldığında %BSS değerinin %10-15 aralığına kadar çıktığı gözlemlenmiştir.

Tekrar elde edilebilirlik: Laboratuvarlar arası gerçekleştirilen aynı deneylerin sonucunda elde edilen deneysel farklılıkları gösteren bir kesinlik ifadesidir. Geliştirilen bir yöntemin farklı laboratuvarlarda uygulanması isteniyorsa tekrar elde edilebilirlik ifadesinin hesaplanması ve raporlanma esnasından belirtilmesi gerekmektedir. Bu ifadenin belirlenmesinde, analizi yapılacak maddenin çözeltisi ayrı laboratuvarlarda, farklı zamanlarda ve farklı analizciler tarafından analiz edilmesi gerekir. En az 3'er ölçüm gerçekleştirilerek %BSS değeriyle ifade edilir. Biyolojik numunelerle çalışıldığında %BSS değerinin %10-15 aralığına kadar çıktığı gözlemlenmiştir.

1.7.3. Seçicilik

Seçicilik, bir numune içerisindeki analiz edilecek maddenin girişim yapabilecek diğer bileşenler (yardımcı maddeler, safsızlıklar, bozunma ürünleri veya ortamdaki maddeler) varlığında kalitatif ve kantitatif olarak analiz edilebilme kabiliyeti olarak tanımlanır. Diğer bir ifadeyle seçicilik, geliştirilen analitik bir yöntemde analitin optimal şartlar altında interferans yapan türlerden bağımsız olduğunu gösterir. Eğer geliştirilen bir yöntem yeterli düzeyde seçici değilse, o yöntemin doğruluğu ve kesinliği gibi temel validasyon parametrelerin güvenilirliği hakkında da şüphe uyandırır.

Seçicilik ifadesinin belirtilmesinde, yöntemin doğruluk ve kesinlik değerlerinden yararlanılır. Referans bir yöntem ile karşılaştırma yapıldığında Student t ve F testleri uygulanarak da yöntemin seçiliği hakkında bilgi edinilebilir. Eğer ortam matrisinin bileşimi bilinmiyorsa veya kompleks bir matris içeren numune ortamından analiz yapılıyorsa, genellikle standart ekleme yöntemi kullanılarak analiz gerçekleştirilir. Böylelikle, muhtemel interferans yapabilecek türler elimine edilmiş olur (Ozkan, 2012).

1.7.4. Doğrusallık

Doğrusallık, bir numunedeki analit miktarının veya derişiminin bir fonksiyonu olarak elde edilen sinyalin doğru orantılı olarak artma kapasitesini gösteren önemli bir validasyon parametresidir. Bu kapasite, analit miktarına veya derişimine karşı elde edilen sinyalin oluşturduğu grafikte incelenir ve bu grafikte gözlenen eğim (m), kesişim (n) ve korelasyon katsayısı (r) gibi parametrelerle doğrusallık gösterilir. Eğer $r=0.999$ ve üzerinde ise yöntemin doğrusallığı hakkında söz edilebilir (Ozkan, 2012).

Bir analitik yöntemin doğrusallığını belirlemek için aşağıdaki işlemler yapılmalıdır;

- Saf analit kullanılarak gerçekleştirilmelidir.

- En az 5 farklı analit derişimi ölçülmelidir.
- Doğrusallık aralığının belirlenmesinde, hedeflenen seviyenin %50 daha düşük bir derişiminden başlanmalı ve üst sınır noktasında ise %150 daha yüksek bir derişim seçilmelidir.
- Her bir derişim seviyesinde en az 3 kez ölçüm alınmalıdır.

1.7.5. Duyarlılık

Duyarlılık, analit miktarının veya derişiminin değişimine karşı sinyaldeki değişimin oranına karşılık gelen terimdir. Duyarlılık, kalibrasyon doğrusunun eğimi olarak ifade edilebilir. Elde edilen bu eğim, ne kadar büyükse yöntemin duyarlılığı da o derece iyidir (Ozkan, 2012).

1.7.6. Çalışma Aralığı

Yeteri kadar doğruluğa ve doğrusallığa sahip bir analitik yöntemin, en düşük ve en yüksek analit derişim değerleri arasındaki aralığına o yöntemin çalışma aralığı denilmektedir. Çalışma aralığı, geliştirilen analitik yöntemle bağlı olarak değişmekte olup yöntemin doğrusallığının belirlenmesi ardından belirlenir (Ozkan, 2012).

1.7.7. Teşhis ve tayin alt sınırı

Teşhis sınırı (TS, LOD), Bir numunedeki analitin teşhis edilebildiğı ancak kabul edilebilir bir belirsizlikle miktar tayinin yapılamadığı en düşük derişim olarak ifade edilir. Tayin alt sınırı (TAS, LOQ) ise, kabul edilebilir bir seviyede doğru olarak miktarının tayin edilebildiğı en küçük analit derişimidir. TAS değeri, doğrusallık sınırları içerisinde değildir ve kalibrasyon eğrisinin en alt derişimini oluşturur. TS ve TAS değerlerinin saptanması noktasında iki temel yöntem mevcuttur (Ozkan, 2012).

1. Sinyal/gürültü oranı yöntemi: Bu yöntemde, bilinen en küçük derişime sahip analit çözeltilisinden elde sinyaller ile kör (blank) olarak adlandırılan çözeltilisinden elde edilen sinyaller karşılaştırılır. Sinyal/gürültü oranının 3 olduğu derişim TS, 10 olduğu derişim ise TAS olarak kabul edilir.
2. Hesaplama yöntemi: Bu yöntemde ise, bilinen en küçük analit çözeltilisinden elde edilen sinyallerin standart sapmasının, ilgili kalibrasyon doğrusunun eğimiyle ilişkisini temel alan matematiksel bir eşitlik kullanılmaktadır. TS ve TAS değerlerinin hesaplanmasında aşağıda gösterilen eşitlikleri kullanılır.

$$TS = \frac{3 \times SS}{m} \text{ ve } TAS = \frac{10 \times SS}{m}$$

Eşitlikte S standart sapması, m ise kalibrasyon doğrusunun eğimini ifade eder.

1.7.8. Sağlamlık

Geliştirilen bir analitik yöntemin, ortam şartlarının veya çeşitli analiz parametrelerinin ufak değişiminden etkilenmeden kalma kapasitesini gösteren temel bir validasyon parametresidir. Sağlamlık, yöntemin güvenilirliğinin de bir göstergesidir. Ortamın pH'sı, organik çözücünün miktarı, sıcaklık ve kullanılan cihaz parametreleri yöntemin sağlamlığına etki edebilecek parametreler olarak karşımıza çıkmaktadır (Ozkan, 2012).

1.7.9. Tutarlılık

Tutarlılık, geliştirilen bir yöntemin gerçek pratik koşullardaki tekrar edilebilirliğini gösteren bir parametredir. Tekrarlanabilirlik ve tekrar elde edilebilirlik parametreleri ile doğrudan ilgilidir. Bu parametrenin belirlenmesindeki çeşitli değişkenler aşağıda gösterilmiştir.

1. Aynı laboratuvar da farklı analizciler
2. Aynı laboratuvar da farklı cihazlar
3. Kullanılan kimyasalların markalarının değişmesi
4. Farklı laboratuvar da aynı analizciler
5. Farklı laboratuvar da aynı marka ve model cihazlar

gibi parametreler denenerek yöntemin tutarlılığı hakkında bilgi edinilir. Elde edilen sonuçların %BSS değeri temel alınarak değerlendirme yapılır (Ozkan, 2012).

1.7.10. Stabilite

Stabilite genellikle çalışılan analitlerin farklı deneysel koşullardaki kararlılığını gösteren bir parametredir. Bu validasyon parametresi, deney sonucunda bozunma ürünün meydana gelip gelmediği hakkında da bilgi verir. Dört farklı yöntem kullanılarak stabilite çalışmaları gerçekleştirilmektedir (Ozkan, 2012).

1. Kısa süreli stabilite: Farklı derişimlere sahip örnekler oda sıcaklığında çözülerek hazırlanır ve 4-24 saat aralığında oda sıcaklığında bekletilir. İşlem sonucunda analiz edilerek elde edilen sonuç, taze hazırlanmış örnek sonucu ile kıyaslanır.
2. Uzun süreli stabilite: Farmasötik etken maddenin uzun süre zarfında ne kadar süre kararlı halde kaldığı ile bilgi verir. Hazırlanan çözelti, 3, 6 ve 12 aylık periyotlarda aynı koşullar altında analiz edilir ve elde edilen sonuçlar, taze hazırlanmış örnek sonucu ile kıyaslanır.

3. Dondurma-çözme stabilitesi: Bu yöntemde, üç farklı derişimde hazırlanan çözeltiler istenilen sıcaklıkta 24 saat süre ile dondurulurlar. Devamında, bu çözeltilerin oda sıcaklığında kendiliğinden çözülmesi beklenir. Bu prosedür, iki kez daha tekrarlandıktan sonra analiz işlemine geçilir. Elde edilen sonuç, taze hazırlanmış örnek sonucu ile kıyaslanır.
4. Zorlanmış bozunma çalışmaları: Bu yöntemde, analizi yapılacak numune üzerine uygulanan çeşitli şartların etkisi incelenir. Bu şartlar aşağıdaki çizelge de belirtilmiştir.
 - Sıcaklık: Analiz ortamının sıcaklığı artırılır ve her 10 °C’lik sıcaklık değişimin analit üzerindeki etkisi incelenir.
 - Nem : % 75 ve daha yüksek oranda neme sahip ortamda analit belirli süre boyunca bekletilir ve analit üzerindeki etkisi incelenir.
 - Işık: Analit, UV ve floresan ışık altında belirli süre maruz bırakıldıktan sonra fotoliz olayının gerçekleşip gerçekleşmediği incelenir.
 - Asidik ortamda hidroliz: Analit, 0.1 M HCl ve 1M HCl ortamında belirli bir süre bekletildikten sonra analizi gerçekleştirilir. İşlem sonucunda, bozunma ürünlerinin oluşup oluşmadığı incelenir.
 - Bazik ortamda hidroliz: Analit, 0.1 M NaOH ve 1 M NaOH ortamında belirli bir süre bekletildikten sonra analizi gerçekleştirilir. İşlem sonucunda, bozunma ürünlerinin oluşup oluşmadığı incelenir.
 - Yükseltgenme: Analit, %3 ve %30 oranında H₂O₂ ortamında belirli bir süre bekletilmesinin ardından analizi gerçekleştirilir. İşlem sonucunda, analitin oksidasyona uğrayıp uğramadığı incelenir.

1.8. Tez maddeleri ile yapılmış literatürdeki çalışmalar

Bu araştırmada üzerinde çalışılması planlanan ilaç etken maddeleri (1S,2S)-PSDO, ESOM ve ESCIT enantiyomerleri için günümüze kadar yapılmış farklı analitik çalışmalardan bazıları aşağıda özetlenmiştir.

1.8.1. Psödoefedrin enantiyomerleri için mevcut analiz yöntemleri

Çizelge 1.1. (1S,2S)-PSDO için geliştirilen analitik yöntemler

Yöntem	Çalışma aralığı	Teşhis sınırı	Kaynak
Yüzeyi güçlendirilmiş Raman spektroskopisi	10^{-6} to 10^{-12} M	10^{-12} M	(Guselnikova ve ark., 2021)
Floresan algılamalı yüksek performanslı sıvı kromatografisi	-	100 pg	(Shao ve ark., 2006)
İnce tabaka kromatografisi	-	-	(Suedee ve ark., 1999)

1.8.2. Omeprazol enantiyomerleri için mevcut analiz yöntemleri

Çizelge 1.2. ESOM için geliştirilen analitik yöntemler

Yöntem	Çalışma aralığı	Teşhis sınırı	Kaynak
Türev Spektrofotometrik Yöntem	3-15 μ g ml ⁻¹	0.0454 μ g ml ⁻¹	(Solanki ve ark., 2011)
Ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi	-	10 ng/mL	(Shetty ve ark., 2005)
Yüksek performanslı ince tabaka kromatografik yöntem	1200-2800 μ g/mL	0.063 μ g/mL	(Roosewelt ve ark., 2007)
Ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi	5-25 μ g/ml	0.100 μ g/ml	(Jain ve ark., 2019)
Kapiler elektroforez	2-20 μ g /mL	0. 8 μ g/mL	(Chen ve ark., 2014)
Yüksek performanslı sıvı kromatografisi	40 – 120 μ g/mL	0.207 μ g/mL	(Rao, Krishna ve ark., 2016)
Kare dalga voltametrisi	3.0 to 500 μ g mL ⁻¹	1.4 μ g mL ⁻¹	(Ivić ve ark., 2019)
Diferansiyel puls voltametrisi	1.0×10^{-6} - 1.0×10^{-4} M	3.5×10^{-8} M	(Radi ve Abd-Elkader, 2015)
Diferansiyel puls adsorptif sıyırma voltametrisi	1.0×10^{-8} to 1.0×10^{-5} M	3.0×10^{-9} M	(Radi ve ark., 2016)

1.8.3. Sitalopram enantiyomerleri için mevcut analiz yöntemleri

Çizelge 1.3. ESCIT için geliştirilen analitik yöntemler

Yöntem	Çalışma aralığı	Teşhis sınırı	Kaynak
Ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi	5-25 µg/mL	1.030 µg/mL	(Kakde ve ark., 2013)
Ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi	0-45µg/mL	0.1 mg/mL	(Vadrevu ve Govindarao, 2018)
Kolorimetrik	2-10 µg/ml	0.003450326 µg/ml	(Vetrichelvan ve ark., 2010)
Kare dalga voltametrisi	150 µg/mL to 400 µg/mL	53.67 µg/mL	(Jain ve ark., 2013)
Diferansiyel puls voltametrisi	1.0×10^{-6} to 7.0×10^{-5} mol L ⁻¹	2.0×10^{-7} mol L ⁻¹	(Attia ve ark., 2017)

Bu tezin amacı kiral bileşik enantiyomerlerinin analizi için moleküler baskılama tabanlı elektrokimyasal kiral sensör geliştirmektir. Bu tez araştırması ile öngörülen çalışmada seçilen ilaç etken maddeleri (1S,2S)-PSDO, ESOM ve ESCIT tayini için seçici, hassas, duyarlı, hızlı ve tamamen valide edilmiş elektrokimyasal analiz yöntemlerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu maddelerle moleküler baskılama temelli elektrokimyasal kiral sensör geliştirebilmek literatüre önemli bir katkı sağlayacaktır. Hem moleküler baskılama tekniği hem de elektrokimyasal yöntemler sayesinde daha az madde kullanarak, daha seçici ve hassas ve daha çevreci sensörlerle analizler gerçekleştirilecektir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler

Tez çalışmasında kullanılan tüm kimyasal maddeler analitik saflıkta olup herhangi bir ön saflaştırma işlemi uygulanmadan kullanılmıştır ve Çizelge 2.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal madde	Formül	Marka
1S,2S-(+)-psödoefedrin	C ₁₀ H ₁₅ NO	Sigma-Aldrich
1R,2R-(-)-psödoefedrin	C ₁₀ H ₁₅ NO	Sigma-Aldrich
(S)-(-)- omeprazol	C ₁₇ H ₁₉ N ₃ O ₃ S	Sigma-Aldrich
(R)-(+)- omeprazol	C ₁₇ H ₁₉ N ₃ O ₃ S	Sigma-Aldrich
S-sitalopram	C ₂₀ H ₂₂ BrFN ₂ O	Sigma-Aldrich
R-sitalopram	C ₂₀ H ₂₂ BrFN ₂ O	Sigma-Aldrich
(S)-Lansoprazol	C ₁₆ H ₁₃ F ₃ N ₃ NaO ₂ S	Cayman Chemical
(R)-Lansoprazol	C ₁₆ H ₁₃ F ₃ N ₃ NaO ₂ S	Cayman Chemical
Ortofenilendiamin	C ₆ H ₈ N ₂	Sigma-Aldrich
Asetonitril	CH ₃ CN	Merck
Etanol	C ₂ H ₅ OH	Merck
Metanol	CH ₃ OH	Merck
Asetik asit	CH ₃ COOH	Merck
Fosfat tampon tablet	1 tablet/200 mL	Sigma-Aldrich
Soydum hidroksit	NaOH	Merck
Hidroklorik asit	HCl	Merck
Potasyum nitrat	KNO ₃	Merck
Potasyum ferrisiyanür	K ₃ [Fe(CN) ₆]	Acros Organics
β-siklodekstrin	C ₄₂ H ₇₀ O ₃₅	Sigma-Aldrich
Askorbik asit	C ₆ H ₈ O ₆	Sigma-Aldrich
Ticari serum	-	Sigma-Aldrich

Çizelge 2.1. Devam Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal madde	Formül	Marka
Ürik asit	$C_5H_4N_4O_3$	Sigma-Aldrich
Dopamin	$C_8H_{11}NO_2$	Alfa-Aesar
Parasetamol	$CH_3CONHC_6H_4OH$	Sigma-Aldrich

2.2. Tez çalışmasında kullanılan ekipmanlar

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve diğer ekipmanlar Çizelge 2.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Deneysel çalışmalarda kullanılan cihaz ve diğer ekipmanlar

Cihaz	Marka – Model
X-ışınları kırınım spektrometre	Panalytical Empyrean
X-ışınları fotoelektron spektrometre	PHI500 VersaProbe
Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometre	Shimadzu IR-Affinity 1
Geçirimli elektron mikroskobu	JEOL JEM 2100F
Hassas terazi	Radwag AS 220 R.2
pH metre	Hanna Instruments
Vakum etüv	Nüve EV 018
Ultrasonik banyo	Bandelin sonorex
Isıticılı manyetik karıştırıcı	Thermo-Shaker (Biosan TS-100, Riga, Latvia)
Ultra-saf su cihazı	Millipore, Milli-Q
Otomatik pipet	Thermo Fisher Scientific Finnnpipette
Santrifüj cihazı	Thermo Electron Corp. MicroCL 17R
Santrifüj cihazı	Nüve NF-200
Vorteks	Velp Scientifica

2.3. Tez çalışmasında kullanılan elektrokimyasal sistem ve bileşenleri

Tez çalışması kapsamında kullanılan elektrokimyasal sistem ve bileşenleri Çizelge 2.3.'te gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. Tez çalışması kapsamında kullanılan elektrokimyasal sistem ve bileşenleri

Bileşen	Marka-Model
Potansiyostat – Galvanostat sistemi	Metrohm Autolab PGSTAT 128N
Elektrot hücre standı	BASi® - C3
Çalışma elektrodu (CKE, 3 mm çap)	BASi® - MF 2012
Karşılaştırma elektrodu (Ag/AgCl)	BASi® - MF 2052
Yardımcı elektrot (Pt tel, 7,5 cm)	BASi® - MW 1032
Parlatma – cilalama seti	BASi® - MF 2060
Cam hücre	BASi® - MR 1208

2.4. Tez çalışmasında kullanılan çözeltilerin hazırlanması

2.4.1. Destek elektrolitlerin hazırlanması

Elektrokimyasal analizlerde destek elektrolit olarak, farklı pH'lara sahip tampon çözeltiler kullanılmıştır. Çözeltilerin pH'ları 1.0 M NaOH veya 1.0 M HCl kullanılarak istenilen pH'ya ayarlanmıştır. 1 adet fosfat tablet 200 mL (0.010 M) ultra saf suda çözölmüştür. 1.0 M NaOH veya 1.0 M HCl kullanılarak fosfat tamponunun pH'sı 7.4'e ayarlanmıştır.

2.4.2. Potasyum ferrisiyanür çözeltisinin hazırlanması

Tez projesi kapsamında hazırladığımız modifiye elektrotların elektrokimyasal aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla, 0.1 M KCl içerisinde çözülmüş 5×10^{-3} M potasyum ferrisiyanür çözeltisi hazırlanmıştır.

2.4.3. İlaç etken maddelerinin standart çözeltilerinin hazırlanması

(1S,2S)-PSDO ve (1R,2R)-PSDO'nun standartlarından uygun miktarlar tartılarak, 10^{-2} M'lık standart stok çözeltileri ultra saf su içerisinde hazırlanmıştır. ESOM ve R-OM'un standartlarından uygun miktarlar tartılarak, 10^{-2} M'lık standart stok çözeltileri ultra saf su içerisinde hazırlanmıştır. ESCIT ve R-CIT'in standartlarından uygun miktarlar tartılarak, 10^{-2} M'lık standart stok çözeltileri metanol içerisinde hazırlanmıştır. Hazırlanan standart çözeltiler $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır. Kullanılmadan önce buzdolabından çıkartılıp ortam sıcaklığına gelmesi beklenmiştir.

2.4.4. Tablet çözeltilerinin hazırlanması

Tabletlerin tespiti için, her biri 60 mg (1S,2S)-PSDO içeren DELODAY PLUS ilacından on tabletin ortalama ağırlığı ölçüldü; daha sonra havanda toz haline getirilerek homojenize edilmiştir. 1.0 mM stok solüsyon 30 dakikada sonikasyon ile ultra saf su içinde hazırlandı ve süzüldü. Bu filtrelenmiş çözeltilerden belirli bir kısım alındı ve fosfat tamponu (pH 7.4) içerisinde seyreltilti. Tabletlerdeki (1S,2S)-PSDO miktarını incelemek için bilinen tablet derişimlerine bilinen miktarda saf (1S,2S)-PSDO ilave edilerek geri kazanım çalışmaları yapılmış ve DPV yöntemi ile incelenmiştir.

Tabletlerin tespiti için, her biri 40 mg ESOM içeren ESOM ilacından on tabletin ortalama ağırlığı ölçüldü; daha sonra havanda toz haline getirilerek homojenize edilmiştir. 1.0 mM stok solüsyon 30 dakikada sonikasyon ile ultra saf su içerisinde

hazırlandı ve süzöldü. Bu filtrelenmiş çözeltilerden belirli bir kısım alındı ve fosfat tamponu (pH 7.4) içerisinde seyreltildi. Tabletlerdeki ESOM miktarını incelemek için, bilinen tablet derişimlerine bilinen miktarda saf ESOM eklenerek geri kazanım çalışmaları yapılmış ve DPV yöntemi ile incelenmiştir.

Tabletlerin tespiti için, her biri 10 mg ESCIT içeren CIPRALEX ilacından on tabletin ortalama ağırlığı ölçöldü; daha sonra havanda toz haline getirilerek homojenize edilmiştir. 1.0 mM stok solösyon 30 dakikada sonikasyon ile ultra saf su içerisinde hazırlandı ve süzöldü. Bu filtrelenmiş çözeltilerden belirli bir kısım alındı ve fosfat tamponu (pH 7.4) içerisinde seyreltildi. Tabletlerdeki ESCIT miktarını incelemek için, bilinen tablet derişimlerine bilinen miktarda saf ESCIT eklenerek geri kazanım çalışmaları yapılmış ve DPV yöntemi ile incelenmiştir.

2.4.5. Serum çözeltilerinin hazırlanması

Sigma Aldrich firmasından ticari serum çözeltileri alındığı şekilde doğrudan kullanılmıştır. Serum numunelerine geri kazanıma uygun derişimde etken madde ilave edilmiş ve doğrudan son derişimin geri kazanımına, standart kalibrasyon denkleminde akım değeri yerine koyarak, derişime geçilerek % geri kazanım hesaplanmıştır.

2.4.6. Girişim çalışmalarında kullanılan çözeltilerin hazırlanması

Kanda bulunan bazı biyolojik moleköllerin ve iyonların, hazırladığımız moleküler baskılama temelli elektrokimyasal kiral sensörlerin voltametrik sinyaline etkisinin araştırılması amacıyla 0.01 M askorbik asit (AA), dopamin (DOP), ürik asit (UA), KNO₃, Na₂SO₄ ve MgCl₂ stok çözeltileri ultra saf su içerisinde çözülecek hazırlanmıştır.

2.4.7. Tez çalışmasında kullanılan diğer çözeltilerin hazırlanması

10 mM ortofenilendiamin (o-PD) stok çözeltisi, fosfat tamponu (0.010 M, pH 7.4) içerisinde hazırlanmıştır. 10mM stok β -siklodekstrin (β -CD) çözeltisi ultra saf su içerisinde hazırlanmıştır. 5 mM stok setiltrimetilamonyum bromür çözeltisi ultra saf su içerisinde hazırlanmıştır. Tetraetil ortosilikat kullanılmadan önce 1:1 oranında etanol ile seyreltilmiştir. 500 mg selüloz tris-3,5-dimetilfenil-karbamat (C1) 5mL tetrahidrofuran (THF) içerisinde 2 saat ultrasonik banyoda karıştırılarak hazırlandı.

2.5. Tez çalışmasında kullanılan voltametrik yöntemler

2.5.1. (1S,2S)-PSDO analizinde kullanılan voltametrik yöntemler

2.5.1.1. Dönüşümlü voltametri

Bu çalışmada camsı karbon elektrot (CKE) üzerinde oPD elektropolimerizasyonu dönüşümlü voltametri (DV) yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elektropolimerizasyon işlemi MIP ve baskısız (NIP) elektrotların hazırlanmasında ile -0.2 ve 0.8V arasında 50mV/s'lik bir tarama hızında 10 döngü alınması şeklinde uygulanmıştır. MIP ve NIP elektrotların hazırlanma yöntemleri hep aynı olmakta, elektrotlar hazırlanırken içerdiği hedef molekül (baskılanan molekül) değiştirilmektedir. NIP ve MIP elektrotlar günlük olarak hazırlanmıştır.

2.5.1.2. Diferansiyel puls voltametri

(1S,2S)-PSDO'nun elektrokimyasal ölçümleri, DPV yöntemi kullanılarak 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (1:1) ve 100 mM KCl içeren bir solüsyonda gerçekleştirilmiştir.

2.5.2. ESOM'un analizinde kullanılan voltametrik yöntemler

ESOM'un elektrokimyasal ölçümleri, 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (1:1) ve 100 mM KCl içeren bir solüsyonda DPV yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.5.3. ESCIT'in analizinde kullanılan voltametrik yöntemler

ESCIT'in elektrokimyasal ölçümleri, 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (1:1) ve 100 mM KCl içeren bir solüsyonda DPV yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.6. Tez çalışmasında kullanılan moleküler baskılama temelli elektrokimyasal kiral sensörlerin hazırlanması

2.6.1. (1S,2S)-PSDO için moleküler baskılama temelli elektrokimyasal kiral sensörlerin hazırlanması

İlk olarak, CKE etanol ve su karışımı içinde 15 dakika boyunca ultrasonik banyoda karıştırılmaya tabi tutulmuştur. Daha sonra, CKE'nin yüzeyi 1.0 mikron alümina süspansiyonu içinde parlatılıp, saf su ile temizlenmiştir. Havada kurutulduktan sonra MIP ve NIP elektrot cevaplarını incelemek için kullanılmıştır. MIP sensörünün oluşturulması için, fosfat tamponu (0.01 M, pH 7.4) içerisinde 1.0 mM o-PD çözeltisi ve 1.0 mM (1S,2S)-PSDO çözeltisi birleştirilmiştir. Elektropolimerizasyon DV yöntemi ile -0.2 ve 0.8V arasında 50 mV/s'lik bir tarama hızında 10 döngü sayısı ile uygulanmıştır. (1S,2S)-PSDO'nun CKE yüzeyinde fonksiyonel monomer o-PD ile elektropolimerizasyonundan sonra (1S,2S)-PSDO@MIP/CKE elektrokimyasal kiral sensörü ultra saf su ile yıkanmıştır.

NIP/CKE, elektropolimerizasyon adımı yoluyla (1S,2S)-PSDO olmadan yukarıda belirtilen prosedüre göre hazırlanmıştır. (1S,2S)-PSDO@MIP/CKE sensörünün analitik performansını kontrol etmek için NIP/CKE sensörü kullanılmıştır.

Elektrokimyasal ölçümler, DPV yöntemi kullanılarak 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (1:1) ve 0.1 M KCl içeren bir solüsyonda gerçekleştirilmiştir.

2.6.2. ESOM moleküler baskılı temelli elektrokimyasal kiral sensörlerin hazırlanması

İlk olarak, CKE 15 dakika boyunca etanol ve saf su (1:1, v/v) karışımı içinde ultrasona tabi tutulmuştur. Daha sonra, CKE'nin yüzeyi 1.0 mikron alümina süspansiyonu içinde parlatıldı, saf su ile temizlenmiştir. Havada kurutulduktan sonra MIP ve NIP elektrotlarını incelemek için kullanılmıştır. Moleküler baskılanmış gözenekli polimerik film aşağıdaki gibi sentezlenmiştir: ön-polimerizasyon ESOM: β -CD (1:1 mol, 0.04 mL) kompleksi, setiltrimetilamonyum bromür (CTAB) (0.045 mmol, 0.02 mL) ve NH_4OH (0.02 mL) içeren bir çözelti 15 dakika oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Bu çözeltiye tetraetil ortosilikat: etanol (TEOS: ETOH) (0.45 mmol, 0.02 mL) (1:1) ilave edildi ve bu çözeltiden 3.0 μL 'lik bir kısım CKE yüzeyine damlatılmıştır. Etüvde (50 °C) 30 dakika polimerizasyon yapılmıştır. Polimerizasyondan sonra ESOM/ β -CD/TEOS/CTAB@MIP/CKE elektrokimyasal kiral sensörü ultra saf su ile durulanarak polimerik yapıda hazırlanan gözenekler açığa çıkarılmıştır.

Kontrol için, baskılama performansını değerlendirmek için ESOM'un olmadan aynı koşullar altında baskılanmamış bir sensör (NIP/CKE) sentezlenmiştir. Geliştirilen ESOM/ β -CD/TEOS/CTAB@MIP/CKE elektrokimyasal kiral sensörün analitik performansını kontrol etmek için NIP/CKE sensörü kullanılmıştır.

Elektrokimyasal ölçümler, DPV yöntemi kullanılarak 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (1:1) ve 0.1 M KCl içeren bir solüsyonda gerçekleştirilmiştir.

2.6.3. ESCIT moleküler baskılama temelli elektrokimyasal kiral sensörlerin hazırlanması

İlk olarak, CKE 15 dakika boyunca etanol ve saf su (1:1, v/v) karışımı içinde ultrasona tabi tutulmuştur. Daha sonra, CKE'nin yüzeyi 1.0 mikron alümina süspansiyonu içinde parlatıldı, saf su ile temizlenmiştir. Havada kurutulduktan sonra MIP ve NIP elektrotlarını incelemek için kullanılmıştır. Moleküler baskılanmış polimerik film aşağıdaki gibi sentezlenmiştir: ESCIT:C1 (1:1 v/v) kompleksi, % 0.5 EPI (10 μL) içeren bir çözelti 1 dakika oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Bu çözeltiden 1.0 μL 'lik bir kısım CKE yüzeyine damlatılmıştır. Etüvde (50 °C) 10 dakika polimerizasyon yapılmıştır. Polimerizasyondan sonra ESCIT/C1/EPI@MIP/CKE elektrokimyasal kiral sensörü ultra saf su ile durulanmıştır.

Kontrol için, baskılama performansını değerlendirmek için ESCIT olmadan aynı koşullar altında baskılanmamış bir sensör (NIP/CKE) sentezlenmiştir. Geliştirilen ESCIT/C1/EPI@MIP/CKE elektrokimyasal kiral sensörün analitik performansı NIP/CKE sensörü kullanılarak kontrol edilmiştir.

Elektrokimyasal ölçümler, 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (1:1) ve 0.1 M KCl içeren bir solüsyon içinde bir NIP ve MIP üzerinde DPV yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

2.6.4. Moleküler baskılanmış elektrokimyasal sensör yüzeylerin karakterizasyonu

Tez çalışması kapsamında geliştirilen MIP temelli elektrokimyasal kiral sensörlerin karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Geliştirilen sensörler için çeşitli

elektrokimyasal, spektroskopik ve mikroskopik tekniklerle karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.



3. BULGULAR

3.1. (1S,2S)-PSDO etken maddesine ait bulgular

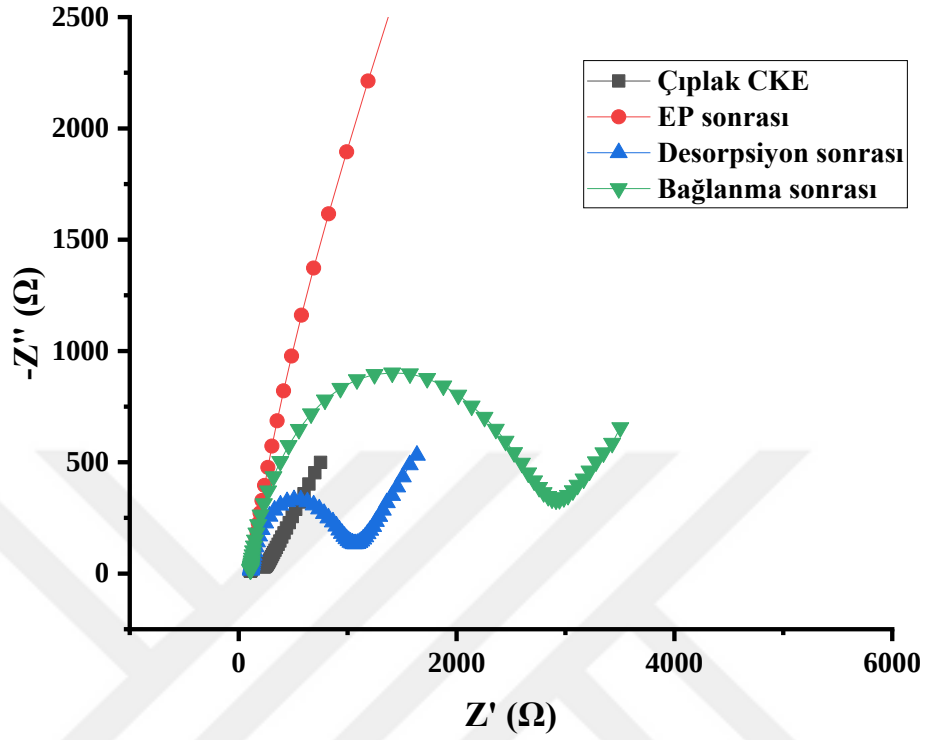
3.1.1. (1S,2S)-PSDO karakterizasyonu

3.1.1.1. Elektrokimyasal karakterizasyon

(1S,2S)-PSDO@MIP/CKE elektrokimyasal kiral sensörünün elektrokimyasal karakterizasyonu, elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) ve DV yöntemleri kullanılarak elektropolimerizasyondan önce, elektropolimerizasyondan sonra, desorpsiyon işleminden sonra ve (1S,2S)-PSDO'nin bağlanmasından sonra sonuçları karşılaştırmak için uygulanmıştır.

EIS, modifiye edilmiş ve edilmemiş elektrot yüzey özelliklerinin etkili bir şekilde karşılaştırılması ve geliştirilen sensörün karakterizasyonu için önemli bir tekniktir. EIS ile çıplak ve polimer baskılı elektrotların her aşamasının karakterizasyonu için $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ kullanılmıştır.

Her adımda dikkate değer impedans spektrum değişiklikleri Şekil 3.1.'deki gibi gözlenmiştir. Nyquist diyagramının daha yüksek frekanslar için yarım dairesi elektron transfer prosedürüne karşılık gelirken, düşük frekansın lineer kısmı difüzyona karşılık gelir. Çıplak CKE için hızlı elektron transfer kinetiği ile difüzyonla sınırlı bir süreç izlenebilir. Elektropolimerizasyondan sonra MIP iletken değildir ve yüzey elektron transferinde son derece dirençlidir. Böylece, maksimum dirençli impedans spektrumları elde edilmiştir. (1S,2S)-PSDO'nin çıkarılmasından sonra, boşlukların oluşması nedeniyle impedans değeri azalır ve daha sonra elektron transfer elektronlarını kolaylaştırdığı için $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ sinyali gözlenebilir. Son olarak, (1S,2S)-PSDO'nin bağlanmasından sonra yarım daire iyileştirilir. Elde edilen bu sonuçlar, polimerik matrisin (1S,2S)-PSDO'e bağlanmak için yeterli kapasiteye sahip olduğu şeklinde yorumlanabilir.

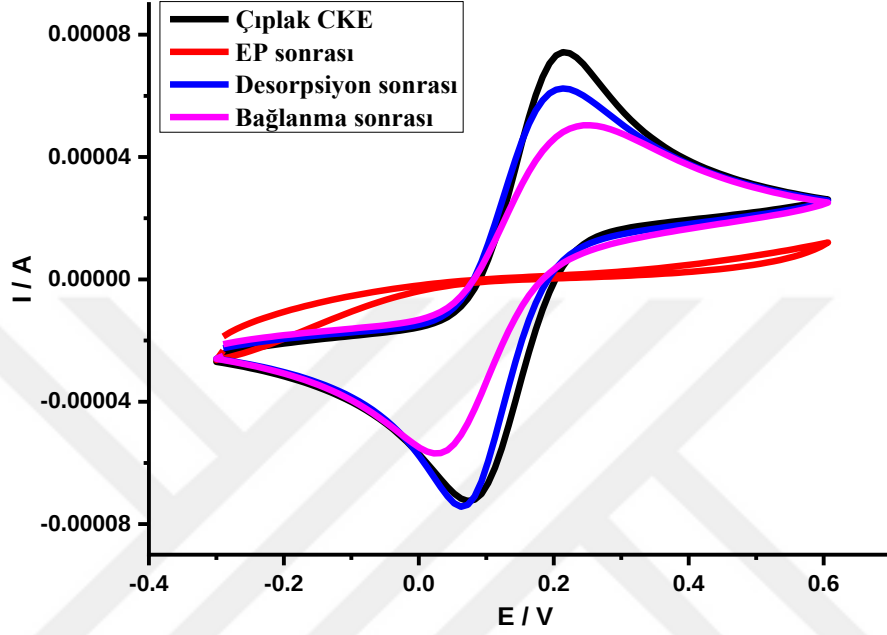


Şekil 3.1. (1S,2S)-PSDO@MIP/CKE elektrokimyasal kiral sensörü oluşturmak için her adımda elde edilen elektrokimyasal impedans spektroskopisi.

DV, sensörlerin elektrokimyasal karakterizasyonu için en temel yöntemdir. Elektropolimerizasyon, desorpsiyon ve bağlanma prosedürlerini değerlendirmek için DV yöntemi uygulanmıştır.

Şekil 3.2.'de görüldüğü gibi, çıplak CKE maksimum tepe akımına sahiptir. Elektropolimerizasyondan sonra, polimer oluşumu tarafından inhibe edilen elektron transferi nedeniyle $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ pik akımı elde edilemez. (1S,2S)-PSDO'in desorpsiyonundan sonra, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ pik akımı tekrar elde edilmiştir. Bu sonuç, bağlanmaya ve artan elektron transferine izin veren boşlukların oluşumunu göstermiştir. Son olarak, (1S,2S)-PSDO'in bağlanmasından sonra, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ için uygun bağlanma boşluklarındaki azalma nedeniyle $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ sinyalinde önemli bir azalma elde edilmiştir. (1S,2S)-PSDO@MIP/CKE sensörünün elektrokimyasal

kiral algılama alanında mükemmel seçicilik ve hassasiyet, olağanüstü tekrarlanabilirlik gibi birçok avantajı vardır.



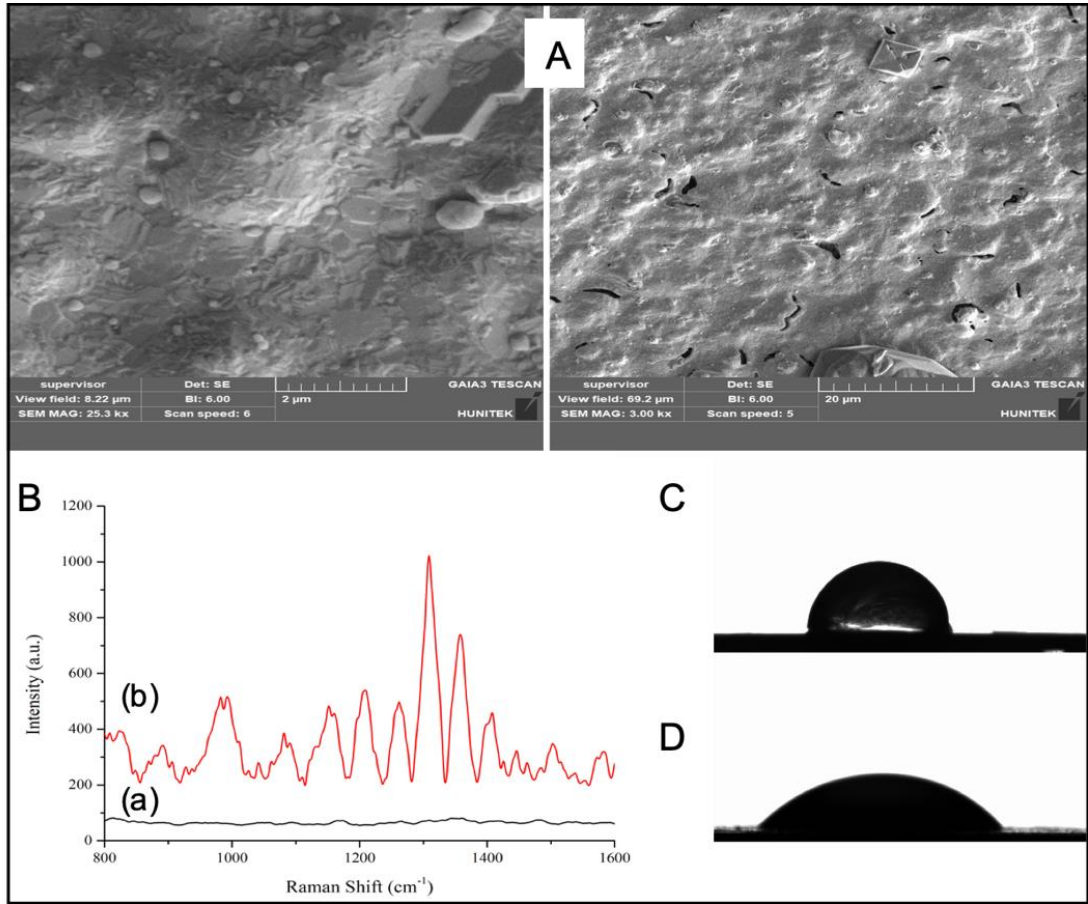
Şekil 3.2. (1S,2S)-PSDO@MIP/CKE elektrokimyasal kiral sensörünün her adımının elde edilen dönüşümlü voltamogramları.

3.1.1.2. Yüzey karakterizasyon

Geliştirilen CKE yüzeylerinin karakterizasyonu, EIS ve DV dışında, Raman spektrometresi, temas açısı ölçümleri ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile de incelenmiştir.

(1S,2S)-PSDO@MIP/CKE'nin yüzey morfolojisi SEM kullanılarak incelenmiştir (Şekil 3.3.A). Şekilde görüldüğü gibi (1S,2S)-PSDO baskılanmış elektrot, CKE yüzeyinde pürüzlü ve gözeneksiz bir yapı oluşmuştur. (1S,2S)-PSDO@MIP/CKE'nin kimyasal yapısını karakterize etmek için Raman spektroskopisi kullanıldı (Şekil 3.3. B). Tipik Raman kayma bantları, sırasıyla yaklaşık 1358 cm^{-1} ve

1584 cm^{-1} civarındaki bantlar benzenoid halkasında bulunan C–N•+ ve C=C gerilme bantlarıdır. Spektrumda görüldüğü gibi, 1502 cm^{-1} 'deki Raman kayması, sensör yüzeyindeki imin bölgeleriyle ilgili C=N gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. C–N•+germe titreşimleri-delokalize polaronik yük taşıyıcıları, güçlü bir Raman bandı olarak 1308 cm^{-1} 'degözlenmektedir. Ayrıca, C–N germe titreşimleri 1261 cm^{-1} civarında net bir şekilde görülmektedir. Çıplak CKE ve (1S,2S)-PSDO@MIP/CKE yüzeyinin temas açısı polimerizasyondan sonra 72.14°'den 35.86°'ye düştü (Şekil 3.3.C, 3.3.D). Temas açısındaki önemli azalma, hidrofilik karakterlerin ve yüzey polaritesinin arttığını göstermiştir.



Şekil 3.3. (1S,2S)-PSDO@MIP/CKE yüzeyinin karakterizasyonu: SEM görüntüsü (A); Raman spektrumları (B); çıplak CKE (C) ve (1S,2S)-PSDO@MIP/CKE (D) temas açıları görüntüleri.

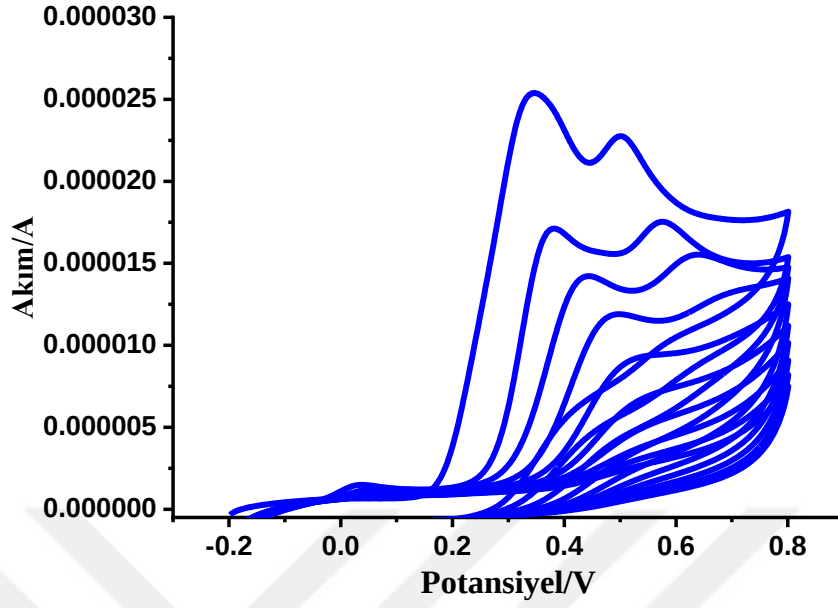
3.1.2. Deneysel koşulların optimizasyonu

3.1.2.1. Monomer/hedef molekül oranının etkisi

Moleküler baskılanmış filmin optimizasyonu ve değerlendirilmesi, MIP tabanlı sensör tasarımının en kritik aşamasıdır. Monomerin hedef moleküle molar oranını optimize ederek, uygun bağlanma boşlukları ve kararlı ve homojen polimer oluşumu sağlanabilir. Bu nedenle monomer/kalıp oranı 0.5:1, 1:1, 2.5:1, 5:1 ve 10:1 olarak incelenmiştir. Farklı oranlarda hazırlanan elektrotların DPV ve DVtepikleri, elektropolimerizasyon öncesi, elektropolimerizasyon sonrası, desorpsiyon sonrası ve bağlama sonrasında kontrol edilmiştir. Sonuç olarak, monomer/hedef molekül molar oranının iyi stabilite, kolay desorpsiyon ve bağlama işlemi sağladığı oran 1:1 olarak bulunmuştur ve optimum oran olarak seçilmiştir.

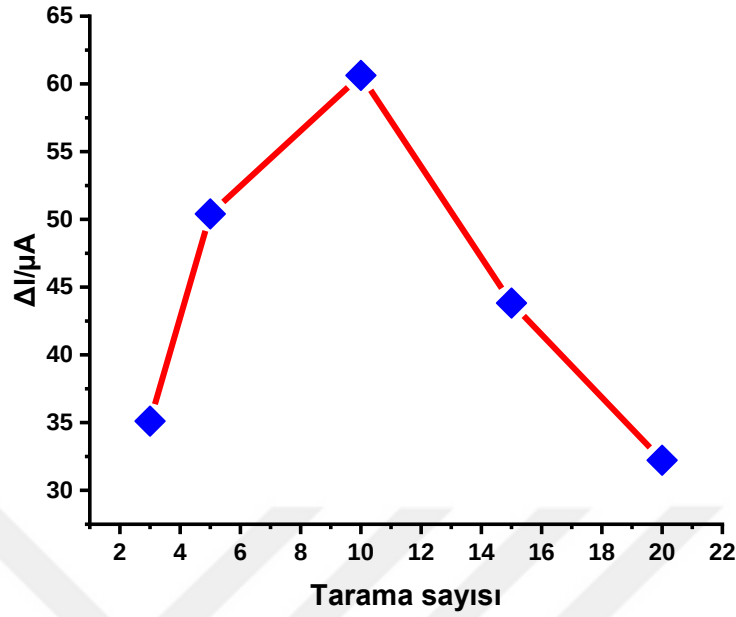
3.1.2.2. o-PD polimerizasyonu için döngü sayısı ve tarama hızının etkisi

o-PD'nin elektropolimerizasyonu için döngü sayısı, hem polimer film kalınlığını hem de geliştirilmiş moleküler baskılanmış sensörün seçicilik, kararlılık ve hassasiyet açısından performansını etkileyen karakteristik bir işlemdir (Şekil 3.4.).



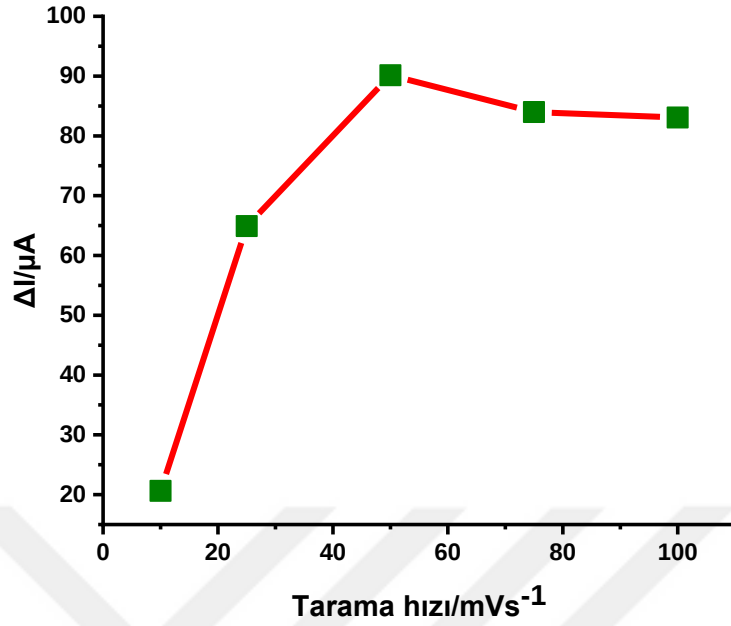
Şekil 3.4. (1S,2S)-PSDO@MIP/CKE elektrokimyasal kiral sensörünün , -0,2 - 0,8 V arasındaki potansiyel aralığında 1mM o-PD ve 1mM (1S,2S)-PSDO içeren PB'de (pH 7,4) ortamında 10 döngü sayısı ile elde edilen dönüşümlü voltamogramları.

Optimum döngü sayısını belirlemek amacıyla daha önce belirlenen koşullar altında çeşitli döngü sayılarında polimerizasyonlar gerçekleştirilmiştir. DV döngü sayısının etkisini karşılaştırmak için; elektropolimerizasyon sırasında 3, 5, 10, 15 ve 20 döngü gerçekleştirilmiştir. Daha doğru bir değerlendirme elde etmek için (1S,2S)-PSDO'nun desorpsiyonundan sonra ve 5×10^{-15} M (1S,2S)-PSDO'nun bağlanmasından sonraki tepe akımları (I_p) ölçümü arasındaki fark (ΔI_p) kontrol edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, elektropolimerizasyon için en uygun döngü sayısı olarak 10 döngü sayısı bulunmuştur (Şekil 3.5.). 10 döngüden daha fazla döngü sayısında elektropolimerizasyon gerçekleştiğinde ise gözlenen pik akımlarının arasındaki farkta azalma meydana gelmiştir.



Şekil 3.5. (1S,2S)-PSDO@MIP/CKE elektrokimyasal kiral sensörünün , -0,2 - 0,8 V arasındaki potansiyel aralığında 1mM o-PD ve 1mM (1S,2S)-PSDO içeren PB'de (pH 7,4) ortamında döngü sayısı etkisi.

Potansiyel tarama hızı belirlenirken -0,2 - 0,8 V potansiyel tarama aralığında, döngü sayısı ise 10'da sabit tutularak 10, 25, 50, 75 ve 100 mV/s potansiyel tarama hızlarında elektropolimerizasyonlar gerçekleştirilmiştir. Daha doğru bir değerlendirme elde etmek için (1S,2S)-PSDO'nun desorpsiyonundan sonra ve 5×10^{-15} M (1S,2S)-PSDO'nun bağlanmasından sonraki tepe akımları (I_p) ölçümü arasındaki fark (ΔI_p) kontrol edildi. Elde edilen sonuçlara göre, elektropolimerizasyon için en uygun olan tarama hızının 50 mV/s olduğuna karar verilmiştir. Ayrıca potansiyel tarama hızının daha da arttırıldığında polimer filmlerin elektropolimerizasyonu gerçekleştiğinde ise gözlenen pik akımlarının arasındaki farkta azalma meydana gelmiştir.

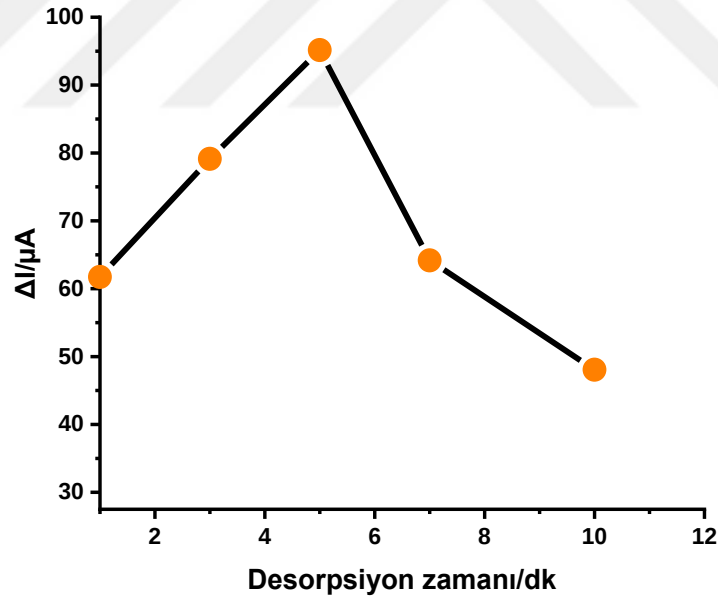
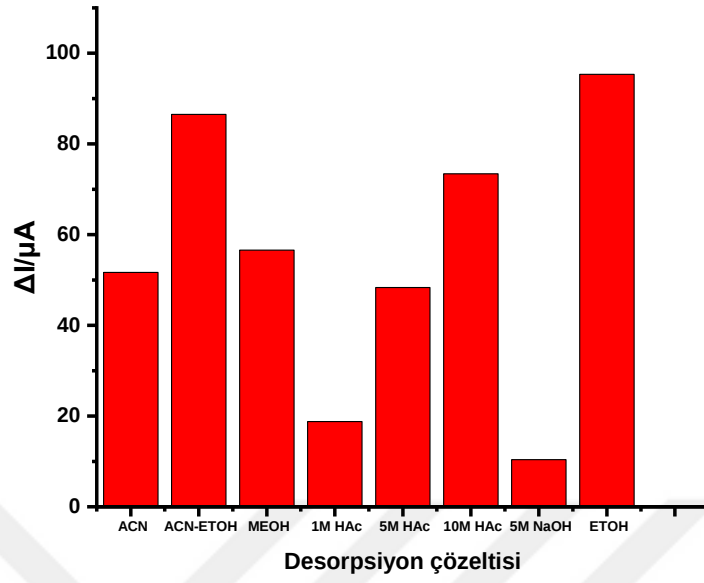


Şekil 3.6. (1S,2S)-PSDO@MIP/CKE elektrokimyasal kiral sensörünün , -0,2 - 0,8 V arasındaki potansiyel aralığında 1mM o-PD ve 1mM (1S,2S)-PSDO içeren FT'de (pH 7,4) ortamında hız taraması etkisi.

Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda; -0,2 - 0,8 V potansiyel tarama aralığında, monomer/hedef molekül molar oranı 1:1, potansiyel tarama hızı 50 mV/s ve döngü sayısı 10 olarak belirlenmiştir.

3.1.2.3. Hedef molekülün desorpsiyon işlemi

Sensörü optimize etmek için bir diğer önemli parametre de düzgün bir desorpsiyon işlemidir. Desorpsiyon çözeltisi ve desorpsiyon için seçilen süre, polimer filme zarar vermeden yeterli uzaklaştırma elde etmek için optimize edilmelidir. İlk olarak ACN, ACN:EtOH (1:1), MEOH, 1, 5, 10 M Asetik asit, 5 M NaOH, EtOH gibi farklı desorpsiyon çözeltileri kullanılmıştır. Etanol, diğer solüsyonlara kıyasla (1S,2S)-PSDO'nun etkin bir şekilde uzaklaştırılmasını sağladı ve sonuç olarak sonraki çalışmalarda desorpsiyon çözeltisi olarak kullanılmıştır (Şekil 3.7.).



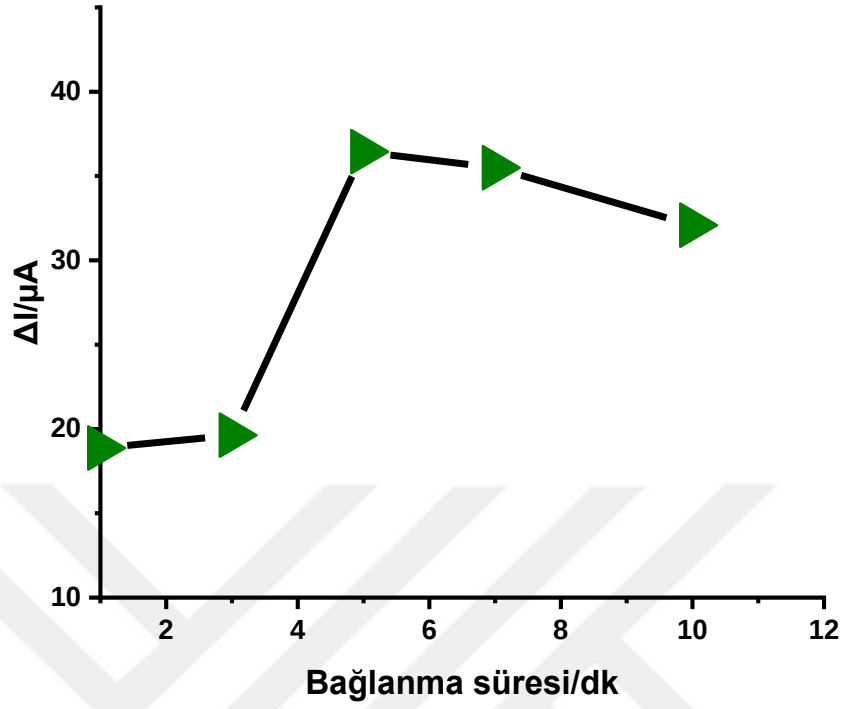
Şekil 3.7. (1S,2S)-PSDO@MIP/CKE elektrokimyasal kiral sensörünün, A) desorpsiyon çözeltisi, B) desorpsiyon zamanı.

Daha sonra, geliştirilen sensörün etanolde inkübe edilmesi için uygun süre optimize edilmiştir. (1S,2S)-PSDO@MIP/CKE, 350 rpm'de ve 25 °C'de bir manyetik

karıştırıcı kullanılarak 1, 3, 5, 7 ve 10 dakika süreyle etanol içinde inkübe edilmiştir. 5×10^{-15} M (1S,2S)-PSDO'nun 5 dakika bağlanmasından sonra, farklı sürelerde ΔI_p değerleri kontrol edilmiştir (Şekil 3.7.). Desorpsiyon süresi arttıkça (1S,2S)-PSDO@MIP/CKE'nin akım cevabı da paralel olarak artmıştır. (1S,2S)-PSDO, polimer matrisinden aşamalı olarak çıkarılmıştır. 5. dakikadan sonra, akım cevabı azaldı, bu da polimerin aşırı şişmesini açıklar, bu da boşlukların tıkanmasına neden olabilir. Daha uzun desorpsiyon süresi MIP'in yüzeyine zarar verebilir. Son olarak, desorpsiyon işlemi için en uygun süre 5 dakika olarak bulunmuştur.

3.1.2.4. Bağlanma süresinin optimizasyonu

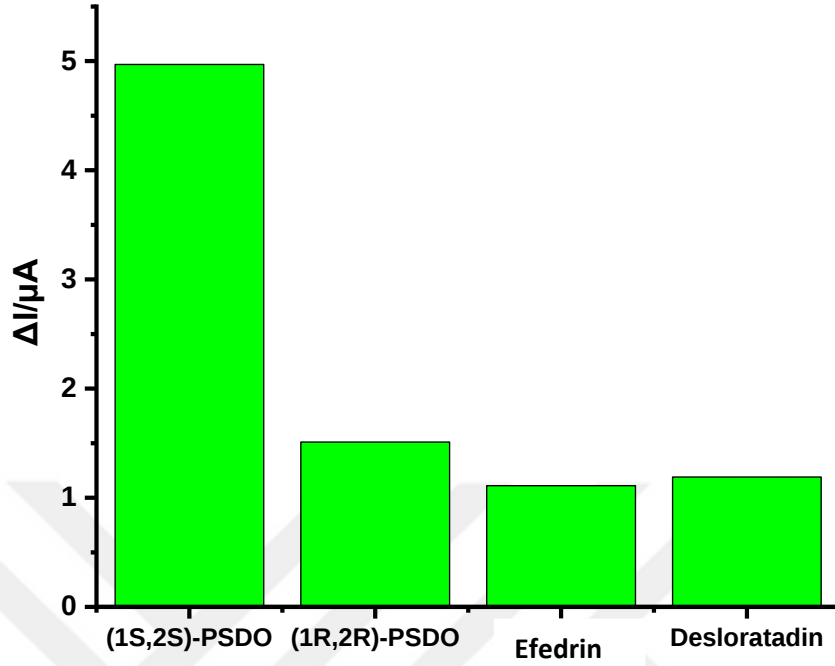
MIP temelli sensörlerde bir diğer önemli parametre, sensörün bağlanma süresi ve genel analitik performansı ile ilgili olduğu için inkübasyon süresinin optimize edilmesidir. Bağlanma süresinin etkisini incelemek için; 1, 3, 5, 7 ve 10 dakika, 5×10^{-15} M (1S,2S)-PSDO inkübe edilerek ve bir manyetik karıştırıcı kullanılarak 350 rpm ve 25 °C'de incelenmiştir. Şekil 3.8., ΔI_p değerlerinin 5 dakikaya kadar arttığını göstermektedir. 5 dakika sonra ΔI_p sürekli azalmıştır. Bu, 5 dakikalık inkübasyon süresinin (1S,2S)-PSDO için optimum bağlanma koşulunu sağladığını göstermiştir. Daha kısa inkübasyon sürelerinde MIP boşluklarının afinite ve bağlanma yeteneği yetersiz kalırken, daha uzun inkübasyon süreleri sensör performansının düşmesine neden olmuştur.



Şekil 3.8. Farklı bağlama sürelerine karşı 5×10^{-15} M (1S,2S)-PSDO'nun desorpsiyonundan ve bağlanmasından sonra ΔI_p değerlerinin grafiği.

3.1.3. Geliştirilen sensörlerin seçiciliklerinin incelenmesi

(1S,2S)-PSDO@MIP/CKE sensörünün seçiciliği, (1S,2S)-PSDO'nun benzer bileşiklerin akım cevabı ile değerlendirildi. (1S,2S)-PSDO@MIP/CKE sinyali, (1R,2R)-PSDO, Efedrin ve Desloratidin gibi 5×10^{-15} M benzer bileşikler kullanılarak DPV sonucu ile karşılaştırılmıştır (Şekil 3.9.).



Şekil 3.9. (1S,2S)-PSDO ve benzer bileşikler için IF değerlerinin değerlendirilmesi.

Önerilen sensörün seçiciliği, baskılama faktörü (IF) açısından araştırılmıştır. Aşağıdaki denklem kullanılarak baskılanmış elektrotun ($\Delta I(\text{MIP})$) baskılanmamış ($\Delta I(\text{NIP})$) elektrotun akım cevabına oranı olarak tanımlanır.

$$IF = \Delta I(\text{MIP}) / \Delta I(\text{NIP})$$

Burada, $\Delta I = I_0 - I$, burada I_0 ve I , sırasıyla (1S,2S)-PSDO'nun uzaklaştırılması ve bağlanmasından elde edilen elektrotun tepe sinyalleridir. (1S,2S)-PSDO@MIP/CKE elektrokimyasal kiral sensörü için elde edilen baskılama faktörleri (1S,2S)-PSDO, (1R,2R)-PSDO, Efedrin ve Desloratadin için sırasıyla 4,97, 1.51, 1.11, 1.19 olarak elde edilmiştir. Bu sonuçlar (1S,2S)-PSDO@MIP/CKE'nin (1S,2S)-PSDO bileşikleriyle seçici olarak bağlanabileceğini ispatlamıştır.

3.1.4. Girişim etkisi

(1S,2S)-PSDO@MIP/CKE, dopamin (DOP), askorbik asit (AA), Na^+ , SO_4^{2-} , parasetamol (PAR) ve ürik asit (UA) gibi girişim maddeleri kullanılarak incelenmiştir. $I=I_m/I_o$ ve BSS (%) değerleri, girişim etkisi gösteren bileşenlerin (1S, 2S)-PSDO ile 1:10 oranında karıştırılmasıyla hesaplanmıştır. Çizelge 3.1'de verildiği gibi, bağıl hata değerleri %99.63 ile %101.98 arasında elde edilmiştir. Önerilen (1S,2S)-PSDO@MIP/CKE sensörü, girişim maddelerinin varlığında neredeyse aynı şekilde uygulanmıştır.

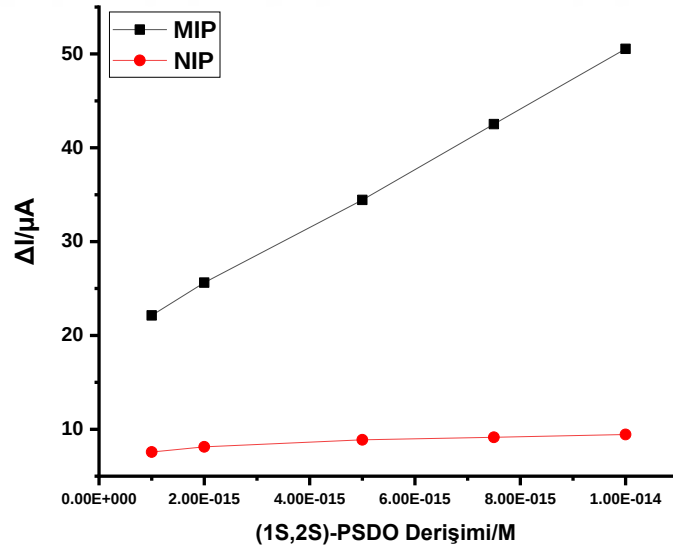
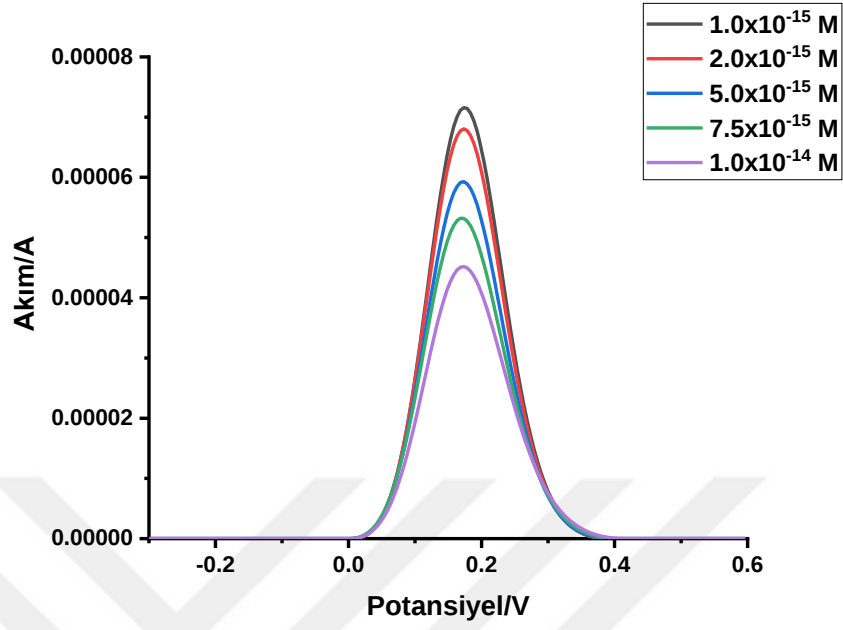
Çizelge 3.1. Girişim maddelerinin (1S,2S)-PSDO'nun akım cevabı üzerindeki etkisi

Girişim maddeleri	$I=I_m/I_o$	Sinyaldeki bağıl hata (%)
DOP	100.32	0.66
AA	99.74	0.58
Na^+	100.55	0.49
SO_4^{2-}	99.63	0.42
PAR	100.37	0.63
UA	101.98	0.96

3.1.5. (1S,2S)-PSDO'nun elektrokimyasal olarak tanınması

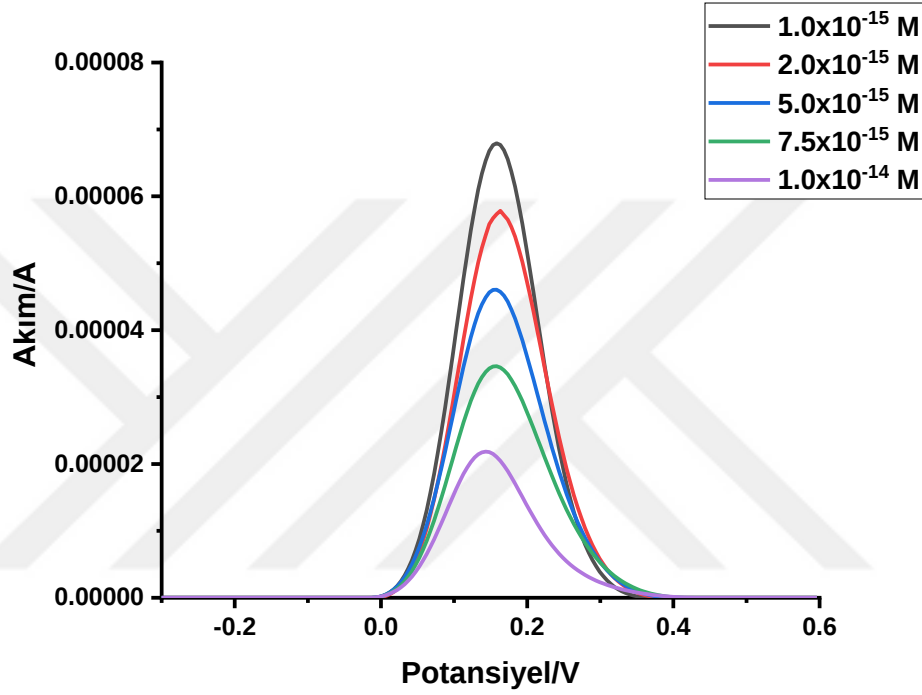
(1S,2S)-PSDO'nun analitik eğrisi, (1S,2S)-PSDO@MIP/CKE'nin analitik performansını değerlendirmek için kullanılmıştır. (1S,2S)-PSDO@MIP/CKE'nin tepe sinyali, birkaç (1S,2S)-PSDO derişiminin inkübasyonundan sonra redoks probu ile ilgili 0.16 V'ta anodik tepe akımı kullanılarak elde edilmiştir.

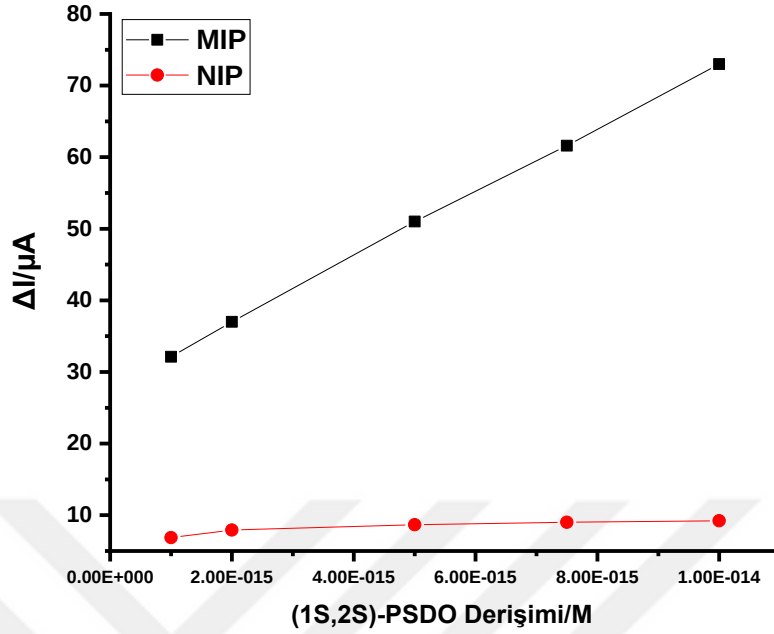
ΔI ve (1S,2S)-PSDO derişimleri arasında aşağıdaki doğrusal regresyon denklemini sergileyen 1×10^{-15} - 1×10^{-14} M arasında doğrusal bir ilişki bulundu: $\Delta I = 2.98 \times 10^{15} [(1S,2S)\text{-PSDO}] + 20.637$, ($R^2 = 0.998$) (Şekil 3.10.).



Şekil 3.10. (1S,2S)-PSDO'nun farklı derişimlerde bağlanmasıyla (1S,2S)-PSDO@MIP/CKE'nin DPV'si (A) (1S,2S)-PSDO@MIP/CKE ve NIP/CKE'de ΔI ve (1S,2S)-PSDO derişimleri arasında doğrusal ilişki (B).

Teşhis sınırı (TS) ve teşhis alt sınırı (TAS) sonuçları, doğrusal aralığın en düşük derişim kalibrasyon denkleminin eğimine(m) ve standart sapma(lar)ına dayanmaktadır. TS ve TAS sırasıyla 2.98×10^{-16} M ve 9.94×10^{-16} M olarak bulunmuştur. (1S,2S)-PSDO'nun farklı derişimlerde bağlanmasıyla 1S,2S)-PSDO@MIP/CKE'nin DPV'si şekil 3.10.'da gösterilmiştir.





Şekil 3.11. Ticari serum örneklerinde, (1S,2S)-PSDO'nin standart eklenmesiyle (1S,2S)-PSDO@MIP/CKE'nin DPV'si (A) ve (1S,2S)-PSDO@MIP/CKE ve NIP/CKE'de ΔI ve (1S,2S)-PSDO derişimleri arasındaki doğrusal ilişki (B).

Geliştirilen MIP sensörünün karşılaştırılması için NIP sensörü kullanılmıştır. Şekil 3.11. (1S,2S)-PSDO moleküllerinin bağlanmamasının yorumlayabileceği, farklı (1S,2S)-PSDO derişimleri bağlandığında ΔI değerlerinin neredeyse değişmeden kaldığını gösterir.

3.1.6. (1S,2S)-PSDO@MIP/CKE uygulamaları

Önerilen (1S,2S)-PSDO@MIP/CKE sensörünün analitik performansları, pratik olarak farmasötik tablet dozaj formlarına ve ticari serum numunesine optimum koşullar altında gösterilmiştir. İp ve C arasındaki büyük doğrusallık, TS (Çizelge 3.2) ve nicel (1S,2S)-PSDO geri kazanımları (Çizelge 3.3) ile anlaşılmıştır. Şekil 3.11, (1S,2S)-PSDO@MIP/CKE ve NIP/CKE sensörlerinin pratik kullanımının, insan

serum numunelerinde standart ekleme tekniği kullanılarak (1S,2S)-PSDO derişiminin tanımlanmasıyla gerçekleştirildiğini göstermektedir. MIP'ler ve NIP elektrotları, 1×10^{-15} - 1×10^{-14} M derişim aralığında çeşitli (1S,2S)-PSDO çözeltileriyle ticari serum örneklerine daldırılmıştır.

Çizelge 3.2. Standart çözelti ve serum numunelerinde (1S,2S)-PSDO@MIP/CKE sensörü ile (1S,2S)-PSDO için elde edilen kalibrasyon eğrisine ait regresyon analizi sonuçları ve validasyon parametreleri

Parametreler	Standart çözelti	Serum
Doğrusal çalışma aralığı, (M)	1×10^{-15} - 1×10^{-14}	1×10^{-15} - 1×10^{-14}
Eğim ($\mu\text{A M}^{-1}$)	2.98×10^{15}	2.13×10^{15}
Eğimin standart hatası	0.346	0.402
Kesişim (μA)	20.637	76.502
Kesişimin standart hatası	6.534	9.16
Korelasyon katsayısı	0.998	0.998
Teşhis sınırı (M)	2.98×10^{-16}	3.01×10^{-16}
Tayin alt sınırı (M)	9.94×10^{-16}	1.01×10^{-15}
Tekrarlanabilirlik (%BSS)*	0.648	0.593
Tekrar üretilebilirlik (%BSS)*	0.986	0.947

* Elde edilen %BSS değerlerinin ölçüm sayısı 5'tir.

Çizelge 3.3'te gösterildiği gibi, farmasötik dozaj formlarında ve ticari serum numunelerinde geri kazanımlar sırasıyla %100,5 ve %100,4 ve bağıl standart sapma değerleri de (BSS) %0,78 ve %0,46 olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 3.3. Deloday Plus® efervesan tablet dozaj formundan ve eklenmiş ticari serum örneklerinden (1S,2S)-PSDO için elde edilen analiz bulgularının sonuçları

Parametreler	DELODAY PLUS®	Ticari serum
Etiket miktarı (mg)	60.00	—
Bulunan miktar (mg)	60.40	—
BSS %*	1.10	—
BH %	0.67	—
Eklenen miktar (mg)	20.00	5.00
Bulunan miktar (mg)	20.1	5.02
Geri kazanım (%)	100.5	100.4
BSS %*	0.78	0.46
BH %	0.5	0.4

* Elde edilen %BSS değerlerinin ölçüm sayısı 5'tir.

3.1.7. Stabilité

Geliştirilen yöntemin tekrarlanabilirliğini belirlemek için kesinlik çalışmaları yapılmıştır. Tekrarlanabilirlik, beş tekrarlı ölçüm için bir (1S,2S)-PSDO@MIP/CKE sensörü test edilerek değerlendirilmiştir. 1×10^{-15} M (1S,2S)-PSDO beş ölçümü için BSS değeri % 0.648'dir.

Elektrotlar arası tekrar üretilebilirlik, 1×10^{-15} M (1S,2S)-PSDO içine daldırılan beş farklı elektrodun yanıtı belirlenerek değerlendirilmiştir. Beş ardışık deney için BSS, sırasıyla %0.986'dir ve bu, tekrarlanabilirlik için kabul edilebilir üretimi gösterir.

Elektrodun stabilitesi, gün içerisinde 1×10^{-15} M (1S,2S)-PSDO ile sensörün akım cevabı ölçülerek araştırıldı. Geliştirilen sensörün stabilitesi 1 gün olarak bulunmuştur.

3.2. ESOM etken maddesine ait bulgular

3.2.1. ESOM karakterizasyonu

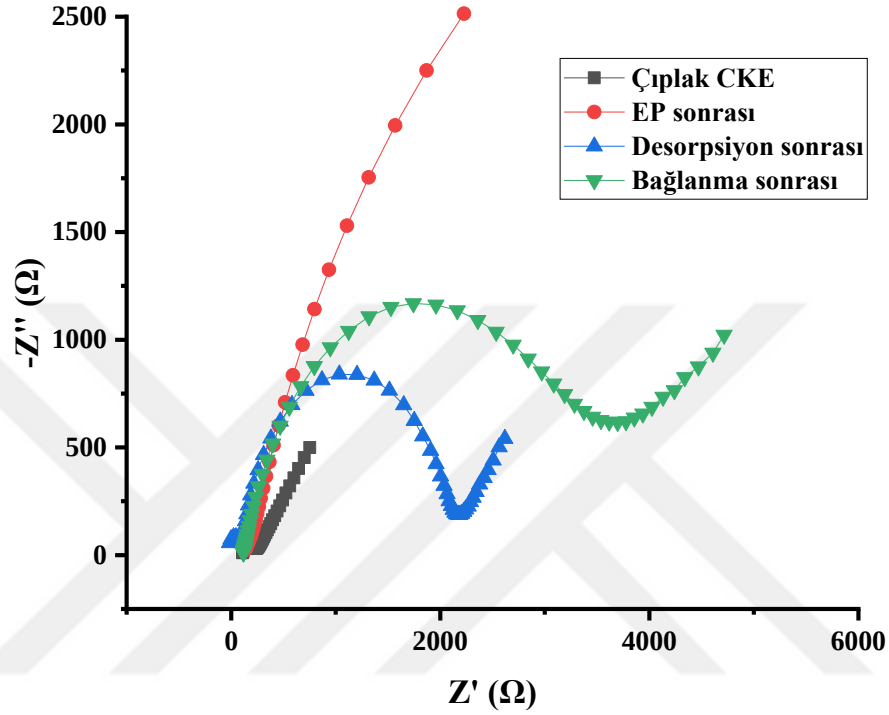
3.2.1.1. Elektrokimyasal karakterizasyon

ESOM/ β -CD/TEOS/CTAB@MIP/CKE elektrokimyasal kiral sensörünün elektrokimyasal karakterizasyonu, EIS ve DV yöntemleri kullanılarak elektropolimerizasyondan önce, elektropolimerizasyondan sonra, desorpsiyon işleminden sonra ve ESOM'un bağlanmasından sonra sonuçları karşılaştırmak için uygulanmıştır.

EIS, modifiye edilmiş ve edilmemiş elektrot yüzey özelliklerinin etkili bir şekilde karşılaştırılması ve geliştirilen sensörün karakterizasyonu için önemli bir tekniktir. EIS ile çıplak ve polimer baskılı elektrotların her aşamasının karakterizasyonu için $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ kullanılmıştır.

Her adımda dikkate değer impedans spektrum değişiklikleri Şekil 3.12.'deki gibi gözlenmiştir. Nyquist diyagramının daha yüksek frekanslar için yarım dairesi elektron transfer prosedürüne karşılık gelirken, düşük frekansın doğrusal kısmı difüzyona karşılık gelir. Çıplak CKE için hızlı elektron transfer kinetiği ile difüzyonla sınırlı bir süreç izlenebilir. Elektropolimerizasyondan sonra MIP iletken değildir ve yüzey elektron transferinde son derece dirençlidir. Böylece, maksimum dirençli impedans spektrumları elde edilmiştir. ESOM'un çıkarılmasından sonra, boşlukların oluşması nedeniyle impedans değeri azalır ve daha sonra elektron transfer elektronlarını kolaylaştırdığı için $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ sinyali gözlenebilir. Son olarak, ESOM'un bağlanmasından sonra yarım daire iyileştirilir. Elde edilen bu sonuçlar,

polimerik matrisin ESOM'a bağlanmak için yeterli kapasiteye sahip olduğu şeklinde yorumlanabilir.

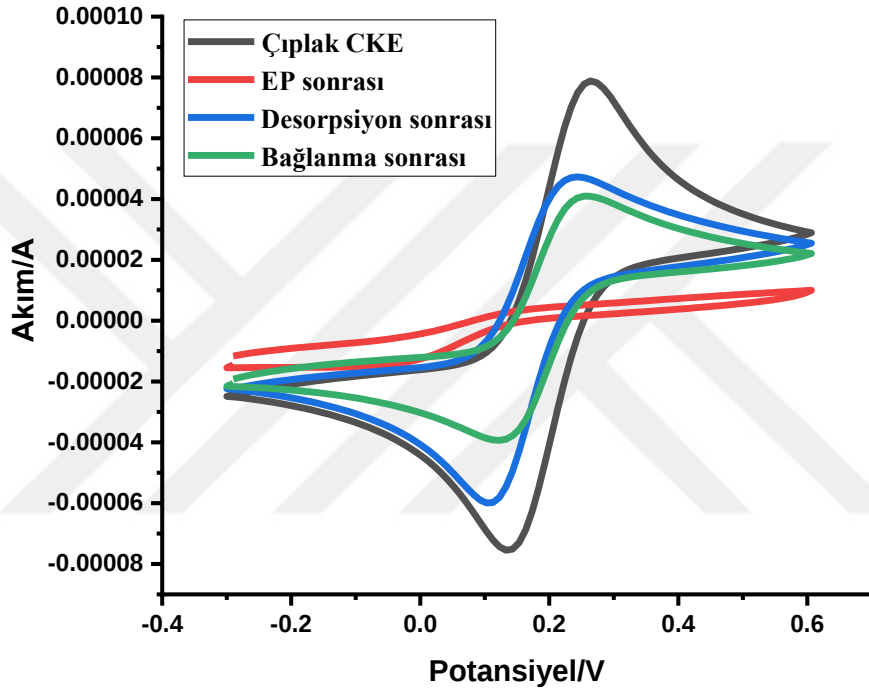


Şekil 3.12. ESOM/β-CD/TEOS/CTAB@MIP/CKE elektrokimyasal kiral sensörü oluşturmak için her adımda elde edilen elektrokimyasal impedans spektroskopi eğrileri.

DV, sensörlerin elektrokimyasal karakterizasyonu için en temel yöntemdir. Elektropolimerizasyon, desorpsiyon ve bağlanma prosedürlerini değerlendirmek için DV yöntemi uygulanmıştır.

Şekil 3.13'te görüldüğü gibi, çıplak CKE maksimum tepe akımına sahiptir. Elektropolimerizasyondan sonra, polimer oluşumu tarafından inhibe edilen elektron transferi nedeniyle $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ pik akımı elde edilemez. ESOM'un desorpsiyonundan sonra, bağlanmaya ve artan elektron transferine izin veren boşlukların oluşumunu gösteren $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ pik akımı tekrar elde edilmiştir. Son

olarak, ESOM'un bağlanmasıyla, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ için uygun bağlanma boşluklarındaki azalma nedeniyle $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ sinyalinde önemli bir azalma elde edilmiştir. ESOM/ β -CD/TEOS/CTAB@MIP/CKE sensörünün elektrokimyasal kiral algılama alanında mükemmel seçicilik ve hassasiyet, olağanüstü tekrarlanabilirlik gibi birçok avantajı vardır.



Şekil 3.13. ESOM/ β -CD/TEOS/CTAB@MIP/CKE elektrokimyasal kiral sensörünün her adımının elde edilen dönüşümlü voltamogramları.

3.2.2. Deneysel koşulların optimizasyonu

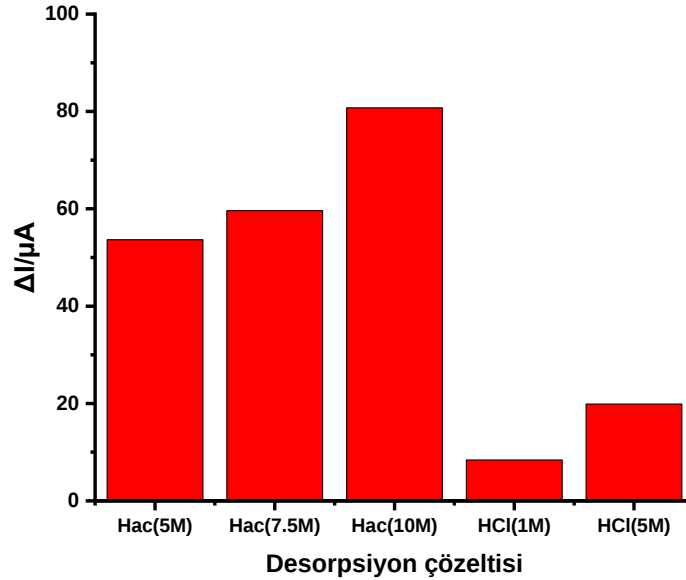
3.2.2.1. Monomer/hedef molekül oranının etkisi

Moleküler baskılanmış filmin optimizasyonu ve değerlendirilmesi, MIP tabanlı sensör tasarımının en kritik aşamasıdır. Monomerin hedef moleküle molar oranını

optimize ederek, uygun bağlanma boşlukları ve kararlı ve homojen polimer oluşumu sağlanabilir. Farklı oranlarda hazırlanan elektrotların DPV ve DV tepkileri, elektropolimerizasyon öncesi, elektropolimerizasyon sonrası, desorpsiyon sonrası ve bağlama sonrasında kontrol edilmiştir. Sonuç olarak, monomer/hedef molekül molar oranının iyi stabilite, kolay çıkarma ve bağlama işlemi sağladığı oran 1:1 olarak bulundu ve optimum oran olarak seçilmiştir.

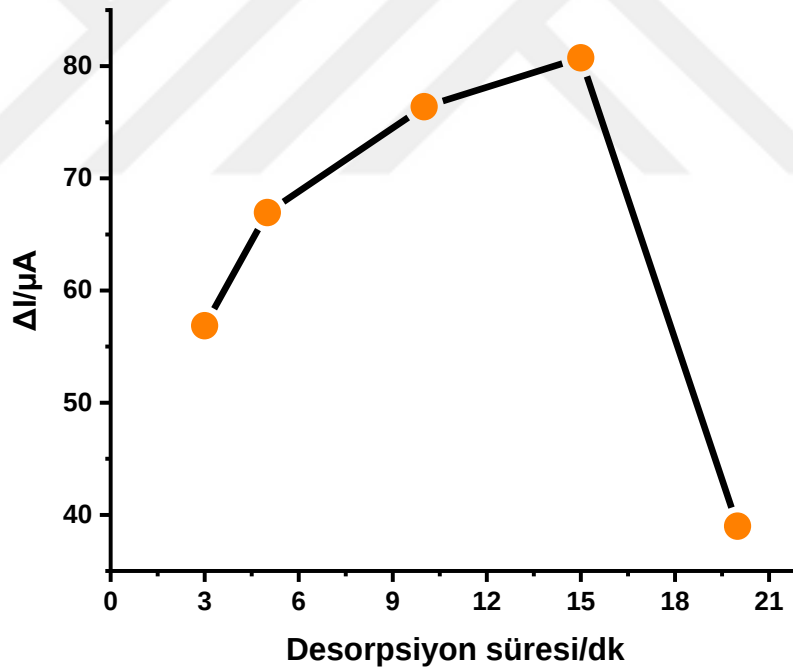
3.2.2.2. Hedef molekülün desorpsiyon işlemi

Sensörü optimize etmek için bir diğer önemli parametre de düzgün bir desorpsiyon işlemidir. Desorpsiyon çözeltisi ve desorpsiyon için seçilen süre, polimer filme zarar vermeden yeterli çıkarma elde etmek için optimize edilmelidir. İlk olarak 5, 7.5, 10.0 M HAc, 1.0 ve 5.0 M HCl gibi farklı desorpsiyon çözeltileri kullanılmıştır. 10M HAc, diğer solüsyonlara kıyasla ESOM'un etkin bir şekilde uzaklaştırılmasını sağlamış ve sonuç olarak sonraki çalışmalarda bir desorpsiyon çözeltisi olarak kullanılmıştır (Şekil 3.14.).



Şekil 3.14. ESOM/ β -CD/TEOS/CTAB@MIP/CKEelektrokimyasal kiral sensörünün desorpsiyon çözeltisi optimizasyonu.

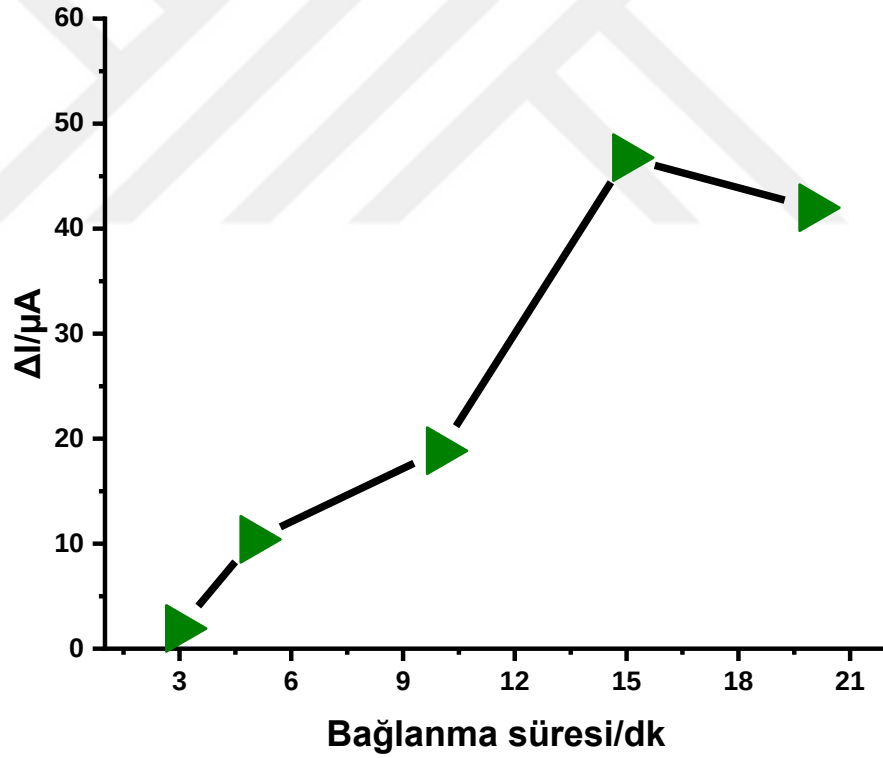
Daha sonra, geliştirilen sensörün 10.0 M HAc'de inkübe edilmesi için uygun süre optimize edilmiştir. ESOM/ β -CD/TEOS/CTAB@MIP/CKE, 350 rpm'de ve 25 °C'de bir manyetik karıştırıcı kullanılarak 3, 5, 10, 15 ve 20 dakika süreyle 10.0 M HAc içinde inkübe edilmiştir. 5×10^{-14} M ESOM'un 15 dakika bağlanmasından sonra, ΔI_p değerleri farklı sürelerde kontrol edilmiştir (Şekil 3.15.). Desorpsiyon süresi arttıkça, ESOM/ β -CD/TEOS/CTAB@MIP/CKE'nin akım cevabı da paralel olarak artmıştır. ESOM, polimer matrisinden aşamalı olarak çıkarılmıştır. 15. dakikadan sonra, akım cevabı azalmıştır. Bu polimerin aşırı şişmesini açıklamaktadır. Ama bu süre boşlukların tıkanmasına neden olabilir. Daha uzun desorpsiyon süresi, geliştirilen sensörün yüzeyine zarar verebilir. Son olarak, desorpsiyon işlemi için en uygun süre 15 dakika olarak bulunmuştur.



Şekil 3.15. ESOM/ β -CD/TEOS/CTAB@MIP/CKE elektrokimyasal kiral sensörünün desorpsiyon süresi optimizasyonu.

3.2.2.3. Bağlanma süresinin optimizasyonu

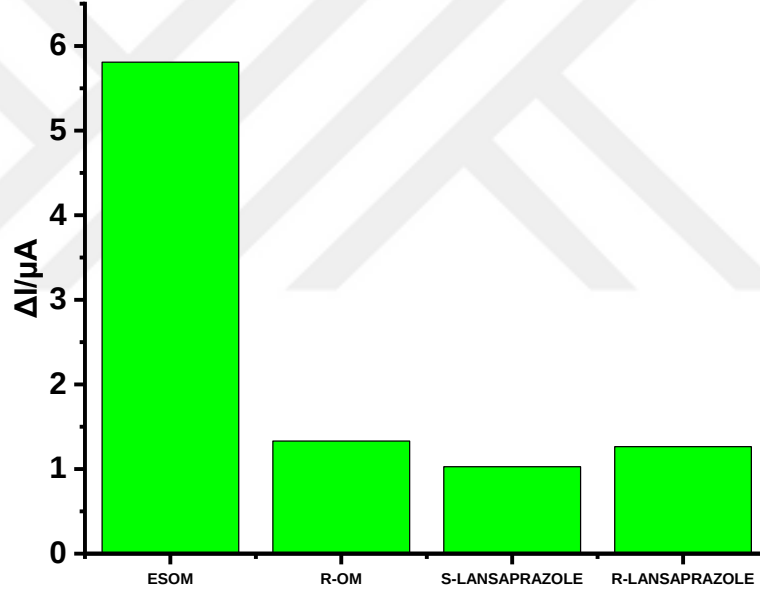
MIP tabanlı sensörlerde bir diğer önemli parametre, sensörün bağlanma süresi ve genel analitik performansı ile ilgili olduğu için inkübasyon süresinin optimize edilmesidir. İnkübasyon süresinin etkisini test etmek için; 5×10^{-14} M ESOM inkübe edilerek ve 350 rpm ve 25 °C'de bir manyetik karıştırıcı kullanılarak 3, 5, 10, 15 ve 20 dakikada incelenmiştir. Şekil 3.16., ΔI_p değerlerinin 15 dakikaya kadar arttığını göstermektedir. 15 dakika sonra ΔI_p sürekli azalmıştır. Bu, 15 dakikalık inkübasyon süresinin ESOM için en uygun bağlanma koşulunu sağladığını göstermiştir. Daha kısa inkübasyon sürelerinde MIP boşluklarının afinite ve bağlanma yeteneği yetersiz iken, daha uzun inkübasyon süreleri sensör performansının düşmesine neden olmuştur.



Şekil 3.16. Farklı bağlama sürelerine karşı 5×10^{-14} M ESOM'nun desorpsiyonundan ve bağlanmasından sonra ΔI_p değerlerinin grafiği.

3.2.3. Geliştirilen sensörlerin seçiciliklerinin incelenmesi

Benzer bileşiklerle çapraz reaktivite ölçümleri yapılmıştır. ESOM/ β -CD/TEOS/CTAB@MIP/CKE'nin seçiciliği, ESOM'un benzer bileşiklerin akım cevabı ile değerlendirilmiştir. ESOM/ β -CD/TEOS/CTAB@MIP/CKE sinyali, 5×10^{-14} M R-OM, R-Lansoprazol ve S-Lansoprazol gibi benzer bileşikler kullanılarak DPV sonucu ile karşılaştırılmıştır (Şekil 3.17.). Bu sonuçlar, geliştirilen sensörün ESOM'a karşı büyük bir seçicilik gösterdiğini ispatlamıştır.



Şekil 3.17. ESOM ve R-OM, S-Lansoprazol ve R-Lansoprazol gibi benzer bileşikler için IF değerlerinin değerlendirilmesi.

ESOM/ β -CD/TEOS/CTAB@MIP/CKE sensörünün seçiciliği, baskılama faktörü (IF) kullanılarak değerlendirilmiştir. MIP ve NIP sensörü ile ilgili DPV'nin $\Delta I(I-I_0)$ yanıtının oranı olarak belirlenir ve burada mevcut yanıtlar arasındaki farklara ait olan aşağıdaki denklem kullanılır.

$$IF = \Delta I(MIP) / \Delta I(NIP)$$

Burada, $\Delta I = I_o - I$, burada I_o ve I , sırasıyla ESOM'un uzaklaştırılması ve bağlanmasından elde edilen elektrotun tepe sinyalleridir. ESOM/ β -CD/TEOS/CTAB@MIP/CKE sensörü için elde edilen IF, ESOM, R-OM, S-Lansoprazol ve R-Lansoprazol için sırasıyla 5.81, 1.33, 1.03, 1.26'dir. Bu sonuçlar, ESOM/ β -CD/TEOS/CTAB@MIP/CKE sensörünün ESOM bileşikleri ile seçici olarak bağlanabileceğini ispatlamıştır.

3.2.4. Girişim etkisi

ESOM/ β -CD/TEOS/CTAB@MIP/CKE, DOP, AA, Na^+ , SO_4^{2-} , PAR ve UA gibi girişim maddeleri kullanılarak incelenmiştir. $I=I_m/I_o$ ve BSS (%) değerleri, girişim etkisi gösteren bileşenlerin 1:10 oranında ESOM ile karıştırılmasıyla hesaplanmıştır. Çizelge 3.4'de verildiği gibi, bağıl hata değerleri %98.72 ile % 100.48 arasında elde edilmiştir. Önerilen ESOM/ β -CD/TEOS/CTAB@MIP/CKE sensörü, girişim maddelerinin varlığında tepe sinyaline neredeyse aynı şekilde uygulanmıştır.

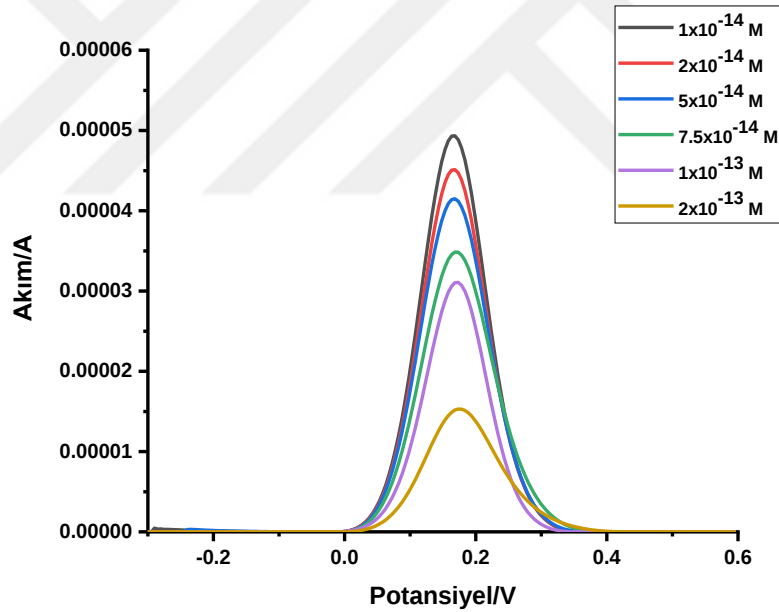
Çizelge 3.4. Girişim maddelerinin ESOM'un akım cevabı üzerindeki etkisi

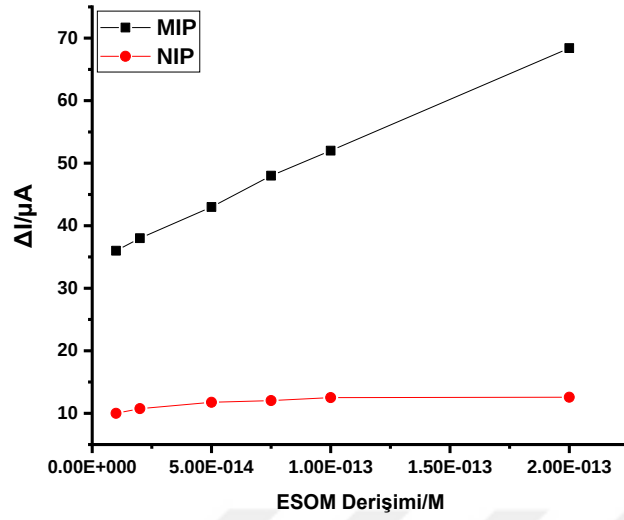
Girişim maddeleri	$I=I_m/I_o$	Sinyaldeki bağıl hata (%)
DOP	99.86	0.54
AA	98.72	0.47
Na^+	99.35	0.38
SO_4^{2-}	98.76	0.40
PAR	100.24	0.57
UA	100.48	0.68

3.2.5. ESOM'un elektrokimyasal olarak tanınması

ESOM'un analitik eğrisi, ESOM/ β -CD/TEOS/CTAB@MIP/CKE'nin analitik performansını değerlendirmek için kullanılmıştır. ESOM/ β -CD/TEOS/CTAB@MIP/CKE'nin tepe sinyali, birkaç ESOM derişiminin inkübasyonundan sonra redoks probu ile ilgili 0.16 V'ta anodik tepe akımı kullanılarak elde edilmiştir.

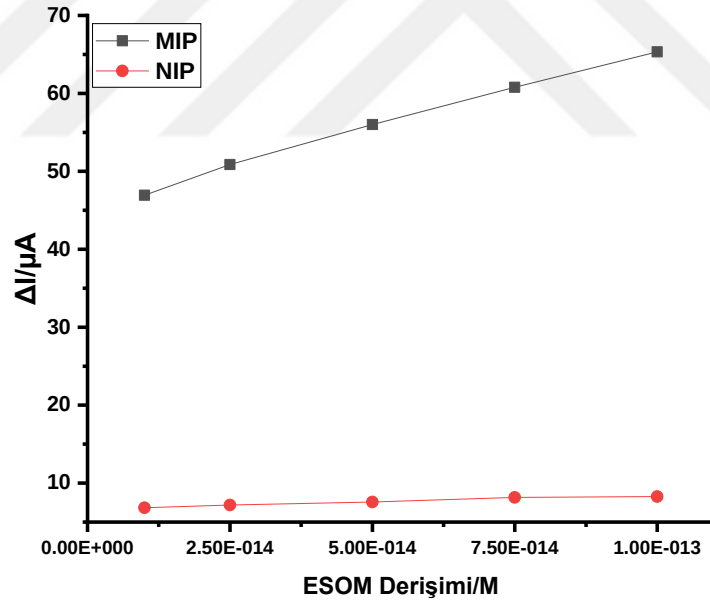
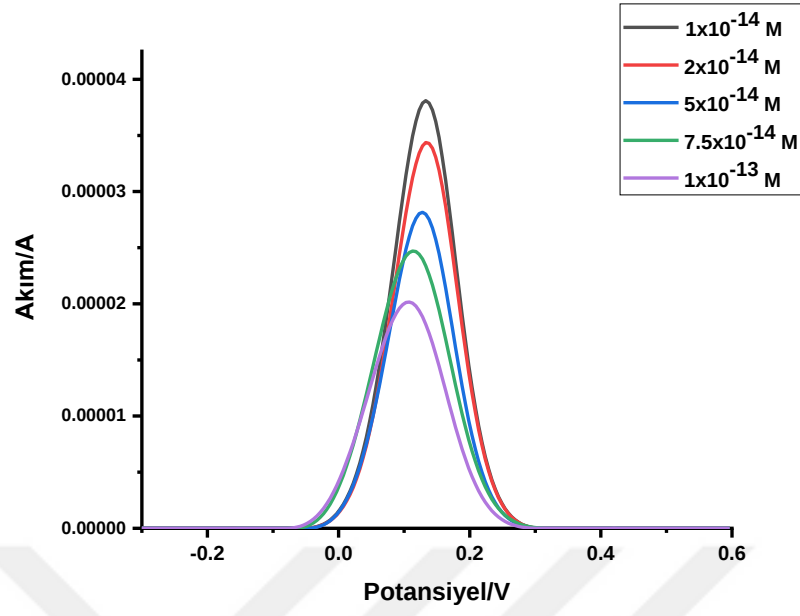
ΔI ve ESOM derişimleri arasında aşağıdaki doğrusal regresyon denklemini sergileyen 1×10^{-14} - 2×10^{-13} M arasında doğrusal bir ilişki bulundu: $\Delta I = 3 \times 10^{15}$ [ESOM] + 20.219, ($R^2 = 0.996$) (Şek. 3.18.).





Şekil 3.18. ESOM'un farklı derişimlerinin bağlanmasıyla ESOM/ β -CD/TEOS/CTAB@MIP/CKE'nin DPV'si (A) ESOM/ β -CD/TEOS/CTAB@MIP/CKE'nin ve NIP/CKE'de ΔI ve ESOM derişimleri arasında doğrusal bir ilişki (B).

TS ve TAS sonuçları, doğrusal aralığın en düşük derişiminin kalibrasyon denkleminin eğimine(m) ve standart sapma(lar)ına dayanmaktadır. TS ve TAS sırasıyla 1.89×10^{-15} M ve 6.32×10^{-15} M olarak bulunmuştur. ESOM'un farklı derişimlerinin bağlanmasıyla ESOM/ β -CD/TEOS/CTAB@MIP/CKE'nin DPV'si şekil 3.19'da gösterilmiştir.



Şekil 3.19. Ticari serum örneklerinde, ESOM'un standart eklenmesiyle ESOM/ β -CD/TEOS/CTAB@MIP/CKE'nin DPV'si (A) ve ESOM/ β -CD/TEOS/CTAB@MIP/CKE'nin ve NIP/CKE'de ΔI ve ESOM derişimleri arasındaki doğrusal bir ilişki (B).

Geliştirilen MIP sensörünün karşılaştırılması için NIP sensörü kullanılmıştır. Şekil 3.19, ESOM moleküllerinin bağlanmamasının yorumlayabileceği, farklı ESOM derişimleri bağlandığında ΔI değerlerinin neredeyse değişmeden kaldığını gösterir.

3.2.6. ESOM/ β -CD/TEOS/CTAB@MIP/CKE uygulamaları

Geliştirilen sensörün ESOM analizinde etkinliğini değerlendirmek için ticari serum numuneleri ve farmasötik tablet dozaj formları kullanılmıştır. Sonuçlar Çizelge 3.5'de rapor edilmiştir; elde edilen geri kazanım yüzdeleri, bu yöntemin gerçek numunelerde ESOM'yi ölçme konusundaki yüksek kabiliyetini doğrulamaktadır. Ip ve C arasındaki büyük doğrusallık, TS (Çizelge 3.5.) ve nicel ESOM geri kazanımları (Çizelge 3.6.) ile fark edildi. Şekil 10, ESOM/ β -CD/TEOS/CTAB@MIP/CKE ve NIP/CKE sensörlerinin pratik kullanımının, ticari serum numunelerinde standart ekleme tekniği kullanılarak ESOM derişiminin tanımlanmasıyla gerçekleştirildiğini göstermektedir. ESOM/ β -CD/TEOS/CTAB@MIP/CKE ve NIP/CKE, 1×10^{-14} - 1×10^{-13} M arasında değişen ESOM derişimlerine sahip ticari serum örneklerine daldırılmıştır.

Çizelge 3.5. Standart çözelti ve serum numunelerinde ESOM/ β -CD/TEOS/CTAB@MIP/CKE sensörü ile ESOM için elde edilen kalibrasyon eğrisine ait regresyon analizi sonuçları ve validasyon parametreleri

Parametreler	Standart çözelti	Serum
Doğrusal çalışma aralığı, (M)	1×10^{-14} - 2×10^{-13}	1×10^{-14} - 1×10^{-13}
Eğim ($\mu\text{A M}^{-1}$)	1.73×10^{14}	2.02×10^{14}
Eğimin standart hatası	0.272	0.306
Kesişim (μA)	34.572	45.613
Kesişimin standart hatası	2.638	5.24
Korelasyon katsayısı	0.995	0.993
Teşhis sınırı (M)	1.89×10^{-15}	1.29×10^{-15}
Tayin alt sınırı (M)	6.32×10^{-15}	4.27×10^{-15}
Tekrarlanabilirlik (%BSS)*	0.328	0.546
Tekrar üretilebilirlik (%BSS)*	0.524	0.758

* Elde edilen %BSS değerlerinin ölçüm sayısı 5'tir.

Çizelge 3.6'da gösterildiği gibi, geri kazanımlar, farmasötik dozaj formlarında ve ticari serum numunelerinde sırasıyla %100.25 ve %100.6 ve bağıl standart sapma (BSS) %0.46 ve %0.66 olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 3.6. ESOM[®] tablet dozaj formundan ve ticari serum örneklerinden ESOM için elde edilen analiz bulgularının sonuçları

Parametreler	ESOM [®]	Serum
Etiket miktarı (mg)	40.00	—
Bulunan miktar (mg)	40.2	—
BSS %*	0.76	—
BH %	0.50	—
Eklenen miktar (mg)	20.00	5.00
Bulunan miktar (mg)	20.05	5.03
Geri kazanım (%)	100.25	100.6
BSS %*	0.46	0.66
BH %	0.25	0.6

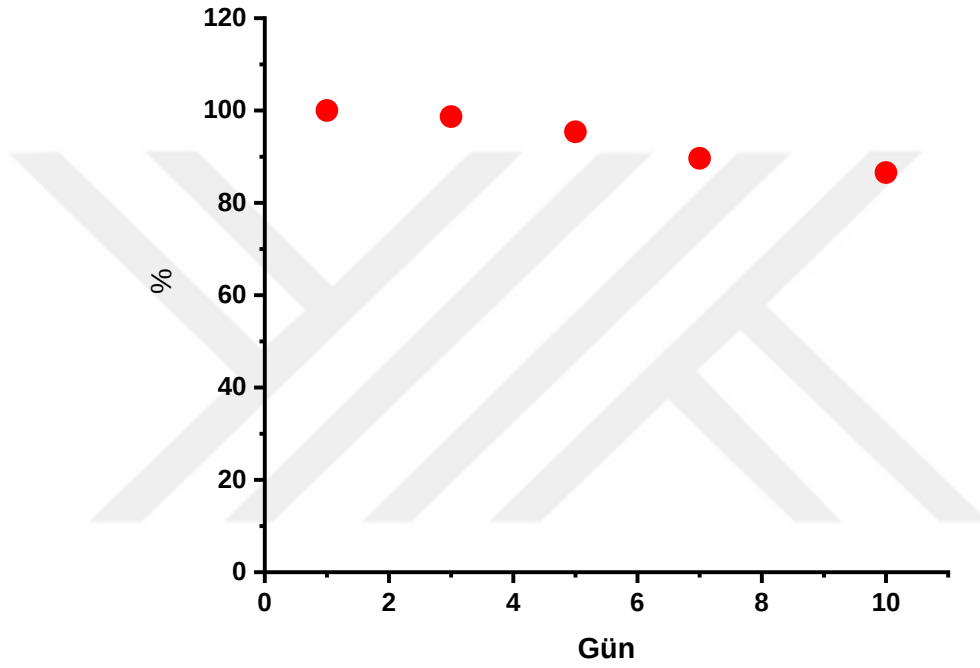
* Elde edilen %BSS değerlerinin ölçüm sayısı 5'tir.

3.2.7. Stabilité

Geliştirilen yöntemin tekrarlanabilirliğini belirlemek için kesinlik çalışmaları yapılmıştır. Tekrarlanabilirlik, beş tekrarlı belirleme için bir ESOM/ β -CD/TEOS/CTAB@MIP/CKE sensörü test edilerek değerlendirilmiştir. 1×10^{-14} M ESOM beş ölçümü için BSS değeri % 0.328'dür.

Elektrotlar arası tekrar üretilebilirlik, 1×10^{-14} M ESOM içine daldırılan beş farklı elektrotun yanıtı belirlenerek değerlendirilmiştir. Beş ardışık deney için BSS, sırasıyla %0.524'dir ve bu, tekrarlanabilirlik için kabul edilebilir üretimi gösterir.

Elektrotun stabilitesi, geniş bir zaman çerçevesinde 1., 3., 5., 7. ve 10. gün 1×10^{-15} M ESOM ile sensörün akım cevabı ölçülerek araştırılmıştır. Geliştirilen sensörün stabilitesi 10 gün olarak bulunmuştur. Ölçümler arasında elektrot, bir 25 °C'de oda sıcaklığında saklandı. Mevcut yanıt 5 gün sonra %95.39'e düşerken, orijinal yanıtın %86.56'sı 10 gün sonra korunmuştur.



Şekil 3.20. ESOM/β-CD/TEOS/CTAB@MIP/CKE sensörünün stabilite çalışması

3.3. Sitalopram etken maddesine ait bulgular

3.3.1. Sitalopram karakterizasyonu

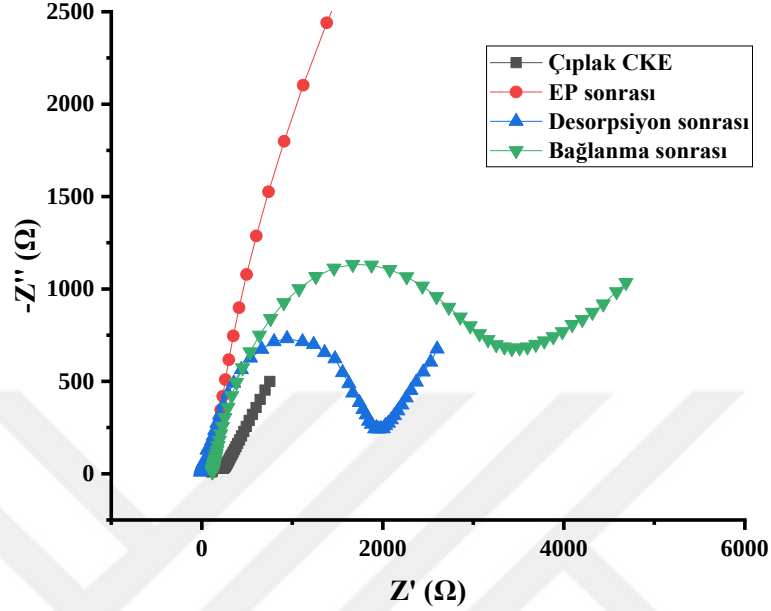
3.3.1.1. Elektrokimyasal karakterizasyon

ESCIT/C1/EPI@MIP/CKE, elektrokimyasal kiral sensörünün elektrokimyasal karakterizasyonu, EIS ve DV yöntemleri kullanılarak elektropolimerizasyondan önce,

elektropolimerizasyondan sonra, desorpsiyon işleminden sonra ve ESCIT'un bağlanmasından sonra sonuçları karşılaştırmak için uygulanmıştır.

EIS, modifiye edilmiş ve edilmemiş elektrot yüzey özelliklerinin etkili bir şekilde karşılaştırılması ve geliştirilen sensörün karakterizasyonu için önemli bir tekniktir. EIS ile çıplak ve polimer baskılı elektrotların her aşamasının karakterizasyonu için $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ kullanılmıştır.

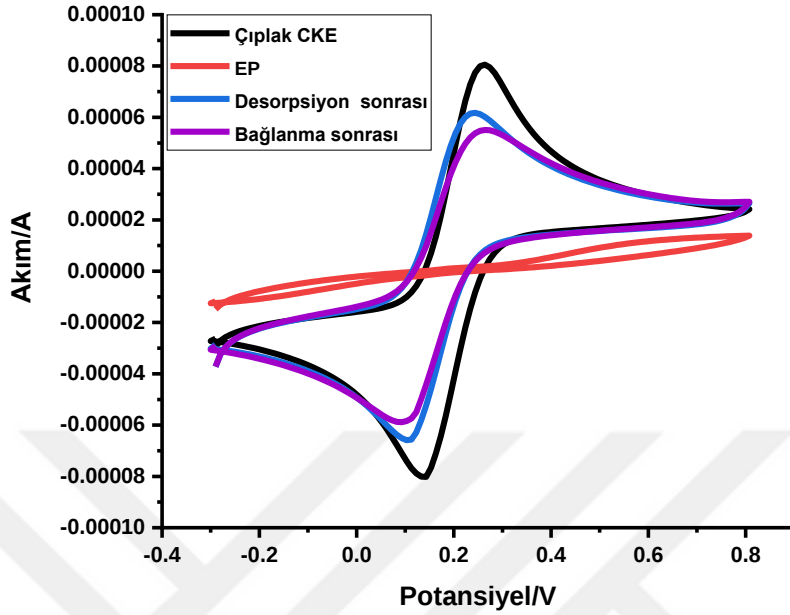
Her adımda dikkate değer empedans spektrum değişiklikleri Şekil 3.19'da gözlenmiştir. Nyquist diyagramının daha yüksek frekanslar için yarım dairesi elektron transfer prosedürüne karşılık gelirken, düşük frekansın lineer kısmı difüzyona karşılık gelir. Çıplak CKE için hızlı elektron transfer kinetiği ile difüzyonla sınırlı bir süreç izlenebilir. Elektropolimerizasyondan sonra MIP iletken değildir ve yüzey elektron transferinde son derece dirençlidir. Böylece, maksimum dirençli impedans spektrumları elde edildi. ESCIT'in çıkarılmasından sonra, boşlukların oluşması nedeniyle impedans değeri azalır ve daha sonra elektron transfer elektronlarını kolaylaştırdığı için $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ sinyali fark edilir. Son olarak, ESCIT'in daldırılmasından sonra yarım daire iyileştirilir. Elde edilen bu sonuçlar, polimerik matrisin ESCIT'ya bağlanmak için yeterli kapasiteye sahip olduğu şeklinde yorumlanabilir.



Şekil 3.21. ESCIT/C1/EPI@MIP/CKE elektrokimyasal kiral sensörü oluşturmak için her adımda elde edilen elektrokimyasal impedans spektroskopisi.

DV, sensörlerin elektrokimyasal karakterizasyonu için en temel yöntemdir. Elektropolimerizasyon, desorpsiyon ve bağlama işlemlerini değerlendirmek için DV yöntemi uygulanmıştır.

Şekil 3.20'de görüldüğü gibi, çıplak CKE maksimum tepe akımına sahiptir. Elektropolimerizasyondan sonra, polimer gelişimi tarafından inhibe edilen elektron transferi nedeniyle $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ pik akımı elde edilemez. ESCIT'in desorpsiyonundan sonra, bağlanmaya ve artan elektron transferine izin veren boşlukların oluşumunu gösteren $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ pik akımı tekrar elde edildi. Son olarak, ESOM'un bağlanmasından sonra, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ için uygun bağlanma boşluklarındaki azalma nedeniyle $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ sinyalinde önemli bir azalma elde edildi. ESCIT/C1/EPI@MIP/CKE sensörünün elektrokimyasal kiral algılama alanında mükemmel seçicilik ve hassasiyet, olağanüstü tekrarlanabilirlik gibi birçok avantajı vardır.

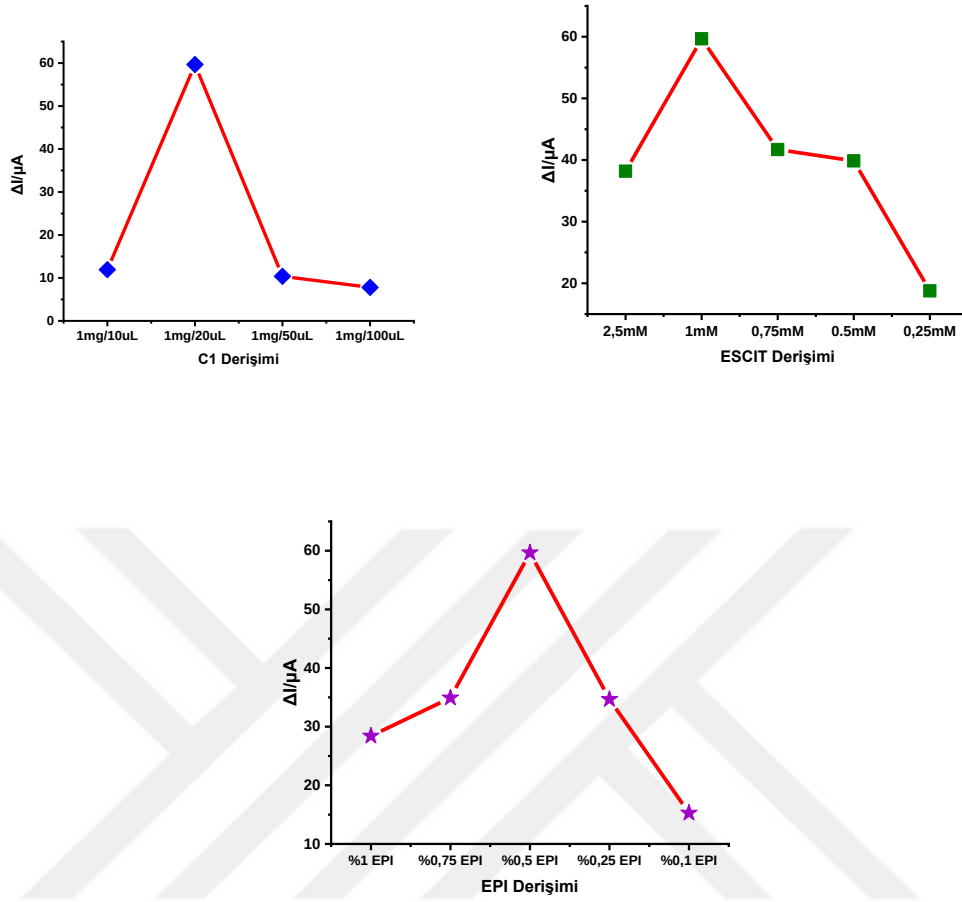


Şekil 3.22. ESCIT/C1/EPI@MIP/CKE elektrokimyasal kiral sensörünün her adımının elde edilen dönüşümlü voltamogramları.

3.3.2. Deneysel koşulların optimizasyonu

3.3.2.1. Monomer/hedef molekül oranının etkisi

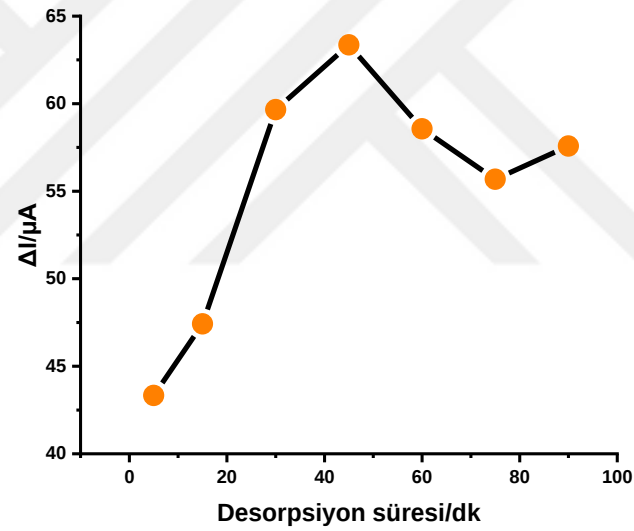
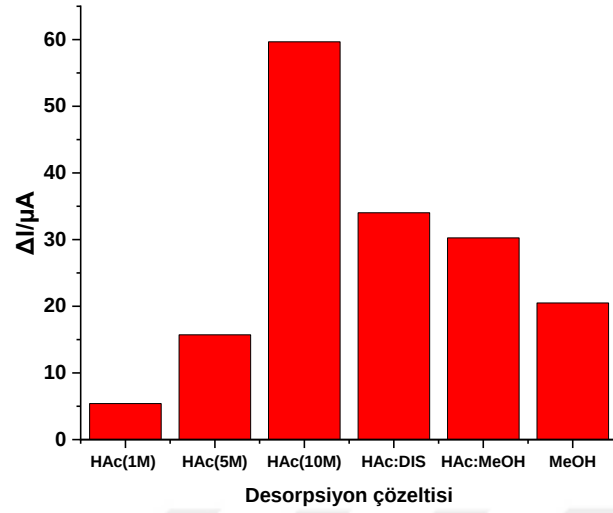
Moleküler baskılı filmin optimizasyonu ve değerlendirilmesi, MIP tabanlı sensör tasarımının en kritik aşamasıdır. Monomerin hedef moleküle molar oranını optimize ederek, uygun bağlanma boşlukları ve kararlı ve homojen polimer oluşumu sağlanabilir. Farklı oranlarda hazırlanan elektrotların DPV ve DV tepkileri, elektropolimerizasyon öncesi, elektropolimerizasyon sonrası, desorpsiyon sonrası ve bağlama sonrasında kontrol edilmiştir. Sonuç olarak, monomer/hedef molekül molar oranının iyi stabilite, kolay çıkarma ve bağlama işlemi sağladığı oran araştırıldı.



şekil 3.23. C1, ESCIT ve EPI derişim optimizasyonu

3.3.2.2. Hedef molekölün desorpsiyon işlemi

Sensöröl optimize etmek için bir diğer önemli parametre de düzgöl bir desorpsiyon işlemidir. Desorpsiyon çözeltisi ve desorpsiyon için seçilen süre, polimer filme zarar vermeden yeterli çıkarma elde etmek için optimize edilmelidir. İlk olarak 1, 5, 10M HAc, HAc:DIS, HAc:MEOH ve 5M HCl gibi farklı desorpsiyon çözeltileri kullanıldı. 10M HAc, diğer solüsyonlara kıyasla ESCIT'ın etkin bir şekilde uzaklaştırılmasını sağladı ve sonuç olarak sonraki çalışmalarda bir desorpsiyon çözeltisi olarak kullanıldı (şekil 3.21.).



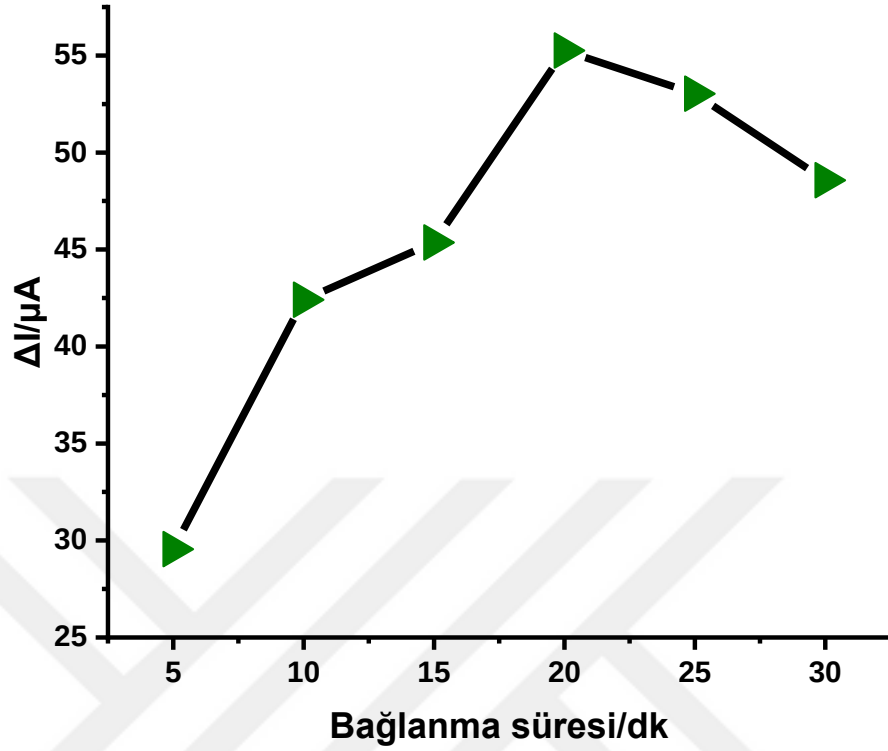
Şekil 3.24. ESCIT/C1/EPI@MIP/CKE elektrokimyasal kiral sensörünün , A) desorpsiyon çözeltisi, B) desorpsiyon zamanı.

Daha sonra, geliştirilen sensörün 10M HAc'ye inkübe edilmesi için uygun süre optimize edildi. ESCIT/C1/EPI@MIP/CKE, 350 rpm'de ve 25 °C'de bir Thermo Shaker kullanılarak 3, 15, 30, 45, 60, 75 ve 90 dakika süreyle 10M HAc içinde inkübe edildi. 5×10^{-11} M ESCIT'ın 15 dakika bağlanmasından sonra, ΔI_p değerleri farklı sürelerde kontrol edildi (Şekil 3.21.). Desorpsiyon süresi arttıkça, ESCIT/C1/EPI@MIP/CKE 'nin akım cevabı da paralel olarak arttı. ESCIT, polimer

matrisinden aşamalı olarak çıkarıldı. 45. dakikadan sonra, akım cevabı azaldı, bu da polimerin aşırı şişmesini açıklar, bu da boşlukların tıkanmasına neden olabilir. Daha uzun desorpsiyon süresi, geliştirilen sensörün yüzeyine zarar verebilir. Son olarak, desorpsiyon işlemi için en uygun süre 45 dakika olarak bulunmuştur.

3.3.2.3. Bağlanma süresinin optimizasyonu

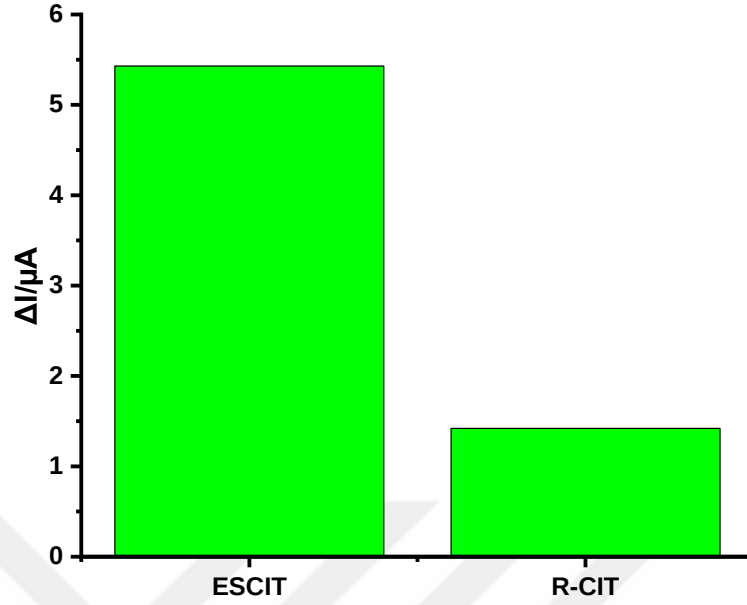
MIP tabanlı sensörlerde bir diğer önemli parametre, sensörün algılama süresi ve genel analitik performansı ile ilgili olduğu için inkübasyon süresinin optimize edilmesidir. İnkübasyon süresinin etkisini test etmek için; 5×10^{-11} M ESCIT inkübe edilerek ve 350 rpm Thermo Shaker ve 25 °C'de kullanılarak 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 dakika incelenmiştir. Şekil 6, ΔI_p değerlerinin 20 dakikaya kadar arttığını göstermektedir. 20 dakika sonra ΔI_p sürekli azaldı. Bu, 20 dakikalık inkübasyon süresinin ESCIT için en uygun bağlanma koşulunu sağladığını gösterir. Daha kısa inkübasyon sürelerinde MIP boşluklarının afinite ve bağlanma yeteneği yetersiz iken, daha uzun inkübasyon süreleri sensör veriminin düşmesine neden olmuştur.



Şekil 3.25. Farklı bağlanma sürelerine karşı 5×10^{-11} M ESCIT'in çıkarılmasından ve bağlanmasından sonra ΔI_p değerlerinin grafiği.

3.3.3. Geliştirilen sensörlerin seçiciliklerinin incelenmesi

Benzer bileşiklerle çapraz reaktivite ölçümleri yapıldı. Bu sonuçlar, geliştirilen sensörün ESCIT'a karşı büyük bir seçicilik gösterdiğini gösterdi. ESCIT/C1/EPI@MIP/CKE 'nin seçiciliği, ESCIT'ın benzer bileşik yapısının tepkisi ile değerlendirildi. ESCIT/C1/EPI@MIP/CKE sinyali, 5×10^{-11} M miktarda R-CIT gibi benzer bileşikler kullanılarak DPV sonucu ile karşılaştırıldı (Şekil 3.22.).



Şekil 3.26. ESCIT ve R-CIT gibi benzer bileşikler için IF değerlerinin değerlendirilmesi.

ESCIT/C1/EPI@MIP/CKE'nin seçiciliği, baskı faktörü (IF) kullanılarak değerlendirildi. MIP ve NIP sensörü ile ilgili DPV'nin $\Delta I(I-I_0)$ yanıtının oranı olarak belirlenir ve burada mevcut yanıtlar arasındaki farklara ait olan aşağıdaki denklem kullanılır.

$$E\check{G}ER = \Delta I(MIP) / \Delta I(NIP)$$

Burada, $\Delta I = I_0 - I$, burada I_0 ve I , sırasıyla ESOM'un çıkarılması ve bağlanmasında tasarlanan elektrotun tepe sinyalleridir. ESCIT/C1/EPI@MIP/CKE sensörü için elde edilen IF, ESCIT, R-CIT için sırasıyla 5.43 ve 1.42'dir. Bu sonuçlar, ESCIT/C1/EPI@MIP/CKE sensörünün ESCIT bileşikleriyle seçici olarak bağlanabileceğini onayladı.

3.3.4. Girişim etkisi

ESCIT/C1/EPI@MIP/CKE, dopamin, askorbik asit, Na^+ , SO_4^{2-} , parasetamol ve ürik asit gibi girişim maddeleri kullanılarak incelenmiştir. $I=I_m/I_o$ ve BSS (%) değerleri, girişim etkisi gösteren bileşenlerin 1:10 oranında ESCIT ile karıştırılmasıyla hesaplanmıştır. Çizelge 3.7'de verildiği gibi, bağıl hata değerleri %98.43 ile % 101.26 arasında elde edilmiştir. Önerilen ESCIT/C1/EPI@MIP/CKE sensörü, girişim ajanlarının yokluğunda tepe sinyaline neredeyse aynı şekilde uygulandı.

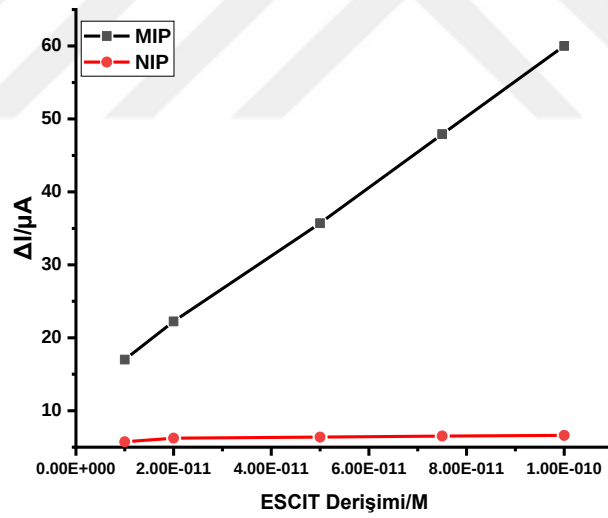
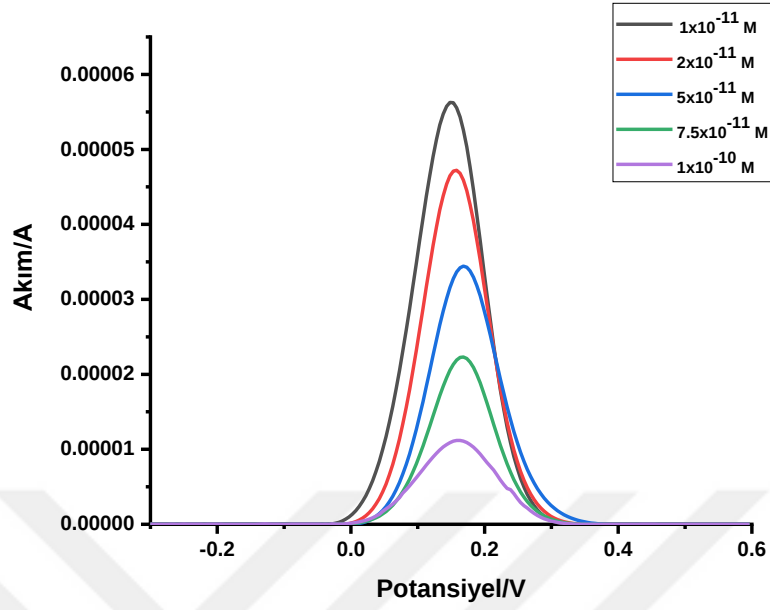
Çizelge 3.7. Girişim maddelerinin ESCIT'ın cevabı üzerindeki etkisi

Girişim maddeleri	$I=I_m/I_o$	Sinyaldeki bağıl hata (%)
DOP	101.26	0.78
AA	98.43	0.67
Na^+	99.56	0.56
SO_4^{2-}	100.03	0.42
PAR	100.96	0.72
UA	101.08	0.88

3.3.5. Sitalopram enantiyomerlerinin elektrokimyasal olarak tanınması

ESCIT'ın analitik eğrisi, ESCIT/C1/EPI@MIP/CKE'nin analitik performansını değerlendirmek için kullanıldı. ESCIT/C1/EPI@MIP/CKE'nin tepe sinyali, birkaç ESCIT derişiminin inkübasyonundan sonra redoks probu ile ilgili 0.16 V'ta anodik tepe akımı kullanılarak elde edildi.

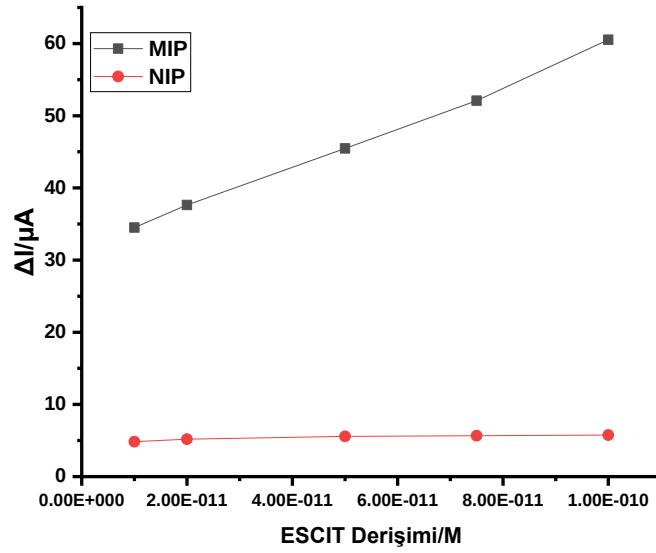
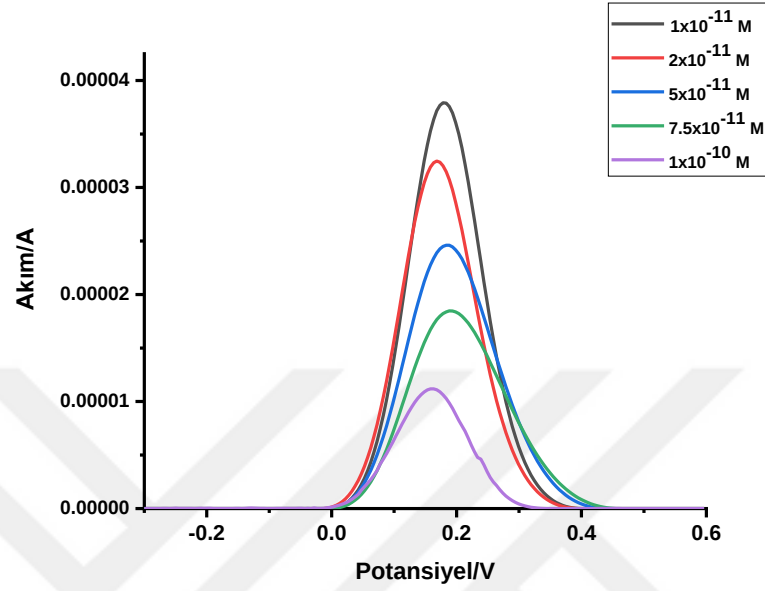
ΔI ve ESCIT derişimleri arasında aşağıdaki doğrusal regresyon denklemini sergileyen 1×10^{-11} ve 1×10^{-10} M arasında doğrusal bir ilişki bulundu: $\Delta I = 4.85 \times 10^{11} [\text{ESCIT}] + 11.56$, ($R^2 = 0.999$) (Şek. 3.23.).



Şekil 3.27. ESCIT'ın farklı derişimlerinin bağlanmasıyla ESCIT/C1/EPI@MIP/CKE 'nin DPV'si (A) ΔI ve ESCIT derişimleri arasında ESCIT/C1/EPI@MIP/CKE'nin ve NIP/CKE (B).

TS ve TAS sonuçları, doğrusal aralığın en düşük derişiminin kalibrasyon denkleminin eğimine(m) ve standart sapma(lar)ına dayanmaktadır. TS ve TAS sırasıyla 2.41×10^{-12} M ve 8.04×10^{-12} M'de bulundu. ESCIT farklı derişimlerinin

bağlanmasıyla ESCIT/C1/EPI@MIP/CKE'nin DPV'si şekil 3.23'da gösterilmiştir. DPV akımı, ESCIT molekülleri, daha yüksek bir ESCIT derişimi bağlandığında.



Şekil 3.28. ESCIT (A)'nın standart eklenmesiyle ESCIT/C1/EPI@MIP/CKE'nin DPV'si ve (1S'deki ΔI ve ESCIT derişimleri arasındaki doğrusal bir ilişki Eklenmiş serum örneklerinde ΔI ve ESCIT/C1/EPI@MIP/CKE ve NIP/CKE (B).

Geliştirilen MIP sensörünün karşılaştırılması için NIP sensörü kullanılmıştır. Şekil 9, ESCIT moleküllerinin tutulmamasının yorumlayabileceği, farklı ESCIT derişimleri bağlandığında ΔI değerlerinin neredeyse değişmeden kaldığını gösterir.

3.3.6. ESCIT/C1/EPI@MIP/CKE uygulamaları

Geliştirilen sensörün ticari serum numunelerinde ESCIT analizinde etkinliğini değerlendirmek için farmasötik tablet dozaj formları kullanılmıştır. Sonuçlar Çizelge 1'de rapor edilmiştir; elde edilen geri kazanım yüzdeleri, bu yöntemin gerçek numunelerde ESCIT'ı ölçme konusundaki yüksek kabiliyetini doğrulamaktadır. Ip ve C arasındaki büyük doğrusallık, LOD'ler (Çizelge 1) ve nicel ESCIT geri kazanımları (Çizelge 2) ile fark edildi. Şekil 10, ESCIT/C1/EPI@MIP/CKE ve NIP/CKE sensörlerinin pratik kullanımının, ticari serum numunelerinde standart ekleme tekniği kullanılarak ESOM derişiminin tanımlanmasıyla gerçekleştirildiğini göstermektedir. ESCIT/C1/EPI@MIP/CKE ve NIP/CKE, 1×10^{-11} - 1×10^{-10} M arasında değişen ESCIT derişimlerine sahip ticari serum örneklerine daldırıldı.

Çizelge 3.8. Standart çözelti ve serum numunelerinde ESCIT/C1/EPI@MIP/CKE sensörü ile ESCIT için elde edilen kalibrasyon eğrisine ait regresyon analizi sonuçları ve validasyon parametreleri

Parametreler	Standart çözelti	Ticari serum
Doğrusal çalışma aralığı, (M)	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-10}$	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-10}$
Eğim ($\mu A M^{-1}$)	4.84×10^{11}	2.86×10^{15}
Eğimin standart hatası	0.472	0.536
Kesişim (μA)	11.560	31.331
Kesişimin standart hatası	2.386	4.431
Korelasyon katsayısı	0.999	0.998
Teşhis sınırı (M)	2.41×10^{-12}	2.19×10^{-12}
Tayin alt sınırı (M)	8.04×10^{-12}	7.29×10^{-12}
Tekrarlanabilirlik (%BSS)*	0.389	0.209
Tekrar üretilebilirlik (%BSS)*	0.472	0.395

* Elde edilen %BSS değerlerinin ölçüm sayısı 5'tir.

Çizelge 2'de gösterildiği gibi, geri kazanımlar, farmasötik dozaj formlarında ve ticari serum numunelerinde sırasıyla %100.8 ve %100.6 ve bağıl standart sapma (BSS) %0.94 ve %0.75 olarak tespit edildi.

Çizelge 3.9. Ciprallex® tablet dozaj formundan ve eklenmiş ticari serum örneklerinden ESCIT için elde edilen analiz bulgularının sonuçları

Parametreler	Ciprallex®	Ticari serum
Etiket miktarı (mg)	10.00	–
Bulunan miktar (mg)	10.12	–
BSS %*	0.74	–
BH %	1.2	–
Eklenen miktar (mg)	5.00	5.00
Bulunan miktar (mg)	5.04	5.03
Geri kazanım (%)	100.8	100.6
BSS %*	0.94	0.75
BH %	0.8	0.6

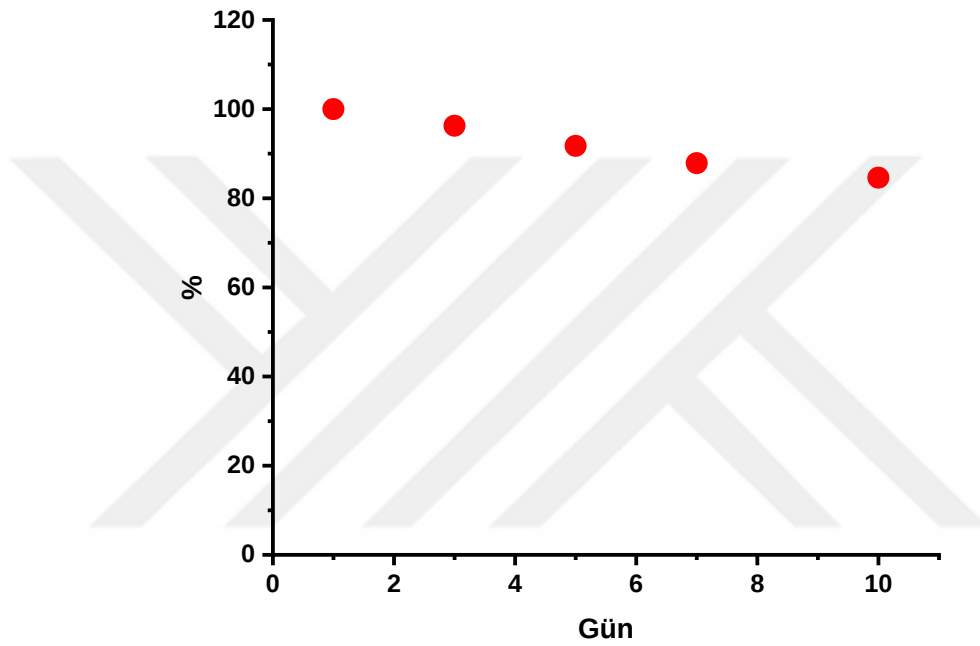
* Elde edilen %BSS değerlerinin ölçüm sayısı 5'tir.

3.3.7. Stabilité

Geliştirilen yöntemin tekrarlanabilirliğini belirlemek için kesinlik çalışmaları yapılmıştır. Tekrarlanabilirlik, beş tekrarlı belirleme için bir ESCIT/C1/EPI@MIP/CKE sensörü test edilerek değerlendirilmiştir. 1×10^{-11} M ESCIT beş ölçümü için BSS değeri % 0.389'dür.

Elektrotlar arası tekrar üretilebilirlik, 1×10^{-11} M ESCIT içine daldırılan beş farklı elektrotun yanıtı belirlenerek değerlendirilmiştir. Beş ardışık deney için BSS, sırasıyla %0.472'dir ve bu, tekrarlanabilirlik için kabul edilebilir üretimi gösterir.

Elektrodun stabilitesi, geniş bir zaman çerçevesinde 1, 3, 5, 7 ve 10 gün 1×10^{-11} M ESCIT ile sensörün akım cevabı ölçülerek araştırılmıştır. Geliştirilen sensörün stabilitesi 10 gün olarak bulunmuştur. Ölçümler arasında elektrot, bir 25 °C'de oda sıcaklığında saklandı. Mevcut yanıt 5 gün sonra %91.74'e düşerken, orijinal yanıtın %84.59'sı 10 gün sonra korunmuştur.



Şekil 3.29. ESCIT/C1/EPI@MIP/CKE sensörünün stabilite çalışması

4. TARTIŞMA

Doktora tezi kapsamında 3 farklı kiral ilaç etken maddesi (1S,2S)-PSDO, ESOM ve ESCIT için 3 farklı moleküler baskılama temelli elektrokimyasal kiral sensör geliştirilmiştir. Geliştirilen sensörlerin etkinliği ve doğruluğu birtakım elektrokimyasal, spektroskopik ve mikroskobik yöntemler kullanılarak test edilmiş ve validasyon çalışmaları yapılmıştır. (1S,2S)-PSDO, ESOM ve ESCIT ilaç etken maddelerinin farmasötik dozaj formlarından ve ticari serum numunelerinden analizleri başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

Giriş bölümünde kiralite ve kiral ilaçların öneminden bahsedilmiştir. Tez kapsamında kullanılan ilaç etken maddeleri hakkında bilgiler verilmiştir. Moleküler baskılama tekniğinin kullanılmasından dolayı, moleküler baskılama teknolojisi, moleküler baskılama yöntemleri ayrıntılı olarak açıklanmıştır. Bu tezde kullanılan elektrokimyasal yöntemler ayrıntılı olarak incelenmiştir. Takip edilen kısımlarda analitik yöntem validasyonu ayrıntılı bir şekilde anlatılmıştır.

Gereç ve yöntem kısmında tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler ve ekipmanlardan bahsedilmiştir. Tez çalışmasında kullanılan çözeltilerin hazırlanması ve kullanılan voltametrik yöntemler anlatılmıştır. Moleküler baskılama temelli elektrokimyasal kiral sensörlerin hazırlanışı ayrıntılı bir şekilde anlatılmış ve sonuçlar tezin bulgular bölümünde verilmiştir. Geliştirilen sensörlerin karakterizasyon sonuçları bulgular bölümünde verilmiştir.

Bütün çalışmalarda çalışma elektrotu olarak CKE kullanılmıştır. Tez kapsamında analiz edilen kiral ilaç etken maddeleri için, moleküler baskılama temelli kiral sensörler hazırlandıktan sonra akım cevabındaki değişimler DV ve DPV teknikleri kullanılarak ölçümler yapılmıştır. Bütün elektrokimyasal ölçümler, 5.0 mM

$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (1:1) ve 100 mM KCl içeren bir solüsyonda DPV yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

(1S,2S)-PSDO analizi için ilk kez MIP temelli elektrokimyasal kiral sensörü geliştirilmiş ve validasyon çalışmaları yapılmıştır. Fosfat tamponu (0.01 M, pH 7.4) içerisinde 1mM o-PD çözeltisi ve 1mM (1S,2S)-PSDO çözeltisi ile elektropolimerizasyon yöntemi ile -0.2 ve 0.8V DV ile arasında 50mV/s'lik bir tarama hızında 10 döngü sayısı ile polimerik yüzey oluşturulmuştur. Moleküler baskılama filmin optimizasyonu için monomer/hedef molekül oranının etkisi araştırılmış ve 1:1 oranı optimum olarak bulunmuştur. Hem polimer film kalınlığını hem de geliştirilmiş baskılı sensörün seçicilik, kararlılık ve hassasiyet gibi özelliklerine çok büyük etkisi olan DV döngü sayısı ve tarama hızı etkisi araştırılmıştır. 10 döngü sayısı elektropolimerizasyon için en uygun döngü sayısı olarak bulunmuştur. Elektropolimerizasyon için en uygun olan tarama hızının 50 mV/s olduğu bulunmuştur.

En önemli parametrelerden biri hedef molekülün polimerik film yüzeyinden desorpsiyon işlemidir. Polimerik film yüzeyine zarar vermeden yeterli uzaklaştırma işleminin gerçekleştirilebilmesi için desorpsiyon çözeltisi ve desorpsiyon için seçilen süre optimize edilmiştir. Etanol, diğer solüsyonlara kıyasla (1S,2S)-PSDO'nun etkin bir şekilde uzaklaştırılmasını sağladığı için desorpsiyon çözeltisi olarak kullanılmıştır. Desorpsiyon işlemi sonrasında elde edilen akım ile elektropolimerizasyon sonrası elde edilen akım arasındaki cevapta meydana gelen fark yüzeyde oluşan boşlukların varlığını doğrulamaktadır. Daha sonra, geliştirilen sensörün etanolde desorpsiyon süresi optimize edilmiştir. 5. dakikadan sonra akım cevabı azalmıştır ve 5 dakika optimum süre olarak seçilmiştir. Seçilen desorpsiyon çözeltisi ve süresinin polimerik filme zarar verip vermediği NIP ile kontrol edilerek doğrulanmıştır.

Geliştirilen sensörün analitik performansına etkisi çok önemli olduğu için bağlanma süresi optimize edilmiştir. Bağlanma süresinin kontrolü için farklı bağlanma sürelerinde bağlanma sonrası ve desorpsiyon sonrası akım cevabı arasındaki fark ile

kontrol edilmiştir. Bir manyetik karıştırıcı yardımıyla bağlanmanın 5 dakikaya kadar arttığı ve 5 dakikadan sonra bağlanmanın azaldığı gözlenmiştir. 5 dakika optimum bağlanma süresi olarak seçilmiştir.

En önemli validasyon parametrelerden biri olan sensörün seçiciliği, benzer moleküllerin akım cevabı ile araştırılmıştır. Özellikle kiral seçicilik için PSDO'nin diğer enantiyomeri olan R formu (1R,2R)-PSDO kullanılarak analiz yapılmıştır. Baskılama faktörü (1S,2S)-PSDO için 4.97 olarak bulunurken, (1R,2R)-PSDO için ise 1.51 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar geliştirilen sensörün (1S,2S)-PSDO'ye karşı yeterince seçici olduğunu doğrulamaktadır.

Sensörün seçiciliğini incelemek amacıyla (1S,2S)-PSDO 10 katı fazla derişimde DOP, AA, Na⁺, SO₄²⁻, PAR ve UA varlığında analiz edilmiş ve sinyaldeki değişim belirlenmiştir. Sonuçlar, sensörün (1S,2S)-PSDO'yi girişim yapması muhtemel maddelerin varlığında seçici bir şekilde tayin edebildiğini göstermektedir.

Geliştirilen sensörün farklı derişimlerde bağlanması ile (1S,2S)-PSDO miktar tayini yapılmıştır. 1×10^{-15} - 1×10^{-14} M derişim aralığında doğrusal bir grafik elde edilmiştir. Teşhis sınırı 2.98×10^{-16} M ve tayin alt sınırı 9.94×10^{-16} M olarak bulunmuştur.

Geliştirilen sensörlerin gerçek örneklere uygulanabilirliğini göstermek amacıyla, (1S,2S)-PSDO içeren farmasötik dozaj formlardan (1S,2S)-PSDO'nun tayini yapılmıştır. Ticari serum numunelerine ilave etme yöntemi ile (1S,2S)-PSDO içeren numuneler hazırlanmış ve geri kazanım çalışmaları bu numuneler ile de yapılmıştır.

Geliştirilen moleküler baskılama temelli kiral sensörün (1S,2S)-PSDO'ye karşı tekrarlanabilirliğini araştırmak amacıyla, (1S,2S)-PSDO aynı sensör ile beş defa analiz edilmiş ve tekrarlanabilirliğin ölçütü olarak pik akımlarının % bağıl standart sapması % 0.648 olarak hesaplanmıştır. Sensörün tekrar üretilebilirliğini araştırmak amacıyla

(1S,2S)-PSDO, beş farklı sensör ile analiz edilmiş ve yeniden üretilebilirliğin ölçütü olarak pik akımlarının % bağıl standart sapması %0.99 olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar geliştirilen sensörün (1S,2S)-PSDO'nun elektrokimyasal tayini için tekrarlanabilir olduğunu göstermektedir.

ESOM analizi için ilk kez MIP temelli elektrokimyasal kiral sensörü geliştirilmiş ve validasyon çalışmaları yapılmıştır. Moleküler baskılanmış gözenekli polimerik film aşağıdaki gibi üretilmiştir: ön-polimerizasyon ESOM: β -CD (1:1 mol, 0.04 mL) kompleksi, CTAB (0.045 mmol, 0.02 mL) ve NH_4OH (0.02 mL) içeren bir çözelti 15 dakika oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Bu çözeltiye TEOS: EtOH (0.45 mmol, 0.02 mL) (1:1) ilave edilmiştir. Bu çözeltiden 3.0 μL 'lik bir kısım CKE yüzeyine damlatılmış ve etüvde (50 °C) 30 dakika polimerizasyon yapılmıştır.

Moleküler baskılanmış filmin optimizasyonu için en önemli parametrelerden biri hedef molekülün polimerik film yüzeyinden desorpsiyon işlemidir. Polimerik film yüzeyine zarar vermeden yeterli uzaklaştırma işleminin gerçekleştirilebilmesi için desorpsiyon çözeltisi ve desorpsiyon için seçilen süre optimize edilmiştir. 10M asetik asit çözeltisi, diğer solüsyonlara kıyasla ESOM'un etkin bir şekilde uzaklaştırılmasını sağladığı için desorpsiyon çözeltisi olarak kullanılmıştır. Desorpsiyon işlemi sonrası ile elektropolimerizasyon sonrası arasındaki akım cevabında meydana gelen fark yüzeyde oluşan boşlukların varlığını doğrulamaktadır. Daha sonra, geliştirilen sensörün 10M asetik asitte desorpsiyon süresi optimize edilmiştir. 15. dakikadan sonra akım cevabı azalmıştır ve 15 dakika optimum süre olarak seçilmiştir. Seçilen desorpsiyon çözeltisi ve süresinin polimerik filme zarar verip vermediği NIP ile kontrol edilerek doğrulanmıştır.

Geliştirilen sensörün analitik performansına etkisi çok önemli olduğu için bağlanma süresi optimize edilmiştir. Bağlanma süresinin kontrolü için farklı bağlanma sürelerinde bağlanma sonrası ve desorpsiyon sonrası akım cevabı arasındaki fark ile kontrol edilmiştir. Bir manyetik karıştırıcı yardımıyla bağlanmanın 15 dakikaya kadar

arttığı ve 15 dakikadan sonra bağlanmanın azaldığı gözlenmiştir. 15 dakika optimum bağlanma süresi olarak seçilmiştir.

En önemli validasyon parametrelerden biri olan sensörün seçiciliği, benzer moleküllerin akım cevabı ile araştırılmıştır. Özellikle kiral seçicilik için ESOM'un diğer enantiyomeri olan R formu R-OM kullanılarak analiz yapılmıştır. Baskılama faktörü ESOM için 5.81 olarak bulunurken, R-OM için ise 1.33 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar geliştirilen sensörün ESOM'e karşı yeterince seçici olduğunu doğrulamaktadır.

Sensörün seçiciliğini incelemek amacıyla ESOM 10 katı fazla derişimde DOP, AA, Na⁺, SO₄²⁻, PAR ve UA varlığında analiz edilmiş ve sinyaldeki değişim belirlenmiştir. Sonuçlar, sensörün ESOM'u girişim yapması muhtemel maddelerin varlığında seçici bir şekilde tayin edebildiğini göstermektedir.

Geliştirilen sensörün farklı derişimlerde bağlanması ile ESOM tayini yapılmıştır. 1×10^{-14} - 2×10^{-13} M derişim aralığında doğrusal bir grafik elde edilmiştir. Teşhis sınırı 1.89×10^{-15} M ve tayin alt sınırı 6.32×10^{-15} M olarak bulunmuştur.

Geliştirilen sensörlerin gerçek örneklerle uygulanabilirliğini göstermek amacıyla, ESOM içeren farmasötik dozaj formalardan ESOM'un tayini yapılmıştır. Ticari serum numunelerine ilave etme yöntemi ile ESOM içeren numuneler hazırlanmış ve geri kazanım çalışmaları bu numuneler ile de yapılmıştır.

Geliştirilen moleküler baskılama temelli kiral sensörün ESOM'e karşı tekrarlanabilirliğini araştırmak amacıyla, ESOM aynı sensör ile beş defa analiz edilmiş ve tekrarlanabilirliğin ölçütü olarak pik akımlarının % bağıl standart sapması % 0.328 olarak hesaplanmıştır. Sensörün tekrar üretilebilirliğini araştırmak amacıyla ESOM, beş farklı sensör ile analiz edilmiş ve yeniden üretilebilirliğin ölçütü olarak pik akımlarının % bağıl standart sapması %0.524 olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar geliştirilen sensörün ESOM'un elektrokimyasal tayini için tekrarlanabilir olduğunu

göstermektedir. Geliştirilen sensörün stabilitesi 10 gün boyunca test edilmiş ve 10 gün sonra orijinal yanıtın %86.56'sı elde edilmiştir.

ESCIT analizi için ilk kez MIP temelli elektrokimyasal kiral sensör geliştirilmiş ve validasyon çalışmaları yapılmıştır. Moleküler baskılı polimerik film aşağıdaki gibi üretilmiştir: ESCIT:C1 (1:1 v/v) kompleksi, % 0.5 EPI (10 µL) içeren bir çözelti 1 dakika oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Bu çözeltiden 1.0 µL'lik bir kısım CKE yüzeyine damlatılmıştır. Etüvde (50 °C) 10 dakika polimerizasyon yapılmıştır.

Moleküler baskılı filmin optimizasyonu için en önemli parametrelerden biri hedef molekülün polimerik film yüzeyinden desorpsiyon işlemidir. Polimerik film yüzeyine zarar vermeden yeterli uzaklaştırma işleminin gerçekleştirilebilmesi için desorpsiyon çözeltisi ve desorpsiyon için seçilen süre optimize edilmiştir. 10M asetik asit çözeltisi, diğer solüsyonlara kıyasla ESCIT'in etkin bir şekilde uzaklaştırılmasını sağladığı için desorpsiyon çözeltisi olarak kullanılmıştır. Desorpsiyon işlemi sonrası ile elektropolimerizasyon sonrası arasındaki akım cevabında meydana gelen fark yüzeyde oluşan boşlukların varlığını doğrulamaktadır. Daha sonra, geliştirilen sensörün 10M asetik asitte desorpsiyon süresi optimize edilmiştir. 45. dakikadan sonra akım cevabı azalmıştır ve 45 dakika optimum süre olarak seçilmiştir. Seçilen desorpsiyon çözeltisi ve süresinin polimerik filme zarar verip vermediği NIP ile kontrol edilerek doğrulanmıştır.

Geliştirilen sensörün analitik performansına etkisi çok önemli olduğu için bağlanma süresi optimize edilmiştir. Bağlanma süresinin kontrolü için farklı bağlanma sürelerinde bağlanma sonrası ve desorpsiyon sonrası akım cevabı arasındaki fark ile kontrol edilmiştir. Bir manyetik karıştırıcı yardımıyla bağlanmanın 20 dakikaya kadar arttığı ve 20 dakikadan sonra bağlanmanın azaldığı gözlenmiştir. 20 dakika optimum bağlanma süresi olarak seçilmiştir.

En önemli validasyon parametrelerinden biri olan sensörün seçiciliği, benzer moleküllerin akım cevabı ile araştırılmıştır. Özellikle kiral seçicilik için ESCIT'ın

diğer enantiyomeri olan R formu R-OM kullanılarak analiz yapılmıştır. Baskılama faktörü ESCIT için 5.43 olarak bulunurken, R-CIT için ise 1.42 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar geliştirilen sensörün ESCIT'a karşı yeterince seçici olduğunu doğrulamaktadır.

Sensörün seçiciliğini incelemek amacıyla ESCIT 10 katı fazla derişimde DOP, AA, Na⁺, SO₄²⁻, PAR ve UA varlığında analiz edilmiş ve sinyaldeki değişim belirlenmiştir. Sonuçlar, sensörün ESCIT'ı girişim yapması muhtemel maddelerin varlığında seçici bir şekilde tayin edebildiğini göstermektedir.

Geliştirilen sensörün farklı derişimlerinde bağlanması ile ESCIT tayini yapılmıştır. 1×10^{-11} - 1×10^{-10} M derişim aralığında doğrusal bir grafik elde edilmiştir. Teşhis sınırı 2.41×10^{-12} M ve tayin alt sınırı 8.04×10^{-12} M olarak bulunmuştur.

Geliştirilen sensörlerin gerçek örneklere uygulanabilirliğini göstermek amacıyla, ESCIT içeren farmasötik dozaj formlardan ESCIT'ın tayini yapılmıştır. Ticari serum numunelerine ilave etme yöntemi ile ESCIT içeren numuneler hazırlanmış ve geri kazanım çalışmaları bu numuneler ile de yapılmıştır.

Geliştirilen moleküler baskılama temelli kiral sensörün ESCIT'e karşı tekrarlanabilirliğini araştırmak amacıyla, ESCIT aynı sensör ile beş defa analiz edilmiş ve tekrarlanabilirliğin ölçütü olarak pik akımlarının % bağıl standart sapması % 0.39 olarak hesaplanmıştır. Sensörün tekrar üretilebilirliğini araştırmak amacıyla ESCIT, beş farklı sensör ile analiz edilmiş ve yeniden üretilebilirliğin ölçütü olarak pik akımlarının % bağıl standart sapması %0.47 olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar geliştirilen sensörün ESCIT'un elektrokimyasal tayini için tekrarlanabilir olduğunu göstermektedir. Geliştirilen sensörün stabilitesi 10 gün boyunca test edilmiş ve 10. gün orijinal yanıtın %84.59'sı elde edilmiştir.

Sonuç olarak, kiral ilaç etken maddeleri olan (1S,2S)-PSDO, ESOM ve ESCIT elektrokimyasal olarak tayini için moleküler baskılama temelli elektrokimyasal kiral

sensör geliştirilmiş ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen kiral sensör kullanılarak (1S,2S)-PSDO, ESOM ve ESCIT için ayrı ayrı hızlı, hassas, tekrarlanabilir, herhangi bir ön ayırım gerektirmeyen, kolay uygulanabilir ve ilaç analizlerinde yaygın olarak kullanılan ve diğer analiz yöntemlerine kıyasla daha düşük maliyetli elektrokimyasal analiz yöntemleri geliştirilmiş, geliştirilen yöntemler valide edilmiştir. Bu özellikleri göz önüne alındığında, geliştirilen analiz yöntemlerinin, (1S,2S)-PSDO, ESOM ve ESCIT rutin analizleri ve klinik analizleri için alternatif yöntemler olabileceği düşünülmektedir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Doktora çalışmamız kapsamında, (1S,2S)-PSDO, ESOM ve ESCIT enantiyomerlerinin farmasötik dozaj formlarında ve ticari serum numunelerinde analizi için kiral bileşik enantiyomerlerinin analizi için MIP temelli elektrokimyasal kiral sensör geliştirilmesi ve geliştirilen bu kiral sensör kullanılarak elektroanalitik yöntemler geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu hedefler doğrultusunda geliştirilecek sensörün analitik uygulamalar sırasında hızlı, seçici, duyarlı, stabil, pratik olması ve kolayca üretilmesi amaçlanmıştır.

(1S,2S)-PSDO@MIP/CKE, (1S,2S)-PSDO'nun farmasötik dozaj formunda ve ticari serum numunelerinde belirlenmesi için geliştirilen ilk MIP temelli elektrokimyasal kiral sensördür. Önerilen sensör, (1S,2S)-PSDO varlığında ortofenilendiamin (o-PD) monomerinin elektropolimerizasyonu ile hazırlanmıştır. Her adım, diferansiyel puls voltametri (DPV) ve dönüşümlü voltametri (DV) teknikleri kullanılarak redoks işaretçisi $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ ile izlenmiştir. (MIP) ile geliştirilen sensör yüzeylerinin karakterizasyonu, taramalı elektron mikroskobu (SEM), Raman spektroskopisi ve temas açısı ölçümleri kullanılarak yapılmıştır. Elektrokimyasal karakterizasyon çalışmaları, elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) tekniği ve DV ile gerçekleştirilmiştir. Önerilen MIP temelli elektrokimyasal kiral sensör ile (1S,2S)-PSDO'nun analiz süresi oldukça kısadır. Ayrıca (1S,2S)-PSDO benzeri maddeler, MIP tabanlı elektrokimyasal sensörün seçiciliğini incelemek için uygulanmıştır. Önerilen (1S,2S)-PSDO@MIP/CKE sensörü, standart çözelti ve ticari serum numunesi için sırasıyla 2.98×10^{-16} M ve 3.01×10^{-16} M çok düşük teşhis sınırı (TS) elde edilmiştir. Geliştirilen sensörün hassasiyetinin çok yüksek olduğu bulunmuştur. Önerilen MIP sensörü, geleneksel tekniklere göre umut verici bir alternatif tekniktir.

ESOM'un hassas ve seçici tespiti için MIP temelli yeni bir elektrokimyasal kiral sensör önerilmiştir. Sensör, CKE üzerinde amonyum hidroksit varlığında β -CD, TEOS ve CTAB kullanılarak hazırlandı. Redoks işaretçisi $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ kullanılarak hedef ESOM'un çıkarılması ve bağlanmasıyla ilgili MIP katmanındaki değişiklikleri

gözlemlemek için DPV ve DV teknikleri kullanıldı. Kontrol için, aynı koşullar altında hedef molekül ESOM içermeyen (NIP) bir polimer yüzeyi de üretildi. MIP ile geliştirilen sensör yüzeylerinin karakterizasyonu, elektrokimyasal karakterizasyon çalışmaları, EIS ve DV ile gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen sensörün doğrusallık aralığı ve algılama sınırı sırasıyla 1.0×10^{-14} – 2.0×10^{-13} M ve 1.9×10^{-15} M olarak elde edilmiştir. Geliştirilen yöntem, gözenekli malzeme üreterek bağlanma bölgelerinin erişilebilirliğini sağladı. Geliştirilen ESOM/ β -CD/TEOS/CTAB@MIP/CKE sensörünün seçicilik testleri, diğer benzer moleküllere kıyasla ESOM enantiyomerlerine karşı yüksek bir seçicilik gösterdi. Ek olarak, önerilen sensör, tabletlerde ve ticari serum numunelerinde iyi bir geri kazanım yüzdesi ile ESOM'u belirlemek için başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Yapılan stabilite çalışması sonucunda geliştirilen sensörün stabilitesi 10. gün sonunda %86.56'sı olarak bulunmuştur.

ESCIT tespiti için ilk MIP temelli bir elektrokimyasal kiral sensör, CKE üzerinde % 0.5 EPI varlığında ESCIT:C1 (1:1 v/v) kompleksi kullanılarak etüvde (50 °C)'de hazırlanmıştır. Aynı koşullar altında kontrol için, hedef molekül ESOM içermeyen NIP polimer yüzeyi de üretildi. MIP ile geliştirilen sensör yüzeylerinin elektrokimyasal karakterizasyon çalışmaları, EIS ve DV teknikleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen sensörün elektrokimyasal karakterizasyon çalışmaları, EIS ve DV yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen sensörün doğrusal çalışma aralığı ve teşhis sınırı sırasıyla 1.0×10^{-11} – 2.0×10^{-10} M ve 2.41×10^{-12} M olarak DPV tekniği kullanılarak elde edilmiştir. Geliştirilen ESCIT/EPI/C1@MIP/CKE sensörü, 4,97 baskı faktörü ile R-CIT'a karşı mükemmel bir seçiciliğe sahiptir. Önerilen sensör, tabletlerde ve ticari serum numunelerinde iyi bir geri kazanım yüzdesi ile ESOM'u belirlemek için başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Yapılan stabilite çalışması sonucunda geliştirilen sensörün stabilitesi 10 gün sonunda %84.59'sı olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak, doktora çalışmaları kapsamında çok önemli kiral ilaç etken maddelerinden (1S,2S)-PSDO, ESOM ve ESCIT enantiyomerlerinin farmasötik dozaj

formlarında ve ticari serum numunelerinde tayini için geliştirilen moleküler baskılama temelli elektrokimyasal kiral sensörün ilaçların rutin ve klinik analizlerinde alternatif olarak kullanılabileceği tarafımızca ön görülmektedir.



ÖZET

Kiral bileşiklerin enantiyomerlerinin analizi için elektrokimyasal sensör geliştirilmesi

Tez çalışmasında, kiral ilaç etken maddelerinden (1S,2S)-psödoefedrin ((1S,2S)-PSDO), esomeprazol (ESOM) ve essitalopram'ın (ESCIT) seçici ve hassas analizine yönelik moleküler baskılama temelli elektrokimyasal kiral sensör geliştirilmiştir. Elektrokimyasal ölçümler, 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (1:1) ve 0.1 M KCl içeren bir çözelti içinde bir NIP ve MIP üzerinde DPV yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

(1S,2S)-PSDO tespiti için ilk kez elektropolimerizasyon tekniği ile fonksiyonel bir monomer olarak o-fenilendiamin (o-PD) ile MIP temelli elektrokimyasal kiral sensörleri geliştirilmiştir. Geliştirilen sensörlerin yüzeylerinin karakterizasyonu, elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS), döngüsel voltametri (DV), Raman spektrometresi, temas açısı ölçümleri ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile gerçekleştirilmiştir. (1S,2S)-PSDO@MIP/CKE sensörünün analitik performansını değerlendirmek için diferansiyel puls voltametri (DPV) kullanıldı. (1S,2S)-PSDO'nun doğrusal çalışma aralığı, farmasötik dozaj formunda ve ticari serum örneğinde 1×10^{-15} - 1×10^{-14} M aralığında elde edildi. Geliştirilen (1S,2S)-PSDO@MIP/CKE sensörü, 4,97 baskı faktörü ile (1R,2R)-PSDO'ya karşı mükemmel bir seçiciliğe sahiptir.

ESOM tespiti için MIP temelli bir elektrokimyasal kiral sensör, CKE üzerinde amonyum hidrosit varlığında β -siklodekstrin (β -CD), tetraetil ortosilikat (TEOS) ve setiltrimetilamonyum bromür (CTAB) kullanılarak hazırlanmıştır. Geliştirilen sensörün elektrokimyasal karakterizasyon çalışmaları, EIS ve DV ile gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen sensörün doğrusal çalışma aralığı ve teşhis sınırı sırasıyla 1.0×10^{-14} - 2.0×10^{-13} M ve 1.9×10^{-15} M olarak DPV kullanılarak elde edilmiştir. Geliştirilen yöntem ile gözenekli malzeme kullanarak bağlanma bölgelerinin erişilebilirliği artırıldı. Geliştirilen ESOM/ β -CD/TEOS/CTAB@MIP/CKE sensörünün seçicilik testleri, diğer benzer moleküllere kıyasla ESOM'e karşı mükemmel bir seçicilik gösterdi.

ESCIT tespiti için MIP temelli bir elektrokimyasal kiral sensör, CKE üzerinde % 0.5 EPI varlığında ESCIT:C1 (1:1 v/v) kompleksi kullanılarak etüvde (50 °C) hazırlandı. Geliştirilen sensörün elektrokimyasal karakterizasyon çalışmaları, EIS ve DV ile gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen sensörün doğrusal çalışma aralığı ve teşhis sınırı sırasıyla 1.0×10^{-14} - 2.0×10^{-13} M ve 1.9×10^{-15} M olarak DPV kullanılarak elde edilmiştir. Geliştirilen ESCIT/EPI/C1@MIP/CKE sensörü, 4,97 baskı faktörü ile (1R,2R)-PSDO'ya karşı mükemmel bir seçiciliğe sahiptir.

Geliştirdiğimiz MIP temelli elektrokimyasal kiral sensörlerin uygulanabilirliği, etken maddelere benzer moleküller kullanılarak gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar, geliştirdiğimiz elektrokimyasal sensörlerin önerilen hedef ilaç etken maddelerin seçici ve hassas tayinlerinde kullanılabilecek alternatif yöntemler olduğunu ispatlamaktadır.

Anahtar Sözcükler: Elektrokimyasal kiral sensör, Esomeprazol, Essitalopram, Moleküler baskılama , (1S,2S)-Psödoefedrin

SUMMARY

Development of electrochemical sensors for analysis of chiral compounds enantiomers

In the thesis study, molecular imprinting based electrochemical chiral sensor was developed for the selective and sensitive analysis of chiral drug active substances (1S,2S)-pseudoephedrine ((1S,2S)-PSDO), esomeprazole (ESOM) and escitalopram (ESCIT). Electrochemical measurements were performed by DPV method on a NIP and MIP in a solution containing 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (1:1) and 0.1 M KCl.

For the detection of (1S,2S)-PSDO, MIP-based electrochemical chiral sensors were developed for the first time with o-phenylenediamine (o-PD) as a functional monomer by electropolymerization technique. The surface characterization of the developed sensors was performed with electrochemical impedance spectroscopy (EIS), cyclic voltammetry (CV), Raman spectrometry, contact angle measurements, and scanning electron microscopy (SEM). In addition, differential pulse voltammetry (DPV) was used to evaluate the analytical performance of the (1S,2S)-PSDO@MIP/CKE sensor. The linear working range of (1S,2S)-PSDO was obtained in the pharmaceutical dosage form and the synthetic serum sample in the range of 1×10^{-15} - 1×10^{-14} M. The developed (1S,2S)-PSDO@MIP/CKE sensor showed excellent selectivity against (1R,2R)-PSDO with an imprinted factor of 4.97.

A MIP-based electrochemical chiral sensor for ESOM detection was prepared using β -cyclodextrin (β -CD), tetraethyl orthosilicate (TEOS), and cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) in the presence of ammonium hydroxide on CKE. Electrochemical characterization studies of the developed sensor were performed with EIS and CV. The linear range and limit of detection of the developed sensor were obtained using DPV as 1.0×10^{-14} – 2.0×10^{-13} M and 1.9×10^{-15} M, respectively. With the developed method, the accessibility of the binding sites was increased by using porous material. Selectivity tests of the developed ESOM/ β -CD/TEOS/CTAB@MIP/CKE sensor showed excellent selectivity towards ESOM compared to other similar molecules.

For ESCIT detection, a MIP-based electrochemical chiral sensor was prepared in an oven (50 °C) using the ESCIT:C1 (1:1 v/v) complex in the presence of 0.5% EPI on CKE. Electrochemical characterization studies of the developed sensor were performed with EIS and DV. The linear operating range and diagnostic limit of the developed sensor were obtained using DPV as 1.0×10^{-11} – 1.0×10^{-10} M and 1.9×10^{-12} M, respectively. The developed ESCIT/EPI/C1@MIP/CKE sensor has excellent selectivity against ESCIT compared to other similar molecules.

The applicability of the MIP-based electrochemical chiral sensors we have developed has been demonstrated by using molecules similar to active substances. The results obtained prove that the electrochemical sensors we have developed are alternative methods that can be used in the selective and sensitive determination of the proposed target drug active substances.

Keywords: Electrochemical chiral sensor, Esomeprazole, Escitalopram, Molecular imprinting, (1S,2S)-Pseudoephedrine

KAYNAKLAR

- AHMAD, OS, BEDWELL, TS, ESEN, C, GARCIA-CRUZ, A, PILETSKY, SA (2019) Molecularly Imprinted Polymers in Electrochemical and Optical Sensors. *Trends Biotechnol.*, **37**: 294–309.
- AHMED, H, WAHBI, AA, ELMONGY, H, AMINI, A, KOYI, H, BRANDEN, E, ABDEL-REHIM, M (2021) Determination and Pharmacokinetics of Omeprazole Enantiomers in Human Plasma and Oral Fluid Utilizing Microextraction by Packed Sorbent and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Int. J. Anal. Chem.*, **2021**.. doi:10.1155/2021/8845139.
- ALEXANDER, C, ANDERSSON, HS, ANDERSSON, LI, ANSELL, RJ, KIRSCH, N, NICHOLLS, IA, O'MAHONY, J, WHITCOMBE, MJ (2006) Molecular imprinting science and technology: A survey of the literature for the years up to and including 2003. *J. Mol. Recognit.*, **19**: 106–180.
- ALTSHULER, O, ABU-ABIED, M, CHAIMOVITSH, D, SHECHTER, A, FRUCHT, H, DUDAI, N, SADOT, E (2013) Enantioselective effects of (+)- and (-)-citronellal on animal and plant microtubules. *J. Nat. Prod.*, **76**: 1598–1604.
- ANDERSSON, T (2004) Single-isomer drugs: True therapeutic advances. *Clin. Pharmacokinet.*, **43**: 279–285.
- ANSELL, RJ (2015) Characterization of the Binding Properties of Molecularly Imprinted Polymers. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **150**: 51–93.
- ANSELL, RJ (2005) Molecularly imprinted polymers for the enantioseparation of chiral drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **57**: 1809–1835.
- ANSELL, RJ, MOSBACH, K (1997) Molecularly imprinted polymers by suspension polymerisation in perfluorocarbon liquids, with emphasis on the influence of the porogenic solvent. *J. Chromatogr. A*, **787**: 55–66.
- ATTIA, AK, MOHAMED, MA, FEKRY, AM (2017) Electroanalytical Determination of Escitalopram Oxalate Using Nickel Nanoparticles Modified Carbon Paste Sensor. *Acta Chim. Slov.*, **64**: 415–421.
- BAGOTSKY, VS (2006) Fundamentals of Electrochemistry, 2nd Edition. *Fundam. Electrochem.*,: 51–60.
- BAHRANI, S, ASLANI, R, HASHEMI, SA, MOUSAVI, SM, GHAEDI, M (2021) Introduction to molecularly imprinted polymer. *Interface Sci. Technol.*, **33**: 511–556.
- BARD, AJ, FAULKNER, LR (2001) Basic Potential Step Methods. *Electrochem. Methods Fundam. Appl.*,: 156–225.
- BELUOMINI, MA, DA SILVA, JL, SEDENHO, GC, STRADIOTTO, NR (2017) D-mannitol sensor based on molecularly imprinted polymer on electrode modified with reduced graphene oxide decorated with gold nanoparticles. *Talanta*, **165**: 231–239.
- BENTLEY, R (2006) The Nose as a Stereochemist. Enantiomers and Odor. *Chem. Rev.*, **106**: 4099–4112.
- BOND, AM (Alan M (1980) Modern polarographic methods in analytical chemistry. 518.

- BRETT, CMA, BRETT, AMO (1993) Electrochemistry : principles, methods, and applications. 427.
- BUDĂU, M, HANCU, G, MUNTEAN, DL, PAPP, LA, CÂRJE, AG, GARAJ, V (2020) Enantioseparation of citalopram enantiomers by capillary electrophoresis: Method development through experimental design and computational modeling. *Chirality*, **32**: 1119–1128.
- ÇAKIR, P, CUTIVET, A, RESMINI, M, BUI, BTS, HAUPT, K (2013) Protein-size molecularly imprinted polymer nanogels as synthetic antibodies, by localized polymerization with multi-initiators. *Adv. Mater.*, **25**: 1048–1051.
- CHANKVETADZE, B (2013) Liquid Chromatographic Separation of Enantiomers. *Liq. Chromatogr. Appl.*,: 75–91.
- CHANKVETADZE, B (2012) Recent developments on polysaccharide-based chiral stationary phases for liquid-phase separation of enantiomers. *J. Chromatogr. A*, **1269**: 26–51.
- CHEN, L, WANG, X, LU, W, WU, X, LI, J (2016) Molecular imprinting: perspectives and applications. *Chem. Soc. Rev.*, **45**: 2137–2211.
- CHEN, L, XU, S, LI, J (2011) Recent advances in molecular imprinting technology: current status, challenges and highlighted applications. *Chem. Soc. Rev.*, **40**: 2922–2942.
- CHEN, L, YANG, P, JI, Y (2014) Chiral separation of esomeprazole and its enantiomer by affinity capillary elec trophoresis. *J. China Pharm. Univ.*, **45**: 444–449.
- CHEN, Q, SHI, W, CHENG, M, LIAO, S, ZHOU, J, WU, Z (2018) Molecularly imprinted photonic hydrogel sensor for optical detection of L-histidine. *Microchim. Acta*, **185**: 1–9.
- CHHABRA, N, ASERI, ML, PADMANABHAN, D (2013) A review of drug isomerism and its significance. *Int. J. Appl. Basic Med. Res.*, **3**: 16.
- DONG, W, YAN, M, LIU, Z, WU, G, LI, Y (2007) Effects of solvents on the adsorption selectivity of molecularly imprinted polymers: Molecular simulation and experimental validation. *Sep. Purif. Technol.*, **53**: 183–188.
- DUAN, D, YANG, H, DING, Y, LI, L, MA, G (2019) A three-dimensional conductive molecularly imprinted electrochemical sensor based on MOF derived porous carbon/carbon nanotubes composites and prussian blue nanocubes mediated amplification for chiral analysis of cysteine enantiomers. *Electrochim. Acta*, **302**: 137–144.
- ENGEL, KH (2020) Chirality: An Important Phenomenon Regarding Biosynthesis, Perception, and Authenticity of Flavor Compounds. *J. Agric. Food Chem.*, **68**: 10265–10274.
- GAL, J (2011) Louis Pasteur, language, and molecular chirality. I. Background and Dissymmetry. *Chirality*, **23**: 1–16.
- GANDHI, K, SHAH, U, PATEL, S (2020) Drug Stereochemistry: A Prodigy For Pharmacology and Drug Development. *Curr. Drug Discov. Technol.*, **17**: 565–573.
- GERLACH, H (2013) Chirality: A Relational Geometric-Physical Property. *Chirality*, **25**: 684–685.

- GOLKER, K, NICHOLLS, IA (2016) The effect of crosslinking density on molecularly imprinted polymer morphology and recognition. *Eur. Polym. J.*, **75**: 423–430.
- GUSELNIKOVA, O, LIM, H, NA, J, EGUCHI, M, KIM, HJ, ELASHNIKOV, R, POSTNIKOV, P, SVORCIK, V, SEMYONOV, O, MILIUTINA, E, LYUTAKOV, O, YAMAUCHI, Y (2021) Enantioselective SERS sensing of pseudoephedrine in blood plasma biomatrix by hierarchical mesoporous Au films coated with a homochiral MOF. *Biosens. Bioelectron.*, **180**: 113109.
- HANCU, G, PAPP, LA, RUSU, A (2015) Chiral Separation of the Enantiomers of Omeprazole and Pantoprazole by Capillary Electrophoresis. *Chromatographia*, **78**: 279–284.
- HAUPT, D (1996) Determination of citalopram enantiomers in human plasma by liquid chromatographic separation on a Chiral-AGP column. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, **685**: 299–305.
- HAUPT, K, MOSBACH, K (2000) Molecularly Imprinted Polymers and Their Use in Biomimetic Sensors. *Chem. Rev.*, **100**: 2495–2504.
- HU, Y, PAN, J, ZHANG, K, LIAN, H, LI, G (2013) Novel applications of molecularly-imprinted polymers in sample preparation. *TrAC Trends Anal. Chem.*, **43**: 37–52.
- HUBER, L (2003) Validation of analytical methods and processes. *Pharm. Process Valid. An Int. An Int. Third Ed. Revis. Expand.*,: 507–524.
- ISLAM, MR, MAHDI, JG, BOWEN, ID (1997) Pharmacological importance of stereochemical resolution of enantiomeric drugs. *Drug Saf.*, **17**: 149–165.
- IVIĆ, MA, LOVIĆ, J, STEVANOVIĆ, S, NIKOLIĆ, ND, TRIŠOVIĆ, N, LAĐAREVIĆ, J, VUKOVIĆ, D, DRMANIĆ, S, MLADENOVIĆ, A, JADRANIN, M, PETROVIĆ, SD, MIJIN, D (2019) Electrochemical behavior of esomeprazole: Its determination at Au electrode as standard and in injection powder combined with the study of its degradation. **848**.. doi:10.1016/J.JELECHEM.2019.113303.
- IWANICKI, RM, MAIER, K, ZLOTNICK, JA, LIU, RH, KUO, T-L, TAGLIARO, F (1999) Separation of Enantiomeric Ephedrine and Pseudoephedrine—High Pressure Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis. *J. Forensic Sci.*, **44**: 14496J.
- JAIN, R, DHANJAI, SHARMA, S (2013) Bismuth (III) oxide/glassy carbon sensor for sensing of antidepressant drug escitalopram in micellar media. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, **436**: 178–184.
- JAIN, V, SHAH, VK, JAIN, PK (2019) HPLC Method Development and Validation for the Estimation of Esomeprazole in Bulk and Pharmaceutical Dosage Form. *J. Drug Deliv. Ther.*, **9**: 292–295.
- JAISWAL, S, SINGH, R, SINGH, K, FATMA, S, PRASAD, BB (2019) Enantioselective analysis of D- and L- Serine on a layer-by-layer imprinted electrochemical sensor. *Biosens. Bioelectron.*, **124–125**: 176–183.
- KAKDE, RB, SATONE, DD, GADAPAYALE, KK, KAKDE, MG (2013) Stability-Indicating RP-HPLC Method for the Simultaneous Determination of Escitalopram Oxalate and Clonazepam. *J. Chromatogr. Sci.*, **51**: 490–495.
- KANFER, I, DOWSE, R, VUMA, V (1993) Pharmacokinetics of Oral Decongestants. *Pharmacother. J. Hum. Pharmacol. Drug Ther.*, **13**: 116S-128S.

- KARIM, K, BRETON, F, ROUILLON, R, PILETSKA, E V., GUERREIRO, A, CHIANELLA, I, PILETSKY, SA (2005) How to find effective functional monomers for effective molecularly imprinted polymers? *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **57**: 1795–1808.
- KASPRZYK-HORDERN, B, BAKER, DR (2012) Enantiomeric profiling of chiral drugs in wastewater and receiving waters. *Environ. Sci. Technol.*, **46**: 1681–1691.
- KEMPE, M (2001) Chapter 17 Molecularly imprinted polymers in enantiomer separations. *Tech. Instrum. Anal. Chem.*, **23**: 395–415.
- KIM, JH, SCIALLI, AR (2011) Thalidomide: The Tragedy of Birth Defects and the Effective Treatment of Disease. *Toxicol. Sci.*, **122**: 1–6.
- KISSINGER, PT, HEINEMAN, WR (1996) Laboratory techniques in electroanalytical chemistry. 986.
- KOMIYAMA, M, TAKEUCHI, T, MUKAWA, T, ASANUMA, H (2003) Molecular Imprinting: From Fundamentals to Applications. 148.
- KUTNER, W, SHARMA, PS, eds (2018) Molecularly Imprinted Polymers for Analytical Chemistry Applications. doi:10.1039/9781788010474.
- LIU, W, HOLDSWORTH, C, YE, L (2020) Synthesis of molecularly imprinted polymers using a functionalized initiator for chiral-selective recognition of propranolol. *Chirality*, **32**: 370–377.
- LU, Y, LI, C, ZHANG, H, LIU, X (2003) Study on the mechanism of chiral recognition with molecularly imprinted polymers. *Anal. Chim. Acta*, **489**: 33–43.
- MA, G, BAVADEKAR, SA, DAVIS, YM, LALCHANDANI, SG, NAGMANI, R, SCHANEBERG, BT, KHAN, IA, FELLER, DR (2007) Pharmacological Effects of Ephedrine Alkaloids on Human α 1- and α 2-Adrenergic Receptor Subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **322**: 214–221.
- MAIER, NM, LINDNER, W (2007) Chiral recognition applications of molecularly imprinted polymers: a critical review. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007 3892, **389**: 377–397.
- MAUSKOPF, S (2006) A history of chirality. *Chiral Anal.*, 3–24.
- MIJANGOS, I, NAVARRO-VILLOSLADA, F, GUERREIRO, A, PILETSKA, E, CHIANELLA, I, KARIM, K, TURNER, A, PILETSKY, S (2006) Influence of initiator and different polymerisation conditions on performance of molecularly imprinted polymers. *Biosens. Bioelectron.*, **22**: 381–387.
- MISLOW, K, SIEGEL, J (2002) Stereoisomerism and local chirality. *J. Am. Chem. Soc.*, **106**: 3319–3328.
- OZKAN, SA (2012) Electroanalytical methods in pharmaceutical analysis and their validation. 350.
- OZKAN, SA, KAUFFMANN, J-M, ZUMAN, P (2015a) Electroanalysis in Biomedical and Pharmaceutical Sciences. doi:10.1007/978-3-662-47138-8.
- OZKAN, SA, KAUFFMANN, J-M, ZUMAN, P (2015b) Electroanalytical <IndexTerm ID="ITerm1">Method Validation</IndexTerm> in Pharmaceutical Analysis and Their Applications. 235–266.
- PILETSKA, E V., GUERREIRO, AR, WHITCOMBE, MJ, PILETSKY, SA (2009) Influence of the Polymerization Conditions on the Performance of Molecularly

- Imprinted Polymers. *Macromolecules*, **42**: 4921–4928.
- PRASAD, BB, JAISWAL, S, SINGH, K (2017) Ultra-trace analysis of d-and l-aspartic acid applying one-by-one approach on a dual imprinted electrochemical sensor. *Sensors Actuators B Chem.*, **240**: 631–639.
- RADI, A, ABD-ELKADER, A (2015) Voltammetric behaviour of esomeprazole at screen printed carbon electrode and its determination in capsule dosage form.
- RADI, AE, EL-GHANY, NA, WAHDAN, T (2016) Determination of Esomeprazole on an Electropolymerized L-arginine and β -cyclodextrin Modified Screen Printed Carbon Electrode. *Electroanalysis*, **28**: 1112–1118.
- RAO, MN, KRISHNA, KBM, HARI BABU, B (2016) Development and validation of a stability indicating HPLC method for the simultaneous analysis of esomeprazole and itopride in bulk and in capsules. *J. Appl. Pharm. Sci.*, **6**: 072–080.
- ROHSS, K, LUNDIN, C, RYDHOLM, H, NYMAN, L (2000) Esomeprazole 40 mg provides more effective acid control than omeprazole 40 mg. *Am. J. Gastroenterol.*, **95**: 2432–2433.
- ROOSEWELT, C, MAGESH, AR, REKHA, AGS, SHANMUGA PANDIAN, P, GUNASEKARAN, V (2007) Simultaneous Estimation and Validation of Esomeprazole and Domperidone by HPTLC in Pure and Pharmaceutical Dosage Forms. *Asian J. Chem.*, **19**: 2955–2960.
- RUTKOWSKA, M, NAMIEŚNIK, J (2019) Molecularly imprinted polymers applied in capillary electrochromatography and electrophoresis techniques. *Compr. Anal. Chem.*, **86**: 235–259.
- RUTKOWSKA, M, PŁOTKA-WASYLKA, J, MORRISON, C, WIECZOREK, PP, NAMIEŚNIK, J, MARĆ, M (2018) Application of molecularly imprinted polymers in analytical chiral separations and analysis. *TrAC Trends Anal. Chem.*, **102**: 91–102.
- SÁNCHEZ, C (2006a) The Pharmacology of Citalopram Enantiomers: The Antagonism by R-Citalopram on the Effect of S-Citalopram*. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, **99**: 91–95.
- SÁNCHEZ, C (2006b) The pharmacology of citalopram enantiomers: The antagonism by R-citalopram on the effect of S-citalopram. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, **99**: 91–95.
- SÁNCHEZ, C, BØGESÓ, KP, EBERT, B, REINES, EH, BRAESTRUP, C (2004) Escitalopram versus citalopram: The surprising role of the R-enantiomer. *Psychopharmacology (Berl.)*, **174**: 163–176.
- SCHWELM, HM, GRUMANN, C, AUWÄRTER, V, NEUKAMM, MA (2020) Application of a chiral high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of 13 related amphetamine-type stimulants to forensic samples: Interpretative hypotheses. *Drug Test. Anal.*, **12**: 1354–1365.
- SELLERGREN, B, LEPIST, M, MOSBACHÖ, K (1988) Highly enantioselective and substrate-selective polymers obtained by molecular imprinting utilizing noncovalent interactions. NMR and chromatographic studies on the nature of recognition. *J. Am. Chem. Soc.*, **110**: 5853–5860.
- SHAO, G, WANG, DS, WU, F, CHEN, SJ, LUO, X (2006) Separation and Determination of (l)-Ephedrine and (d)-Pseudoephedrine in Plasma by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. **18**: 2133–2145.

- SHETTY, R, SUBRAMANIAN, G, KUMAR, AR, PANDEY, S, UDUPA, N (2005) Estimation of esomeprazole in human plasma by reverse phase high performance liquid chromatography. **42**: 158–161.
- SHORAVI, S, OLSSON, GD, KARLSSON, BCG, NICHOLLS, IA (2010) On the influence of crosslinker on template complexation in molecularly imprinted polymers: A computational study of prepolymerization mixture events with correlations to template-polymer recognition behavior and nmr spectroscopic studies. *Int. J. Mol. Sci.*, **15**: 10622–10634.
- SIBRIAN-VAZQUEZ, M, SPIVAK, DA (2004) Characterization of molecularly imprinted polymers employing crosslinkers with nonsymmetric polymerizable groups. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, **42**: 3668–3675.
- SKOOG, DA, HOLLER, FJ, NIEMAN, TA (1998) Principles of instrumental analysis.
- SOLANKI, S, CAPTAIN, A, PATEL, VB Simultaneous determination of Domperidone and Esomeprazole magnesium in Pharmaceutical Capsule Formulation by Derivative Spectrophotometric Method. *Int. J. ChemTech Res. CODEN(USA)*, **3**: 1747–1750.
- SPIVAK, DA (2005) Optimization, evaluation, and characterization of molecularly imprinted polymers. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **57**: 1779–1794.
- SUEDEE, R, SONGKRAM, C, PETMOREEKUL, A, SANGKUNAKUP, S, SANKASA, S, KONGYARIT, N (1999) Direct enantioseparation of adrenergic drugs via thin-layer chromatography using molecularly imprinted polymers. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **19**: 519–527.
- VADREVU, S, GOVINDARAO, K (2018) Method development and validation of RP-HPLC for the simultaneous estimation of escitalopram and etizolam in bulk and pharmaceutical dosage form. **55**: 50–56.
- VETRICHELVAN, T, ARUL, K, SUMITHRA, M, UMADEVI, B (2010) Colorimetric Method for the Estimation of Escitalopram Oxalate in Tablet Dosage Form. *Indian J. Pharm. Sci.*, **72**: 269.
- WHITCOMBE, MJ, KIRSCH, N, NICHOLLS, IA (2014) Molecular imprinting science and technology: A survey of the literature for the years 2004-2011. *J. Mol. Recognit.*, **27**: 297–401.
- WŁOCH, M, DATTA, J (2019) Synthesis and polymerisation techniques of molecularly imprinted polymers. *Compr. Anal. Chem.*, **86**: 17–40.
- YANG, S, WANG, Y, JIANG, Y, LI, S, LIU, W (2016) Molecularly Imprinted Polymers for the Identification and Separation of Chiral Drugs and Biomolecules. *Polym. 2016, Vol. 8, Page 216*, **8**: 216.
- ZHANG, Z, LI, H, LIAO, H, NIE, L, YAO, S (2005) Influence of cross-linkers' amount on the performance of the piezoelectric sensor modified with molecularly imprinted polymers. *Sensors Actuators B Chem.*, **105**: 176–182.