TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENDOKRİN BOZUCU BAZI KİMYASALLARIN SEÇİCİ VE HASSAS SENSÖRLERLE TAYİNİ

Sariye İrem KAYA

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN

ANKARA

2022

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENDOKRİN BOZUCU BAZI KİMYASALLARIN SEÇİCİ VE HASSAS SENSÖRLERLE TAYİNİ

Sariye İrem KAYA

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN

Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koorinatörlüğü'nün BAP 21L0237002 proje numarasıyla desteklenmiştir.

ANKARA
2022

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum "Endokrin bozucu bazı kimyasalların seçici ve hassas sensörlerle tayini" 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: Sariye İrem KAYA
Tarih: 28.03.2022
İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalında Sariye İrem KAYA tarafından hazırlanan "Endokrin bozucu bazı kimyasalların seçici ve hassas sensörlerle tayini" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir

Tez Savunma Tarihi: 28.03.2022

Prof. Dr. Emirhan NEMUTLU
Hacettepe Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Bengi USLU
Ankara Üniversitesi
Raportör

Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN
Ankara Üniversitesi
Üye

Doç. Dr. Burcu DOĞAN TOPAL
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 viii
Simgeler ve Kısaltmalar x
Şekiller xiii
Çizelgeler xvi

1. GİRİŞ 1
1.1. Giriş ve amaç 1
1.2. Endokrin sistem ve endokrin bozucu kimyasallar 2
1.3. Tez kapsamında çalışılan bisfenoller 7
1.3.1. Bisfenol A 7
1.3.2. Bisfenol S 9
1.3.3. Bisfenol F 10
1.4. Tez kapsamındaki bisfenollere ait literatür çalışmaları 11
1.4.1. Ayrıma teknikleri ile yapılmış çalışmalar 11
1.4.2. Spektrofotometrik yöntemler ile yapılmış çalışmalar 14
1.4.3. Elektrokimyasal yöntemler ile yapılmış çalışmalar 15
1.5. Moleküler baskılama teknolojisi ve moleküler baskılı polimerler (MIP'ler) 17
1.5.1. MIP'lerin bileşenleri 18
1.5.1.1. Hedef (kalıp) molekül 18
1.5.1.2. Fonksiyonel monomer 19
1.5.1.3. Çapraz bağlayıcı 19
1.5.1.4. Başlatıcı 20
1.5.1.5. Çözücü 20
1.5.2. Moleküler baskılama stratejileri 21
1.5.3. MIP'lerin analitik uygulamaları 22

2. GEREÇ VE YÖNTEM 24
2.1. Elektrokimya 24
2.1.1. Elektrokimyada kullanılan elektrotlar 25
2.1.1.1. Çalışma elektrodu 25
2.1.1.2. Referans elektrot 26
2.1.1.3. Yardımcı (karşıt) elektrot 26
2.2. Elektrokimyasal teknikler 26
2.2.1. Polarografi 28
2.2.2. Voltametri 28
2.2.2.1. Doğrusal taramalı voltametri 29

2.2.2.2. Dönüşümlü voltametri 29
2.2.3. Puls voltametrisi 30
2.2.3.1. Kare dalga voltametrisi 30
2.2.3.2. Diferansiyel puls voltametrisi 31
2.2.4. Sıyırma voltametri teknikleri 31
2.2.4.1. Anodik sıyırma voltametrisi 31
2.2.4.2. Katodik sıyırma voltametrisi 32
2.2.4.3. Adsorptif sıyırma voltametrisi 32
2.3. Analitik yöntemlerde validasyon 32
2.3.1. Seçicilik 33
2.3.2. Doğrusallık 33
2.3.3. Aralık 34
2.3.4. Teşhis sınırı 34
2.3.5. Tayin alt sınırı 35
2.3.6. Doğruluk 35
2.3.7. Kesinlik 36
2.3.8. Duyarlılık 37
2.3.9. Sağlamlık (Kararlılık) 37
2.3.10. Tutarlılık 37
2.3.11. Stabilite 38
2.4. Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler 38
2.5. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve ekipmanlar 40
2.6. Tez çalışmasında kullanılan elektrokimyasal sistem ve bileşenleri 40
2.7. Tez çalışmasında kullanılan çözeltilerin hazırlanması 41
2.7.1. Destek elektrolitlerin hazırlanması 41
2.7.2. Potasyum ferrisiyanür/ferrosiyanür çözeltisinin hazırlanması 41
2.7.3. Bisfenollerin standart çözeltilerinin hazırlanması 42
2.7.5. Girişim çalışmalarında kullanılan çözeltilerinin hazırlanması 42
2.7.6. Tez çalışmasında kullanılan diğer çözeltilerin hazırlanması 43
2.8. Tez çalışmasında kullanılan voltametrik yöntemler 43
2.8.1. Dönüşümlü voltametri 43
2.8.2. Elektrokimyasal impedans spektroskopisi 43
2.8.3. Diferansiyel puls voltametrisi 43
2.9. Tez çalışmasında kullanılan MIP temelli elektrokimyasal sensörlerin hazırlanması 44
2.9.1. BPA için MIP temelli elektrokimyasal sensörün hazırlanması 44
2.9.2. BPS için MIP temelli elektrokimyasal sensörün hazırlanması 44
2.9.3. BPF için MIP temelli elektrokimyasal sensörün hazırlanması 45
2.10. MIP temelli elektrokimyasal sensörlerin yüzey karakterizasyonu 46

3. BULGULAR **47**
3.1. BPA'ya ait bulgular 47
3.1.1. MIP temelli elektrokimyasal sensörün karakterizasyonu 47
3.1.1.1. Elektrokimyasal karakterizasyon 47

3.1.1.2. Yüzey karakterizasyonu 49
3.1.2. Deneysel koşulların optimizasyonu 50
3.1.2.1. Monomer:hedef molekül oranı 50
3.1.2.2. Elektropolimerizasyon için döngü sayısı 51
3.1.2.3. Hedef molekülün uzaklaştırılma işlemi 52
3.1.2.4. Hedef molekülün bağlanma işlemi 54
3.1.3. MIP(ANI)/CKE ile BPA'nın elektrokimyasal tayini 55
3.1.4. Ticari insan serumu ve su numunelerinin analizi 57
3.1.5. Seçicilik çalışması 60
3.1.6. Girişim etkisinin değerlendirilmesi 61
3.1.7. Stabilite çalışması 62
3.2. BPS'ye ait bulgular 62
3.2.1. MIP temelli elektrokimyasal sensörün karakterizasyonu 62
3.2.1.1. Elektrokimyasal karakterizasyon 62
3.2.1.2. Yüzey karakterizasyonu 64
3.2.2. Deneysel koşulların optimizasyonu 66
3.2.2.1. Damlatma miktarı 66
3.2.2.2. Monomer:hedef molekül oranı 67
3.2.2.3. Hedef molekülün uzaklaştırılma işlemi 68
3.2.2.4. Hedef molekülün bağlanma işlemi 69
3.2.3. MA-Tyr@MIP/CKE ile BPS'nin elektrokimyasal tayini 70
3.2.4. Ticari insan serumu ve su numunelerinin analizi 73
3.2.5. Seçicilik çalışması 76
3.2.6. Girişim etkisinin değerlendirilmesi 77
3.2.7. Stabilite çalışması 78
3.3. BPF'ye ait bulgular 78
3.3.1. MIP temelli elektrokimyasal sensörün karakterizasyonu 78
3.3.1.1. Elektrokimyasal karakterizasyon 78
3.3.1.2. Yüzey karakterizasyonu 80
3.3.2. Deney koşullarının optimizasyonu 82
3.3.2.1. Monomer:hedef molekül oranı 82
3.3.2.2. Hedef molekülün uzaklaştırılma işlemi 83
3.3.2.3. Hedef molekülün bağlanma işlemi 84
3.3.3. MIP(TEOS:L-Trp)@CKE ile BPF'nin elektrokimyasal tayini 85
3.3.4. Ticari insan serumu ve su numunelerinin analizi 88
3.3.5. Seçicilik çalışması 91
3.3.6. Girişim etkisinin değerlendirilmesi 92
3.3.7. Stabilite çalışması 93

4. TARTIŞMA 94
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 101
ÖZET 104
SUMMARY 105
KAYNAKLAR 107

ÖNSÖZ

Bisfenol türevlerinin insan sağlığı üzerine zararlı etkileri, yaygın kullanımı ve bunlara ilişkin farkındalığın günümüzde gittikçe artmakta olduğu düşünüldüğünde çeşitli bisfenollerin biyolojik örneklerden ve su örneklerinden tayini için hassas, etkili, hızlı ve seçici sensörler geliştirilmesi oldukça büyük bir öneme sahiptir. Bu tez çalışmasında en önemli bisfenol türevlerinden bisfenol A, bisfenol S ve bisfenol F'nin tayini için moleküler baskılı polimer temelli elektrokimyasal sensörler geliştirilmiştir. Geliştirilen bu sensörler serum ve plastik şişe su örneklerine yüksek hassasiyet, doğruluk ve kesinlikle uygulanmıştır.

Kendisinin doktora öğrencisi olabilmemi en büyük şansım olarak gördüğüm, akademik hayatta bildiğim her şeyi bana öğreten, bir danışmandan daha fazlası olup her anlamda sonsuz desteğini, anlayışını ve sabrını sürekli hissettiğim, zorlu doktora sürecimde motivasyonumun düşmesine asla izin vermeyen, her şeyi başarabilmem için beni cesaretlendiren, teşekkürlerimi, sevgimi, saygımı bu satırlara sığdırmamın mümkün olmadığı danışmanım sayın Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez çalışmamın değerli jüri üyeleri sayın Prof. Dr. Bengi USLU'ya, Prof. Dr. Emirhan NEMUTLU'ya, Doç. Dr. Nurgül KARADAŞ BAKIRHAN'a ve Doç. Dr. Burcu DOĞAN TOPAL'a teşekkürlerimi sunarım.

Doktora öğrenimim boyunca sağladıkları katkılar ve desteklerinden dolayı Analitik Kimya Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarıma bilgi ve deneyimleriyle katkıda bulunan, sayın Doç. Dr. Mehmet Emin ÇORMAN'a destekleri için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora sürecimde bana sağladıkları katkılar, sonsuz destekleri ve anlayışları için sayın Prof. Dr. Yalçın ÖZKAN'a ve Doç. Dr. Nurgül KARADAŞ BAKIRHAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Hayattaki en büyük şansım, bugünlerimin mimarı, en büyük destekçilerim, tüm mutluluklarımı anlamlandıran canım annem Fatma KAYA ve canım babam Baki KAYA'ya, ailemizin minik üyesi motivasyon kaynağım Odie'ye sonsuz teşekkür ederim. Siz olmadan hiçbir şeyi başaramazdım, iyi ki benim ailemsiniz.

Hayatım boyunca beni hep destekleyen ve yanımda olan sevgili dayılarım Fikri KALKAN ve Saim KALKAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Doktora sürecimin en büyük kazanımları, bu zorlu süreci güzelleştiren değerli arkadaşlarımdan birlikte büyük bir zevkle çalışabildiğim, bana sonsuz destek olan, en stresli anlarımda bile birlikte gülmenin bir yolunu bulabilen Ahmet ÇETİNKAYA'ya; bana hem bir arkadaş hem bir abla olan, pek çok güzel anımızı ve sıkıntılarımızı paylaştığımız sevgili Ece ÖZKAN'a; birlikte çalıştığımız kısa süre içerisinde çok güzel bir bağ kurduğumuz sevgili usta Yağmur TURGUT'a; güler yüzlü ve içten destekleri için sevgili Merve YENCE'ye sonsuz teşekkür ederim.

Sevgili dostlarım Büşra KARPUZ, Seval OLĞAÇ, Fikriye ÖZGENCİL, Kübra ASLAN, Kübra Büşra YÜKSEL ve Süleyman ADIGÜZEL'e kıymetli dostlukları, sonsuz destekleri, paylaştığımız harika anılar için en içten teşekkürlerimi sunarım.

Doktora öğrenimim süresince yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen arkadaşlarım Leyla KARADURMUŞ'a, Göksu ÖZÇELİKAY'a ve tüm ekip arkadaşlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

4-AP	4-aminofenol
AA	Askorbik asit
AB	Avrupa Birliği
AIBN	2,2′-azobis(2-metilpropiyonitril)
ANI	Anilin
ATR-FTIR	Zayıflatılmış toplam yansıma kızılötesi spektroskopisi
BH	Bağıl hata
BP	Bisfenol
BPA	Bisfenol A
BPF	Bisfenol F
BPS	Bisfenol S
BSS	Bağıl standart sapma
CKE	Camsı karbon elektrot
CTAB	Setiltrimetilamonyum bromür
DMSO	Dimetil sülfoksit
DOP	Dopamin
DPV	Diferansiyel puls voltametrisi
DV	Dönüşümlü voltametri
EBK	Endokrin bozucu kimyasal
EC	Avrupa Komisyonu
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi

EGDMA	Etilen glikol dimetakrilat
EIS	Elektrokimyasal impedans spektroskopisi
EP	Elektropolimerizasyon
EPA	Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu
FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
GK	Gaz kromatografisi
HEMA	Hidroksietilmetakrilat
I	Akım
ICH	Uluslararası Uyum Konferansı
IF'	Bağıl baskılama faktörü
IF	Baskılama faktörü
KS	Kütle spektrometrisi
L-Trp	L-triptofan
MA-Tyr	N-metakriloil-L-tirozin
MIP	Moleküler baskılı polimer
NIP	Baskılanmamış polimer
o-PD	Orto-fenilendiamin
PANI	Polianilin
PVA	Polivinil alkol
r^2	Korelasyon katsayısı
R_{ct}	Yük transfer direnci
SEM	Taramalı elektron mikroskopisi

SK	Sıvı kromatografisi
TAS	Tayin alt sınırı
TEOS	Tetraetoksisilan
TMSPMA	3-(trimetoksisilil)propil metakrilat
TS	Teşhis sınırı
UPSK	Ultra performans sıvı kromatografisi
UV	Ultraviyole
YPSK	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
ΔI	Pik akımları arasındaki fark

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. BPA'nın kimyasal yapısı 8

Şekil 1.2. BPS'nin kimyasal yapısı 9

Şekil 1.3. BPF'nin kimyasal yapısı 10

Şekil 1.4. MIP hazırlama adımlarının şematik gösterimi 17

Şekil 2.1. Elektrokimyasal tekniklerin sınıflandırılması 27

Şekil 3.1. MIP(ANI)/CKE sensörün oluşturulma aşamalarında elde edilen Nyquist grafikleri 48

Şekil 3.2. MIP(ANI)/CKE sensörün oluşturulma aşamalarında elde edilen DV voltamogramları 49

Şekil 3.3. MIP(ANI)/CKE sensörün yüzey karakterizasyonu: A) FTIR spektrumları, B) Raman spektrumları, C) SEM görüntüsü; çıplak CKE (D) ve MIP(ANI)/CKE (E) temas açıları görüntüleri 50

Şekil 3.4. ΔI değerlerine karşılık farklı monomer:kalıp molekül oranlarının grafiği (Ölçümler 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisi içerisinde yapılmıştır.) 51

Şekil 3.5. ΔI değerlerine karşılık farklı döngü sayılarının grafiği (Ölçümler 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisi içerisinde yapılmıştır.) B)10 döngü DV ile ANI'nin elektropolimerizasyonu 52

Şekil 3.6. ΔI değerlerine karşılık A) uzaklaştırma çözeltilerinin, B) 10 M asetik asit çözeltisi için uzaklaştırma sürelerinin grafiği (Ölçümler 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisi içerisinde yapılmıştır.) 54

Şekil 3.7. ΔI değerlerine karşılık farklı bağlanma sürelerinin grafiği (Ölçümler 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisi içerisinde yapılmıştır.) 55

Şekil 3.8. A) MIP(ANI)/CKE ve NIP(ANI)/CKE sensörlerine ait DPV ile elde edilmiş kalibrasyon grafikleri B) Farklı derişimlerde BPA'nın bağlanmasıyla elde edilen 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisine ait DPV voltamogramları 56

Şekil 3.9. Ticari serum örneklerinde A) MIP(ANI)/CKE ve NIP(ANI)/CKE sensörlerine ait DPV ile elde edilmiş kalibrasyon grafikleri B) Farklı derişimlerde BPA'nın bağlanmasıyla elde edilen 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisine ait DPV voltamogramları 58

Şekil 3.10. BPA ve diğer benzer yapılı moleküller için IF çalışmalarının değerlendirilmesi 60

Şekil 3.11. MA-Tyr@MIP/CKE sensörün oluşturulma aşamalarında elde edilen DV voltamogramları 63

Şekil 3.12. MA-Tyr@MIP/CKE sensörün oluşturulma aşamalarında elde edilen Nyquist grafikleri 64

Şekil 3.13. Polimerik filmlerin SEM görüntüleri: a) PVA olmadan MA-Tyr@MIP/CKE, b) PVA ile MA-Tyr@MIP/CKE, c) PVA olmadan MA-Tyr@NIP/CKE, d) PVA ile MA-Tyr@NIP/CKE 65

Şekil 3.14. a) MA-Tyr@MIP/CKE sensörün, b) MA-Tyr@NIP/CKE sensörün ATR-FTIR spektrumları 66

Şekil 3.15. Polimerizasyon öncesi ve sonrası elde edilen ΔI değerlerine karşılık damlatma miktarlarının grafiği (Ölçümler 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisi içerisinde yapılmıştır.) 67

Şekil 3.16. ΔI değerlerine karşılık farklı monomer:hedef molekül oranlarının grafiği (Ölçümler 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisi içerisinde yapılmıştır.) 68

Şekil 3.17. ΔI değerlerine karşılık A) uzaklaştırma çözeltilerinin, B) 10 M asetik asit çözeltisi için uzaklaştırma sürelerinin grafiği (Ölçümler 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$çözeltisi içerisinde yapılmıştır.) 69

Şekil 3.18. ΔI değerlerine karşılık farklı bağlanma sürelerinin grafiği (Ölçümler 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisi içerisinde yapılmıştır.) 70

Şekil 3.19. A) MA-Tyr@MIP/CKE ve MA-Tyr@NIP/CKE sensörlerine ait DPV ile elde edilmiş kalibrasyon grafikleri B) Farklı derişimlerde BPS'nin bağlanmasıyla elde edilen 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisine ait DPV voltamogramları. 72

Şekil 3.20. Ticari serum örneklerinde A) MA-Tyr@MIP/CKE ve MA-Tyr@NIP/CKE sensörlerine ait DPV ile elde edilmiş kalibrasyon grafikleri B) Farklı derişimlerde BPS'nin bağlanmasıyla elde edilen 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisine ait DPV voltamogramları 74

Şekil 3.21. BPS ve diğer benzer yapılı moleküller için IF çalışmalarının değerlendirilmesi 76

Şekil 3.22. MIP(TEOS:L-Trp)@CKE sensörün oluşturulma aşamalarında elde edilen DV voltamogramları 79

Şekil 3.23. MIP(TEOS:L-Trp)@CKE sensörün oluşturulma aşamalarında elde edilen Nyquist grafikleri 80

Şekil 3.24. MIP(TEOS:L-Trp)@CKE sensörün A) SEM görüntüsü, B) FTIR spektrumları 81

Şekil 3.25. Polimerizasyon sonrası elde edilen akım değerlerine karşılık farklı monomer:hedef molekül oranlarının grafiği (Ölçümler 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisi içerisinde yapılmıştır.) 82

Şekil 3.26. ΔI değerlerine karşılık A) uzaklaştırma çözeltilerinin, B) 10 M asetik asit çözeltisi için uzaklaştırma sürelerinin grafiği (Ölçümler 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisi içerisinde yapılmıştır.) 84

Şekil 3.27. ΔI değerlerine karşılık farklı bağlanma sürelerinin grafiği (Ölçümler 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisi içerisinde yapılmıştır.) 85
Şekil 3.28. A) MIP(TEOS:L-Trp)@CKE ve NIP(TEOS:L-Trp)@CKE sensörlerine ait DPV ile elde edilmiş kalibrasyon grafikleri B) Farklı derişimlerde BPF'nin bağlanmasıyla elde edilen 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$çözeltisine ait DPV voltamogramları 87

Şekil 3.29. Ticari serum örneklerinde A) MIP(TEOS:L-Trp)@CKE ve NIP(TEOS:L-Trp)@CKE sensörlerine ait DPV ile elde edilmiş kalibrasyon grafikleri B) Farklı derişimlerde BPF'nin bağlanmasıyla elde edilen 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisine ait DPV voltamogramları 89

Şekil 3.30. ΔI değerlerine karşılık farklı bağlanma sürelerinin grafiği (Ölçümler 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisi içerisinde yapılmıştır.) 91

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. En çok bilinen EBK'ların sınıflandırılması 4

Çizelge 1.2. BPA, BPS ve BPF tayinine yönelik ayırma teknikleri ile yapılmış çalışmalar 11

Çizelge 1.3. BPA tayinine yönelik spektrofotometrik yöntemler ile yapılmış çalışmalar 14

Çizelge 1.4. BPA, BPS ve BPF tayinine yönelik elektrokimyasal yöntemler ile yapılmış çalışmalar 15

Çizelge 2.1. Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler 38

Çizelge 2.2. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve ekipmanlar 40

Çizelge 2.3. Tez çalışmasında kullanılan elektrokimyasal sistem ve bileşenleri 41

Çizelge 3.1. Standart çözelti ve serum numunelerinde MIP(ANI)/CKE sensörü ile BPA için elde edilen kalibrasyon eğrisine ait regresyon analizi sonuçları 57

Çizelge 3.2. Serum örneği için geri kazanım çalışmasına ait sonuçlar 59

Çizelge 3.3. Su örnekleri için geri kazanım çalışmasına ait sonuçlar 59

Çizelge 3.4. BPA, BPS, 4-AP, BPB ve BPF için IF hesaplamaları 61

Çizelge 3.5. Girişim etkili türlerin BPA tayini üzerine etkisi 61

Çizelge 3.6. Standart çözelti ve serum numunelerinde MA-Tyr@MIP/CKE sensörü ile BPS için elde edilen kalibrasyon eğrisine ait regresyon analizi sonuçları 73

Çizelge 3.7. Serum örneği için geri kazanım çalışmasına ait sonuçlar 75

Çizelge 3.8. Su örnekleri için geri kazanım çalışmasına ait sonuçlar 75

Çizelge 3.9. BPS, BPA, 4-AP, BPB ve BPF için IF hesaplamaları 77

Çizelge 3.10. Girişim etkili türlerin BPS tayini üzerine etkisi 77

Çizelge 3.11. Standart çözelti ve serum numunelerinde MIP(TEOS:L-Trp)@CKE sensörü ile BPF için elde edilen kalibrasyon eğrisine ait regresyon analizi sonuçları 88

Çizelge 3.12. Serum örneği için geri kazanım çalışmasına ait sonuçlar 90

Çizelge 3.13. Su örnekleri için geri kazanım çalışmasına ait sonuçlar 90

Çizelge 3.14. BPF, BPS, BPA, 4-AP ve BPB için IF hesaplamaları 92

Çizelge 3.15. Girişim etkili türlerin BPF tayini üzerine etkisi 92

1. GİRİŞ

1.1. Giriş ve amaç

Bisfenol A (BPA), Bisfenol F (BPF), ve Bisfenol S (BPS) başta olmak üzere bisfenol (BP) türevleri endokrin sistem üzerinde etkileri olan; polimer plastikler, kaplamalar ve epoksi reçinelerin üretim sürecinde kullanılan önemli endüstriyel kimyasallardır. BPA, özellikle gıdalarla temas eden plastik su şişeleri, meyve suyu şişeleri, yiyecek ve içecek konserveleri başta olmak üzere pek çok ticari üründe en yaygın olarak kullanılan ve en zararlı olan BP türevidir (Cooper ve ark., 2011; Park ve ark., 2018 ve Zhang, ve ark., 2019). Günümüzde "BPA içermez" şeklinde pazarlanan ürünlerin yaygınlığı gittikçe artmakta ve bu ibareyi pek çok ürünün üzerinde görmekteyiz. Ancak bu ürünler düşünüldüğü kadar zararsız değildir, örneğin BPA'sız olduğu belirtilen alüminyum şişelerde BPA içerikli epoksi kaplama kullanılmış olabilir (Cooper ve ark., 2011). Ayrıca, BPA yerine alternatif olarak diğer BP türevlerinin kullanılması bir çözüm seçeneği olarak düşünülse de tüm BP molekülleri benzer kimyasal yapılara ve özelliklere sahip olduğundan bunların kullanımı da tamamen güvenli değildir.

BP türevlerinin insan sağlığı üzerine zararlı etkileri, yaygın kullanımı ve bununla ilgili günümüzde gittikçe artan farkındalık düşünüldüğünde çeşitli BP'lerin su örneklerinden tayini için hassas, etkili, hızlı ve seçici bir sensör geliştirilmesi oldukça büyük bir öneme sahiptir.

Literatür incelendiğinde BP türevlerinin tayini üzerine yapılmış çoğunlukla kromatografik yöntemler temelli çalışmalar bulunmaktadır. Bu yöntemlerin pahalı cihazlar gerektirmesi, zor prosedürlere ve karışık ön işlem basamaklarına sahip olması gibi dezavantajları nedeniyle kullanım kolaylığı, hassasiyet, çok yönlülük, küçültmeye olanak sağlama özelliklerinin yanında elektrot yüzeyinin modifikasyonuyla seçicilik

ve özgünlüğün arttırılabilmesi elektrokimyasal analizi araştırmacılar tarafından tercih edilir kılmaktadır (Ozkan ve ark., 2015).

Moleküler baskılı polimer (MIP) temelli elektrokimyasal sensörler; önemli ölçüde seçicilik ve hassasiyet, kimyasal/mekanik stabilite, yeniden kullanılabilirlik, düşük tayin sınırı, kolaylıkla küçültülebilme, kolay hazırlama süreci ve düşük maliyetiyle basit, hızlı ve uygun fiyatlı analitik metotlar olarak kanıtlanmıştır (Cui ve ark., 2020). Bu nedenle, bu tez çalışmasında en çok karşılaşılan BP türevlerinden olan BPA, BPF ve BPS'nin ayrı ayrı tayini için MIP tenelli elektrokimyasal sensörler geliştirilmiştir. MIP tekniğinin BP'lerin analizinde numune hazırlama aşamasında kullanılması yerine bu tez çalışmasında elektrokimyasal tayin amacıyla kullanılması, kullanılan monomerlerin spesifik olarak sentezlenmiş olması ve literatürde yer alan çalışmalara kıyasla daha yüksek hassasiyet elde edilmesi özgünlüğü ortaya koymaktadır. Geliştirilen MIP temelli sensörler sentetik serum ve plastik şişe su örneklerine yüksek uygulanabilirlik, doğruluk ve kesinlik ile uygulanmıştır.

1.2. Endokrin sistem ve endokrin bozucu kimyasallar

Endokrin sistem, vücut homeostazını sağlamak için endokrin yolaklar aracılığıyla hücreler/dokular/organlar arasındaki iletişimi sağlayan ve oldukça karmaşık bir işleyişe sahip bir sistemdir. Endokrin sistem bu görevlerini endokrin bezleri olan hipotalamus, hipofiz bezi, tiroit bezi, paratiroit bezleri, adrenal bezler, pankreas ve yumurtalıklar/testisler aracılığıyla gerçekleştirir. Endokrin bezlerin her biri, hedef hücrelerin spesifik reseptör proteinlerine bağlanabilen hormonların salgılanmasından sorumludur. Endokrin bezlerinin işleyişi de birbiriyle bağlantılıdır ve birinin uyarılması bir dizi hormon salgılanması, diğer bezlerin uyarılması ve çeşitli hücresel tepkilerle sonuçlanabilir. Endokrin sistemin geri bildirim süreçleri sayesinde vücutta meydana gelen değişikliklerin hassas bir şekilde dengelenebilmesi için hormon salgılanması indüklenmekte veya inhibe edilmektedir. Yukarıda anlatılan tüm süreçlere örnek olarak östradiol salgılanması verilebilir: Gonadotropin salgılatıcı hormon hipotalamus tarafından üretilir ve dişi bireylerde yumurtalıkları hedef alan

hipofiz bezinden luteinize edici hormon salgılanmasını uyarır; bunun sonucunda dişi üreme sisteminde önemli görevleri olan östradiol yumurtalıklar tarafından üretilerek salgılanır (Safe ve ark., 2010; Paz ve Vizmeg, 2014; Cole, 2016 ve Kaya ve ark., 2020).

Endokrin sistem vücuttaki birçok kritik sürece dahil olmaktadır. Bu sebeple endokrin sistemde bozukluğa neden olabilecek herhangi bir etkenin varlığı hayati sonuçlar doğurabilir. Elektrolit ve asit-baz dengesinin bozulması, çeşitli metabolik hastalıklar (diyabet, hiperkolesterolemi, fenilketonüri, vb.), kısırlık ve hormon bağlantılı kanserler (prostat kanseri, meme kanseri, rahim kanseri ve yumurtalık kanseri) gibi hastalıklar endokrin sistemdeki aksaklıklarla ilişkilendirilmektedir (Safe ve ark., 2010 ve Cole, 2016). Kısacası, endokrin sistemin bozulması endokrin yolaklardaki iletişimin doğal ve/veya sentetik kimyasalların müdahalesiyle olumsuz etkilenmesi ve bunun sonucunda vücuttaki fizyolojik ve hormonal dengenin bozulması olarak ifade edilebilir (Cooke ve ark., 2013). Endokrin yolaklara müdahale uyarılma (hormon reseptörleri üzerine agonist etki) ya da inhibisyon (hormon reseptörleri üzerine antagonist etki) şeklinde gözlenmektedir.

Bu bağlamda; endokrin bozucu kimyasalların (EBK) ilk kez tanımlanması Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (EPA) tarafından 1996'da şu şekilde yapılmıştır: Endojen hormonlara ve hormonal yolaklara müdahale ederek homeostazı bozan ve endokrin sistemin normal fonksiyonlarını olumsuz etkileyen kimyasallar veya kimyasal karışımları (Azzouz ve ark., 2019). EBK'lar çok çeşitli kimyasal gruplarını kapsayan geniş bir sınıftır ve bunlara maruziyet yolları ve vücutta oluşan olumsuz sonuçlar her biri için farklılık gösterebilir. Çizelge 1.1'de en çok bilinen EBK'lar özellikler, endüstriyel kullanım ve endokrin bozucu etki açısından değerlendirilmiştir.

Çizelge 1.1. En çok bilinen EBK'ların sınıflandırılması

Grup	Özellikler	Endüstriyel Kullanım	Endokrin Bozucu Etki	Kaynak
Alkilfenoller/ Fenoller	Kimyasal yapıda fenolik halka ve alkil zinciri bulunur.	Endüstriyel yüzey aktif madde olarak, reçine üretiminde, temizlik maddeleri, tekstil ürünleri ve plastiklerin yapısında.	Sperm üretiminin ve fertilitenin azalması, feminizasyon.	(Belkhams ve ark., 2016 ve Akhbarizad eh ve ark., 2020)
Bisfenoller (BP'ler)	İkili hidroksifenol yapısı taşır.	Bağlayıcı, güçlendirici, plastikleştirici, yapıştırıcı ve dolgu malzemesi olarak plastiklerin yapısında.	Östrojenik ve anti-androjenik etki, gonadal gelişim, üreme sistemi, tiroit hormonları ve fetüste olumsuz etkiler.	(Noszczyńs ka ve Piotrowska-Seget, 2018 ve Kubiak ve Biesaga, 2019)
Poliklorlu bifeniller	$C_{12}H_{(10-n)}Cl_n$ kimyasal formülündeki klor sayısı kalıcılık seviyesini belirler.	Alev geciktirici olarak ve boyaların, plastiklerin ve pestisitlerin yapısında.	Steroit hormonların, tiroit hormonlarının ve üreme sisteminin fonksiyonlarını bozar.	(Helou ve ark., 2019 ve Belenguer-Sapiña ve ark., 2020)

Çizelge 1.2. Devam En çok bilinen EBK'ların sınıflandırılması

Grup	Özellikler	Endüstriyel Kullanım	Endokrin Bozucu Etki	Kaynak
Parabenler	Para-hidroksibenzoik asidin sentetik aril ve alkil esterleri.	Gıdalarda, kozmetik ve bakım ürünlerinde ve farmasötik ürünlerde koruyucu olarak.	Östrojen reseptörlerine bağlanma, malin melanom ve meme kanseri riskini arttırma.	(Nowak ve ark., 2018 ve Matwiejczuk ve ark., 2020)
Triklozan	Kimyasal formülü 5-kloro-(2,4-diklorofenoksi)fenol'dür.	Antimikrobiyal özelliği sayesinde temizlik ve kişisel hijyen ürünlerinin içeriğinde, plastik katkı maddesi olarak.	Hipotalamus, hipofiz ve tiroit bezleri arasındaki iletişimin bozulması, çocuklarda nörogelişimsel bozukluklar, meme kanseri ve yumurtalık kanseri oluşum riskinde artış.	(Montagnini ve ark., 2018; Nag ve ark., 2018 ve Guo ve ark., 2020)
Ftalatlar	1,2-benzen-dikarboksilik asidin dialkil ve aril esterleri	Plastikleştirici olarak plastik polimerlerin yapısında.	Anti-androjenik etkiler ve erkek üreme sisteminde bozukluklar.	(Witorsch ve Thomas, 2010 ve Koniecki ve ark., 2011)

Çizelge 1.3. Devam En çok bilinen EBK'ların sınıflandırılması

Grup	Özellikler	Endüstriyel Kullanım	Endokrin Bozucu Etki	Kaynak
Pestisitler	Bitkilere zarar veren canlılara karşı kullanılan ajanlar	Gıda kaynaklarını korumak için üretilen ürünlerde.	Anti-androjenik ve östrojenik etkiler, tiroit tümörlerine neden olma, steroit reseptörlere bağlanma.	(Stoker ve Kavlock, 2010 ve Abubakar ve ark., 2020)
Doğal ve sentetik cinsiyet hormonları	Çeşitli östrojenik ve progestojenik hormonlar ve bunların türevleri	Tıbbi amaçlarla farmasötik preparatların bileşiminde.	Feminizasyon, hermafroditizm, fertilite azalması.	(López De Alda ve Barceló, 2000)

EBK'ların günlük hayatta kullandığımız pek çok ürünün içeriğinde yer alarak geniş bir kullanım alanına sahip olması, bu kimyasallara maruziyetin kaçınılmaz olduğunu göstermektedir. Buna ek olarak uzun süreli ve kümülatif maruziyet de zararlı etkileri arttırmaktadır. Bu nedenle, Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) ve Avrupa Komisyonu (EC) gibi uluslararası otoriteler tarafından belirlenen "kabul edilebilir günlük alım" ve "izin verilen en yüksek derişim" gibi limitlerle yasal düzenlemeler yapılmıştır.

1.2.1. Bisfenoller

EBK'lar içerisinde en çok öne çıkan ve en geniş kapsamlı grup bisfenollerdir (BP'ler). Temel olarak; ikili hidroksifenol yapısı taşıyan ve bu yapının çeşitlenmesiyle

oluşan farklı BP türevlerinden meydana gelen bu grup, endüstriyel anlamda geniş bir kullanım alanına sahiptir. BP'lerin en bilineni ve grubun prototipi diyebileceğimiz BPA ve BPS, BPB, BPF gibi diğer bileşiklerin temel kullanım alanı polimer plastiklerin ve epoksi reçinelerin üretim sürecindedir (Noszczyńska ve Piotrowska-Seget, 2018). Günlük hayatta kullandığımız pek çok plastik ürün (su şişeleri, yiyecek-içecek kapları, oyuncaklar, biberonlar gibi bebek ürünleri ve spor ekipmanları vb.) bir veya birden fazla BP türevi içerebilir. Bu da sürekli ve birikim şeklinde bir maruziyetin söz konusu olabileceğini göstermektedir (Caballero-Casero ve ark., 2016).

Özellikle son yıllarda "BPA içermez" ifadesi ile pazarlanan plastik ürünlerde yadsınamaz bir artış görmekteyiz. Ancak bu ifadeler doğru bile olsa diğer BP analogları alternatif olarak kullanılmış olabileceği için bu tür ürünlerin de tamamen güvenli olduğunu söyleyemeyiz. Çünkü BPA ve diğer BP'lerin benzer kimyasal yapıları, benzer endüstriyel kullanım ile birlikte benzer endokrin bozucu etkileri de beraberinde getirir (Noszczyńska ve Piotrowska-Seget, 2018).

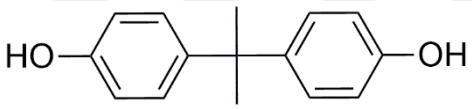
BP'lerin, içeriğinde bulunduğu plastiklerden temas eden gıda ve içeceklere geçiş ve toksisite profilleri, endokrin bozucu etkileri, ticari ürünlerde ve çevre numunelerinde analizi güncelliğini koruyan araştırma konularıdır. BP'lerin tayini, özellikle biyolojik sıvılar ve ticari ürünler gibi hedef analiti çok düşük derişimlerde ve pek çok farklı moleküle birlikte içeren karmaşık ortamlarda oldukça zordur. Bu nedenle, BP'lerin analizi için uygulaması kolay, hassas, seçici, düşük maliyetli ve hızlı sensörler geliştirilmesi oldukça önemlidir.

1.3. Tez kapsamında çalışılan bisfenoller

1.3.1. Bisfenol A

BPA, kimyasal olarak 2,2-bis(4-hidroksifenil)propan (Şekil 1.1.) şeklinde ifade edilir ve BP'lerin en çok kullanılan ve araştırılan üyesidir. BPA'nın endüstriyel

kullanımdaki temel işlevi plastik üretim sürecinde plastikleştirici, bağlayıcı, güçlendirici ve dolgu ajanı olarak kullanılmasıdır (Kubiak ve Biesaga, 2019). BPA temelli plastikler kullandığımız sayısız ürünün (yiyecek içecek kapları ve su şişeleri, spor ekipmanları, tıbbi ekipmanlar, biberon ve mama kapları, oyuncaklar…) yapısında yer almaktadır. Buradaki en büyük tehlike BPA'nın plastikten yiyecek içeceklere geçmesidir. Yüksek sıcaklık, güneş ışığı, asidik ya da bazik koşullar gibi etkenler bu geçişi hızlandırabilir. Sonuç olarak, kullandığımız bu plastik ürünler dolayısıyla sürekli ve kümülatif bir BPA maruziyeti ile karşı karşıyayız (Noszczyńska ve Piotrowska-Seget, 2018).



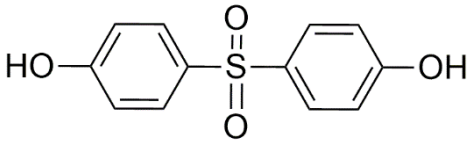
Şekil 1.1. BPA'nın kimyasal yapısı.

Avrupa Birliği (AB) tarafından BPA için kabul edilen günlük alım 4 µg/kg vücut ağırlığı olarak belirlenmiştir. Bunun aşılmaması için de plastikten geçiş sınırı 0.05 mg BPA/kg gıda olmalıdır (Kubiak ve Biesaga, 2019). BPA'ya maruziyet sonucu görülebilecek endokrin bozucu etkiler şunlardır: Östrojenik aktivite, üreme sistemi bozuklukları, obezite ve kanser riskinde artış, büyüme bozuklukları, davranışsal bozukluklar ve bağışıklık sisteminde bozukluklar (Rocha ve ark., 2016; Willhite ve Daston, 2019 ve Ramadan ve ark., 2020).

Tüm bunlar göz önünde bulundurulduğunda BPA'nın biyolojik sıvılarda ve plastiklerle temas eden gıda ve sularda tayini için yüksek hassasiyete, düşük teşhis sınırı ve tayin alt sınırı değerlerine, seçiciliğe sahip, hızlı ve kullanımı kolay sensörler geliştirilmesi, maruziyetin erken dönemde önlenebilmesi, toksik seviyelere ulaşmadan BPA varlığının belirlenmesi ve ticari ürünlerin güvenlik profillerinin değerlendirilmesi açısından büyük önem taşır.

1.3.2. Bisfenol S

BPA'nın endokrin bozucu etkilerinin pek çok çalışmayla kanıtlanmış olması dolayısıyla BPA kullanımı uluslararası otoriteler tarafından takip edilmektedir ve kısıtlanmıştır (Zhang ve ark., 2021). Bu durum endüstriyel kullanım açısından BPS [4-(4-hidroksifenil)sülfonilfenol)] gibi türevleri öne çıkarmıştır (Şekil 1.2.). BPS termal kağıtların, epoksi ürünlerin içeriğinde ve yanma geciktirici olarak kullanılır. BPS'nin BPA ile benzer yapıya ve özelliklere sahip olması kullanım alanları açısından avantaj sağlar. Öte yandan bu benzer yapı, endokrin bozucu özelliklerin de benzerliğini beraberinde getirir. Hatta BPS'nin üreme sistemi üzerindeki olumsuz etkilerinin BPA'ya kıyasla daha fazla olduğu birtakım çalışmalarla kanıtlanmıştır (Noszczyńska ve Piotrowska-Seget, 2018). Buna ek olarak BPS anti-androjenik etkiler, kan şekeri regülasyonunda bozukluklar, erken ergenlik, hiperaktivite, kardiyak ve nörolojik sistem bozuklukları gibi endokrin bozucu etkiler gösterir (Eladak ve ark. 2015 ve Grandin ve ark., 2019).

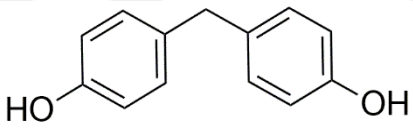


Şekil 1.2. BPS'nin kimyasal yapısı.

BPS üzerine yapılan çalışmaların oldukça kısıtlı olması ve plastik ürünlerde BPS kullanımı konusunda yasal sınırlamaların bulunmaması BPS ile ilgili tehlikenin de çok ciddi boyutlarda olabileceğini göstermektedir. Ayrıca, BPS'nin çeşitli ortamlarda tayini üzerine yapılan çalışma sayısı da sınırlıdır. Tüm bunların ışığında; BPS'nin hem biyolojik numunelerden hem de plastik şişe sular gibi numunelerden tayini için düşük konsantrasyonlarda tayin yapabilen, seçici, hassas, uygun fiyatlı ve hızlı sensörlere ihtiyaç vardır.

1.3.3. Bisfenol F

BPA alternatifi olarak ve çeşitli amaçlarla kullanılmakta olan bir diğer BP grubu üyesi BPF (4,4′-dihidroksisifenil-metan)'dir (Şekil 1.3). BPF'nin plastiklerin yapısındaki temel görevi dayanıklılık arttırıcı özelliğidir. Buna ek olarak epoksi reçineler ve vernikler gibi kaplamaların içeriğinde de yer alır (Usman ve ark., 2019; ve Huang ve ark., 2020). BPF de BPS gibi üzerine yapılan araştırmalar ve çalışmalar konusunda BPA'ya kıyasla geri planda kalmış bir BP türevidir. Yine de çeşitli çalışmalarla kanıtlanmış endokrin bozucu etkileri göz ardı edilemeyecek boyuttadır. Bunlardan en bilinenleri şu şekilde özetlenebilir: Fetüs üzerinde olumsuz etkiler, DNA hasarı, östrojenik, anti-adrojenik ve projesteronik etkiler, gelişimsel bozukluklar. BPF'nin gıdalarla ve suyla temas eden kapların içeriğinde kullanımı sonucu oluşan maruziyet, BPF'nin oral yolla absorbe edilip vücutta dağılmasıyla sonuçlanır. Yüzey sularından içme suyuna, atık sulardan toprağa kadar pek çok çevresel örnekte BPF'ye rastlanmıştır (Usman ve ark., 2019 ve Bousoumah ve ark., 2021).



Şekil 1.3. BPF'nin kimyasal yapısı.

Aslında düşük derişim seviyelerinde olduğu için göz ardı ediliyor olsa da günlük olarak birçok yoldan BPF'ye maruz kalmaktayız. Bu da başlangıçta zararsız gibi düşünülse de kronik maruziyet ile birlikte kümülatif etkilere neden olabilir. Bu açıdan değerlendirildiğinde BPF'nin erken dönemde ve çok düşük derişimlerde bile, özellikle kompleks ortamlarda, tayini için sensör geliştirilmesine yönelik çalışmalar yürütülmelidir. Geliştirilecek sensör yüksek hassasiyette, seçicilikte ve kararlılıkta olmalıdır.

1.4. Tez kapsamındaki bisfenollere ait literatür çalışmaları

Bu bölümde, tez kapsamında çalışılan BP'ler olan BPA, BPS ve BPF analizine yönelik çeşitli analitik yöntemler kullanılarak yapılmış çalışmalar özetlenmiştir.

1.4.1. Ayrıma teknikleri ile yapılmış çalışmalar

Çizelge 1.2. BPA, BPS ve BPF tayinine yönelik ayırma teknikleri ile yapılmış çalışmalar

Analit	Yöntem	Çalışma aralığı	Teşhis sınırı	Uygulama	Geri kazanım	Kaynak
BPA BPF	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK)	0.5 – 200 ng/mL 0.2 – 200 ng/mL	0.042 ng/mL 0.055 ng/mL	Süt	%94.8 – %111.8	(Liu ve ark., 2022)
BPF BPA	YPSK	1 – 500 µg/L 2 – 500 µg/L	0.20 µg/L 0.57 µg/L	Nehir suyu	%90.4 – %101.9	(Chen ve ark., 2021)
BPA BPS BPF	Ultra performans sıvı kromatografisi (UPSK)/Kütle spektrometrisi (KS)	0.2 – 200 ng/mL	0.51 µg/kg 0.03 µg/kg 0.29 µg/kg	Hayvan yemi	%82.6 – %109.6	(Wang ve ark., 2021)
BPA BPS BPF	UPSK-KS/KS	0.05 – 25 µg/kg	0.05 µg/kg 0.02 µg/kg 0.05 µg/kg	Yumurta	%82.7 – %105.2	(Xiao ve ark., 2020)

Çizelge 1.2. Devam BPA, BPS ve BPF tayinine yönelik ayırma teknikleri ile yapılmış çalışmalar

Analit	Yöntem	Çalışma aralığı	Teşhis sınırı	Uygulama	Geri kazanım	Kaynak
BPA	Gaz kromatografisi (GK)-KS	1.1 – 1031 µg/kg	0.3 ng/g	Şişe su Atık su	%89.5 – %102.2	(Bodur ve ark., 2020)
BPA BPS BPF	GK-KS	-	0.15 µg/kg 0.4 µg/kg 0.4 µg/kg	Konserve et örnekleri	%67 – %98	(Cunha ve ark., 2020)
BPA	UPSK-KS/KS	1 – 100 µg/L	0.01 µg/L	Plastik şişe su	%96.81 – %99.77	(Moid AlAmmari ve ark., 2020)
BPA BPS	(SK)-KS/KS	2.5 – 20 ng/mL 0.5 – 20 ng/mL	0.02 ng/mL 0.01 ng/mL	İdrar	%101 – %108	(Silveira ve ark., 2020)
BPA BPS BPF	SK-MS/MS	0.2 – 12 ng/mL 0.5 – 8.5 ng/mL 0.5 – 29 ng/mL	0.066 ng/mL	İdrar	%85 – %104	(Sanchis ve ark., 2019)
BPA	YPSK-KS	0 – 500 µg/L	0.072 µg/L	Çay	%94 – %108	(Alnaimat ve ark., 2019)
BPA	UPSK-KS/KS	0.15 – 200 ng/L	1 ng/L	Musluk suyu Yüzey suyu Atık su	%86 – %114	(Goeury ve ark., 2019)

Çizelge 1.2. Devam BPA, BPS ve BPF tayinine yönelik ayırma teknikleri ile yapılmış çalışmalar

Analit	Yöntem	Çalışma aralığı	Teşhis sınırı	Uygulama	Geri kazanım	Kaynak
BPA BPS BPF	UPSK-KS/KS	0.5 – 50 ng/g	0.2 ng/g 0.3 ng/g 0.2 ng/g	İnsan plasentası	%93 – %128	(Van Overmeire ve ark., 2019)
BPA	UPSK	0.5 – 100 ng/L	0.2 ng/L	Musluk suyu Göl suyu Nehir suyu	%87.5 – %96.3	(Zhao ve ark., 2019)
BPA BPS BPF	SK-KS/KS	1 – 20 ng/mL	0.03 ng/mL 0.02 ng/mL 0.08 ng/mL	İdrar	%91 – %102	(Rocha ve ark., 2018)
BPA BPS BPF	YPSK-KS/KS	0.05 – 5 ng/mL	0.009 ng/mL 0.022 ng/mL 0.012 ng/mL	İnsan kan serumu	%96 – %123.4	(Owczarek ve ark., 2018)

1.4.2. Spektrofotometrik yöntemler ile yapılmış çalışmalar

Çizelge 1.3. BPA tayinine yönelik spektrofotometrik yöntemler ile yapılmış çalışmalar

Analit	Yöntem	Çalışma aralığı	Teşhis sınırı	Uygulama	Geri kazanım	Kaynak
BPA	Ultraviyole (UV) spektrofotometri	-	3.5 µg/L	Şişe su Musluk suyu Göl suyu Nehir suyu Artezyen kuyu suyu Sızıntı suyu	%98.9 – %113.0	(Huelsmann ve Martendal, 2020)
BPA	UV-görünür spektrofotometri	1.2 – 160 µg/L	0.35 µg/L	Şişe su Süt ve süt ürünleri Çeşitli gıdalar (ketçap, fındık, çikolata vb.)	%94 – %103	(Yıldırım ve ark., 2017)
BPA	UV-görünür spektrofotometri	0.1 – 200 ng/mL	0.05 ng/mL	Plastik poşet Pipet Plastik bardak Maden suyu şişesi	%95 – %104.3	(Zhang ve ark., 2014)
BPA	UV-görünür spektrofotometri	0.24 – 8.4 µg/mL	0.15 µg/mL	Şişe su	%94.9 – %106.1	(Zhuang ve ark., 2014)

1.4.3. Elektrokimyasal yöntemler ile yapılmış çalışmalar

Çizelge 1.4. BPA, BPS ve BPF tayinine yönelik elektrokimyasal yöntemler ile yapılmış çalışmalar

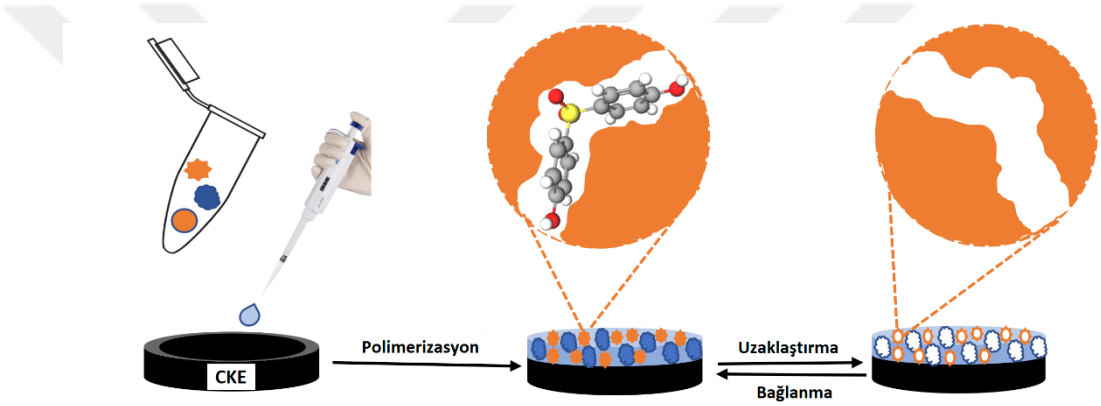
Analit	Yöntem	Çalışma aralığı	Teşhis sınırı	Uygulama	Geri kazanım	Kaynak
BPA BPS	Diferansiyel puls voltametrisi	0.5 – 30 µM	0.15 µM	Polikarbonat plastik şişe Maden suyu şişesi Plastik kutu Hermetik çanta	%80 – %119.3	(Huang ve ark., 2022)
BPA	Kare dalga adsorptif sıyırma voltametrisi	0.876 – 35 µM	0.219 µM	Musluk suyu Nehir suyu	%95 – %110	(Hoshyar ve ark., 2021)
BPA	Diferansiyel puls voltametrisi	0.75 – 600 µM	132 nM	Plastik gıda ambalajı Maden suyu şişesi	%98.7 – %99.5	(Zhu ve ark., 2021)
BPF	Dönüşümlü voltametri	0.05 – 20 µM	5 nM	Nehir suyu	%90.1 – %110	(Xing ve ark., 2021)
BPA	Diferansiyel puls voltametrisi	0.05 – 4 µM	0.028 µM	Göl suyu	%95.7 – %105.4	(Wang ve ark., 2021)
BPA BPS	Diferansiyel puls voltametrisi	0.1 – 50 µM 0.5 – 50 µM	0.02 µM 0.09 µM	Maden suyu şişesi Polikarbonat plastik şişe Biberon	%87 – %92.2	(Pang ve ark., 2020)
BPA BPS	Kare dalga voltametrisi	0.1 – 50 mg/L 0.2 – 80 mg/L	0.03 mg/L 0.06 mg/L	Musluk suyu Maden suyu Göl suyu	%95 – %98	(Freitas ve ark., 2020)
BPS	Diferansiyel puls voltametrisi	1×10^{-8} – 5×10^{-5} M	1.12×10^{-8} M	Maden suyu şişesi Tek kullanımlık kağıt bardak	%93.6 – %107	(Yao ve ark., 2019)

Çizelge 1.4. Devam BPA, BPS ve BPF tayinine yönelik elektrokimyasal yöntemler ile yapılmış çalışmalar

Analit	Yöntem	Çalışma aralığı	Teşhis sınırı	Uygulama	Geri kazanım	Kaynak
BPA	Diferansiyel puls voltametrisi	0.01 – 120 μM	5.273×10^{-10} M	Tek kullanımlık plastik kaşık Tek kullanımlık yemek kabı Musluk suyu Süt Maden suyu	%95.17 –%110.7	(Yao ve ark., 2019)
BPA	Diferansiyel puls voltametrisi	0.1 – 8 nM	0.03 nM	Maden suyu Süt Portakal suyu	%97.5 – %120.5	(Baghayeri ve ark., 2018)
BPS	Diferansiyel puls voltametrisi	0.1 – 50 μM	0.03 μM	Maden suyu Biberon Gıda ambalajı	%96.2 – %100	(Rao ve ark., 2018)
BPA	Diferansiyel puls voltametrisi	0.01 – 49.57 μM	0.003 μM	Musluk suyu	%94.3 – %105	(Dang ve ark., 2018)
BPS	Diferansiyel puls voltametrisi	0.009 – 1 μM	3×10^{-10} M	Atık su Süt	%98.1 – %104.9	(Wei ve ark., 2017)
BPA	Doğrusal süpürme voltametrisi	0.2 – 20 mg/L	0.03 mg/L	Oyuncak İçecek şişesi	%86.7 – %102.8	(Li ve ark., 2016)
BPF	Diferansiyel puls voltametrisi	0.12 – 6.01 μg/mL	0.11 μg/mL	Su şişesi Süt ambalajı Meyve suyu ambalajı	%93.8 – %105.3	(Wang ve ark., 2014)

1.5. Moleküler baskılama teknolojisi ve moleküler baskılı polimerler (MIP'ler)

Moleküler baskılama teknolojisi MIP'ler yardımıyla moleküler bir anahtar-kilit ilişkisi oluşturma yaklaşımlarını kapsar. Moleküler baskılama ise kalıp (hedef) molekülü seçici olarak tanıyabilen boşluklara sahip sentetik polimerik yapılar oluşturmak için gerçekleştirilen polimerizasyon ve daha sonra kalıp molekülün uzaklaştırılması sürecidir (Şekil 1.4.) (Chen ve ark., 2016).



Şekil 1.4. MIP hazırlama adımlarının şematik gösterimi.

MIP'ler spesifik bağlanma bölgeleri ile yüksek seçicilik sağlama, yüksek stabilite, kolay hazırlanabilme, uygun fiyatlı olma ve sağlamlık gibi avantajları sayesinde pek çok alana yayılan geniş bir kullanıma sahiptir. Bunlara örnek olarak; ekstraksiyon, ayırma ve saflaştırma, sensör geliştirme, ilaç taşıyıcı sistemler ve kromatografik uygulamalar verilebilir (Chen ve ark., 2019). Bu kadar geniş ve çeşitli kullanım alanına sahip olmasına karşın moleküler baskılama teknolojisinin geliştirilmesine yönelik çalışmalara hala ihtiyaç vardır. Özellikle kullanılmakta olan monomerlerin geliştirilmesi ve çeşitlendirilmesi, diğer alanlarla entegrasyonun sağlanması üzerine araştırmalar devam etmektedir.

MIP'lerin temelini oluşturan anahtar-kilit etkileşiminde genellikle non-kovalent etkileşimler (van der Waals bağları, hidrojen bağları, iyonik ve hidrofobik etkileşimler gibi) rol oynar (Kryscio ve Peppas, 2012). Hedef molekül olarak ise küçük ve büyük yapılı pek çok molekülün (ilaçlar, proteinler, metal iyonları, biyobelirteçler, hücreler vb.) tercih edilebilmesine olanak sağlayan çok yönlülük söz konusudur. Bu sayede de analitik sensör uygulamalarında seçiciliği arttırmak için MIP'ler kullanılmaktadır.

MIP'leri oluşturan temel bileşenler fonksiyonel monomer, kalıp (hedef) molekül, çapraz bağlayıcı, başlatıcı ve çözücüdür. Bu bileşenlerin en uygun şekilde seçimi ve oranlarının belirlenmesi stabil ve etkili bir polimer oluşumunu doğrudan etkiler (Chen ve ark., 2016 ve Malik ve ark., 2019).

1.5.1. MIP'lerin bileşenleri

1.5.1.1. Hedef (kalıp) molekül

Bir MIP tasarlanırken analizi yapılmak istenen analit hedef (kalıp) molekül olarak seçilir. Bu aşamada, çeşitli farmasötiklerden kontaminasyon ajanlarına, pestisitlerden hormonlara kadar pek çok bileşik seçilebilir, ancak burada amaç geliştirilecek olan MIP'in hedef moleküle spesifik ilgisinin olması ve analiz aşamasında seçici olarak bağlanabilmesidir. Hedef molekülün taşıması gereken önemli özellikler polimerizasyon sürecinde dayanıklı kalabilmesi ve polimerizasyonu önleyecek kimyasal yapıda olmamasıdır. Moleküler baskılama tekniği her ne kadar çok sayıda analite uygulanabilir olsa da biyolojik makromoleküllerin polimerizasyonu daha zorlayıcı olmaktadır. (Chen ve ark., 2016 ve Adumitrăchioaie ve ark., 2018).

Bazı çalışmalarda birden fazla analiti eş zamanlı analiz edebilmek için çoklu kalıp molekül baskılama tekniği de uygulanmıştır, ancak bu yaklaşımda seçiciliğin daha düşük olması söz konusudur. Öte yandan, pahalı olan ya da polimerizasyona uygun olmayan hedef moleküller yerine yapı olarak bunlara oldukça benzer olan türevler

kullanılması sahte baskılama stratejisi olarak son yıllarda incelenmektedir (Chen ve ark., 2016).

1.5.1.2. Fonksiyonel monomer

Fonksiyonel monomerin MIP oluşturulmasında en önemli görevi fonksiyonel grupları sayesinde kalıp molekülle polimerizasyon öncesi kompleks oluşturmaktır. Bu nedenle de kalıp molekülle en uygun şekilde etkileşen, stabil bir polimer oluşturan monomerin seçilmesi kritiktir. Buna ek olarak, kullanılacak fonksiyonel monomer ve kalıp molekülün derişim oranları da istenen polimerizasyonun gerçekleşebilmesi için kritik bir parametredir. Eğer fonksiyonel monomer oranı çok yüksek olursa polimerizasyona katılmamış aşırı monomerler spesifik olmayan bağlanma bölgeleri oluşturabilir (Turiel ve Esteban, 2019 ve Włoch ve Datta, 2019).

Günümüzde en sıklıkla kullanılan monomerlere örnek olarak anilin (ANI), metakrilik asit, hidroksietilmetakrilat (HEMA), orto-fenilendiamin (o-PD), 4-vinil piridin ve β-siklodekstrin verilebilir (Chen ve ark., 2016 ve Turiel ve Esteban, 2019).

1.5.1.3. Çapraz bağlayıcı

Polimerizasyon sürecinde kullanılması her zaman gerekli olmayan çapraz bağlayıcılar kalıp molekül uzaklaştırıldıktan sonra da bozulmayan sağlam ve stabil bir polimer oluşturmak, polimerin gözenekli yapısını arttırmak ve fonksiyonel monomerin kalıp molekül çevresinde sabitlenmesini sağlamak amacıyla kullanılır. Polimer oluşturulurken çapraz bağlayıcı derişimi ve oranı dikkatlice belirlenmelidir çünkü çapraz bağlayıcı MIP'in morfolojisi, stabilitesi, bağlanma özellikleri ve seçiciliği ile doğrudan ilişkilidir. Yeterli miktarda çapraz bağlayıcı kullanılmaması polimerdeki tanıma bölgelerinin oluşmamasına neden olurken aşırı miktarda kullanılması ise bu bölgelerin az sayıda oluşmasıyla sonuçlanabilir (Turiel ve Esteban, 2019 ve Song ve ark., 2022).

MIP uygulamalarında en öne çıkan çapraz bağlayıcı etilen glikol dimetakrilattır (EGDMA). Bunun yanı sıra divinil benzen, trimetilolpropan trimetakrilat, tetraetoksisilan (TEOS) ve trimetilpropan trimetakrilat da sıklıkla kullanılan çapraz bağlayıcılar arasındadır (Chen ve ark., 2016 ve Turiel ve Esteban, 2019).

1.5.1.4. Başlatıcı

Polimerizasyonun başlaması genellikle azo- ve peroksi- yapılı bileşikler kullanılarak tetiklenir ve fotopolimerizasyon, elektropolimerizasyon ve serbest radikal polimerizasyonu gibi süreçler zincir reaksiyon şeklinde devam eder. Polimerizasyon gerçekleştirilirken başlatıcı her zaman kullanılmayabilir. En çok tercih edilen başlatıcılar ise termal başlatıcılar içinde incelenen benzoil peroksit ve azo-bis-izobütironitrildir. Bunlara ek olarak, çeşitli redoks başlatıcıları ve foto-başlatıcılar da kullanılmaktadır (Adumitrăchioaie ve ark., 2018 ve Malik ve ark., 2019) .

1.5.1.5. Çözücü

Çözücülerin polimerizasyon sürecindeki işlevleri gözenek oluşturucu olarak görev yapmak ve polimerizasyon reaksiyon ortamını oluşturmaktır. En çok kullanılan çözücülerden kloroform, asetonitril ve tolüen gibi düşük polaritede ya da polar olmayan çözücüler kovalent olmayan baskılamada tercih edilir. Polar özellikteki çözücüler ise (metanol ve dimetilformamit gibi) ise kovalent baskılama için kullanılmaktadır. Çözücünün türü ve polaritesi; polimerin gözenek yapısı, monomer-kalıp molekül etkileşimi ve kalıp molekülün etkin şekilde uzaklaştırılması ile ilişkilidir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda en uygun çözücünün seçimi için teorik hesaplamalara dayanan yaklaşımlar üzerine de çalışılmaktadır (Chen ve ark., 2016 ve Włoch ve Datta, 2019).

1.5.2. Moleküler baskılama stratejileri

MIP'ler oluşturulurken çeşitli baskılama yöntemleri kullanılabilir. Bunların başlıcaları kovalent, kovalent olmayan ve yarı kovalent baskılamadır.

Kovalent baskılamada polimerizasyon öncesi fonksiyonel monomer ve kalıp molekül arasındaki etkileşimde kovalent bağlar söz konusudur. Polimerizasyon sonrası süreçte ise diğer yöntemlerde de olduğu gibi kalıp molekülün uzaklaştırılması sağlanır ancak bu aşama kovalent bağların açılması ile gerçekleşmektedir. Bu yöntemde monomer ve kalıp molekül arasında oluşan konjugatlar kovalent bağlanma sayesinde stabil ve şiddetli polimerizasyon koşullarına dayanıklı olur. Öte yandan kovalent etkileşimin getirdiği birtakım dezavantajlar da vardır: Hedef molekülün uzaklaşması ve bağlanması daha zordur, moleküler baskılama daha şiddetli koşullarda gerçekleşir, kovalent bağların büyük çoğunluğu tersinir değildir ve fonksiyonel monomer-hedef molekül arasındaki etkileşimin oluşumu zor olabilir (Komiyama ve ark., 2003; Jiang ve ark., 2007 ve Beltran ve ark., 2010).

Kovalent olmayan baskılamada ise polimerizasyon süreçlerinde kovalent olmayan bağlar söz konusudur. Bu sayede de hedef molekülün uzaklaştırılması ve bağlanması çok daha kolay gerçekleşir ve fonksiyonel monomer-kalıp molekül konjugatı oluşmadan polimerizasyon gerçekleşebilir. Buna karşın, oluşan polimerler daha değişken ve kararsız olur ve spesifik olmayan bağlanma bölgeleri oluşabilir. Bu nedenle en etkin polimer oluşumu için ilgili parametreler özenle belirlenmelidir (Komiyama ve ark., 2003; Jiang ve ark., 2007 ve Beltran ve ark., 2010).

Yarı kovalent baskılama ise yukarıda anlatılan iki yöntemin birleşimi olarak ifade edilebilir. Bir diğer ifadeyle, polimerizasyon süreçlerinde hem kovalent hem de kovalent olmayan etkileşimler yer almaktadır. Polimerizasyon öncesi meydana gelen fonksiyonel monomer-hedef molekül konjugatı kovalent bağla oluşurken kalıp molekülün uzaklaştırıldıktan sonra yeniden bağlanması ise kovalent olmayan bağlarla

oluşur. Bu yöntemde amaç, diğer iki yöntemin dezavantajlarını elimine edip avantajlarını birleştirmektir (Jiang ve ark., 2007).

1.5.3. MIP'lerin analitik uygulamaları

MIP'lerin analitik uygulamalarını en genel anlamda; ön işlem basamağında ekstraksiyon için, kromatografide dolgu ve monolit kolon materyali olarak ve sensör uygulamaları şeklinde gruplandırmak mümkündür (Chen ve ark., 2016).

Tayin edilmek istenen analiti çok düşük miktarlarda içeren numunelerle çalışılmak istendiğinde numune hazırlanmasında çeşitli ön işlemler uygulanabilir, bunlardan en önemlisi ise ekstraksiyon teknikleridir. Katı faz ekstraksiyon, katı faz mikroekstraksiyon ve karıştırma çubuğu ile sorpsiyon gibi tekniklerde MIP'lerin üstün seçicilik performansından yararlanılmaktadır. Bu tekniklerde MIP, numuneden toplanmak istenen hedef analite seçici sorbent olarak tercih edilmektedir. Stabilite ve adsorpsiyon kapasitesinin yüksek olması MIP'leri bu alanda popüler hale getirmiş ve çok sayıda analitin çevre numuneleri ve biyolojik numuneler gibi karmaşık ortamlarda analizinde MIP temelli numune ön işlem teknikleri etkin olarak kullanılmaktadır (Haginaka, 2009; Chen ve ark., 2016 ve Madikizela ve ark., 2022).

Kromatografik ayrım tekniklerinde (YPSK, ince tabaka kromatografisi, kapiler sıvı kromatografisi ve kapiler elektrokromatografi gibi) MIP'ler diğer yöntemlerde de olduğu gibi yine hedef moleküle karşı gösterdikleri ilgi ve seçicilik sayesinde kullanılmaktadır. MIP temelli monolitler, partiküller, mikroboncuklar, silikalar ve kaplama materyalleri kromatografik yöntemlerde sabit faz olarak tercih edilebilir. MIP temelli sabit faz uygulamaları özellikle kiral bileşiklerin ve çeşitli izomerlerin kromatografik ayrımında öne çıkmaktadır. Bunların çeşitli firmalar tarafından üretilmiş ticari formları da mevcuttur. MIP temelli sabit fazların kullanıldığı kromatografik yöntemler farmasötiklerin ve çevresel kirleticilerin çeşitli

numunelerden analizinde sıklıkla kullanılmaktadır (Chen ve ark., 2016 ve Song ve ark., 2022).

MIP'lerin yüksek seçicilik avantajı sensör uygulamalarında sensörün performansını arttırmak amacıyla değerlendirilmiştir. Optik sensör uygulamaları incelendiğinde MIP'leri sensörün hem tanıma bölgesi olarak hem de dönüştürücü bölgesi olarak kullanıldığı çalışmalar olduğunu görmekteyiz. Floresans, elektrokemilüminesans, kolorimetrik, kemilüminesans, yüzey plazmon rezonans spektroskopisi ve yüzeyde güçlendirilmiş Raman spektroskopisi gibi optik temelli yöntemlerin kullanıldığı sensörlerde MIP uygulamaları literatürde mevcuttur (Fang ve ark., 2021).

Biyosensör çalışmalarında MIP'ler bir tür sentetik antikor gibi görev yaparak sensörün tanıma bölgesinin seçicilik ve afinitesini geliştirir. Bu da çeşitli dönüştürücülerle birleştirilerek elektrokimyasal, optik, termal gibi sensörler geliştirilebilir (Majdinasab ve ark., 2021).

Elektrokimyasal sensörlerde MIP'ler elektrokimyasal analizin yüksek hassasiyet, düşük maliyet, kullanım kolaylığı gibi avantajlarına seçiciliği de ekleyerek sensörü geliştirmesi amacıyla kullanılmaktadır. MIP'lerin elektrokimyasal sensörlerde kullanılan elektrot yüzeylerinde kolay hazırlanabilir olması, nanomateryaller ve kompozitler gibi sıklıkla kullanılan diğer elektrot modifikasyon materyalleriyle birleştirilebilmesi, moleküler baskılama teknolojisi ile elektrokimyanın çok yönlülük ve çok sayıda analite uygulanabilme açısından örtüşmesi gibi avantajlar sayesinde MIP temelli elektrokimyasal sensörler analitik uygulamalarda büyük önem taşır (Rebelo ve ark., 2021).

Bu tez çalışmasında BPA, BPS ve BPF'nin tayini için hassas, etkili, hızlı ve seçici MIP temelli elektrokimyasal sensörler geliştirilmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Elektrokimya

Elektrokimya, elektriksel ve kimyasal süreçleri bir araya getiren bir kimya alanıdır. Kimyasal reaksiyonlar sonucu oluşan elektrik enerjisi ve elektrik akımı geçişi sonucu oluşan kimyasal değişiklikler elektrokimyanın çalışma alanı kapsamındadır. Bu sayede elektrokimyasal sistemlerde incelenen analitle ilgili çeşitli bilgiler edinmek mümkündür. Elektrokimyasal sistemlerde elektron alışverişi reaksiyonları (redoks reaksiyonları, indirgenme-yükseltgenme reaksiyonları) elektrokimyasal hücre adı verilen ve elektriksel iletkenliğe sahip iki elektrodun uygun elektrolit çözeltisine daldırılmasıyla oluşan bir düzenekte gerçekleşir (Brett ve Oliveira-Brett, 1999 ve Skoog ve ark., 2018).

Yapılacak analiz için elektrokimyasal hücrede bir elektrik akımı oluşması gerekir. Bunun için de şu şartlar sağlanmalıdır: Hücredeki elektrotlar metal bir iletkenle dıştan bağlı olmalıdır, elektrolit çözeltileri iyonların hareketini sağlayacak şekilde temasta olmalıdır, elektron transfer reaksiyonu her iki elektrotta da oluşabilmelidir. Elektrokimyasal hücrelerin anot bölümünde yükseltgenme, katot bölümünde ise indirgenme meydana gelir. Elektrokimyasal hücreler galvanik ya da elektrolitik olarak sınıflandırılabilir. Galvanik hücrelerde kimyasal reaksiyon sonucu oluşan enerjinin elektrik enerjisine dönüşümü kendiliğinden gerçekleşirken elektrolitik hücrelerde elektrik enerjisinin bir dış kaynaktan sağlanması söz konusudur (Brett ve Oliveira-Brett, 1999 ve Bard ve Faulkner, 2001).

Elektrokimyasal hücrelerde yapılan elektrokimyasal ölçümlerde elektrotlarla elektron alışverişi yapabilen ve elektrotla temas halinde olan çözelti (analizi yapılacak madde çözeltisi) ile elektrot arasında oluşan ara yüzde fiziksel/kimyasal değişiklikler esastır (Skoog ve ark., 2018).

2.1.1. Elektrokimyada kullanılan elektrotlar

Elektrokimyasal hücrelerde iki ya da üç elektrotlu sistemler kullanılabilir. İki elektrotlu hücrelerde potansiyeli sabit olan bir referans elektrot ve bir çalışma elektrodu bulunur. Üç elektrotlu hücreler ise elektrokimyasal analizlerde en çok kullanılan sistemlerdir. Burada, iki elektrotlu hücrelerdeki elektrotlara ek olarak bir de yardımcı (karşıt) elektrot bulunur (Chen, 2007).

Yapılacak elektrokimyasal analizin ve analitin özelliklerine göre en uygun elektrokimyasal hücre sistemi ve elektrotlar seçilebilir (Wang, 2006).

2.1.1.1. Çalışma elektrodu

Bir elektrokimyasal hücrede çalışma elektrodu, potansiyeli referans elektroda bağlı olarak değişen ve analitle ilgili reaksiyonun gerçekleştiği elektrottur. Bu potansiyelin kontrolü potansiyostat cihazı ile yapılmaktadır. Elektrokimyasal hücre çözeltisindeki analitin elektron alışveriş reaksiyonları çalışma elektrodu yüzeyinde gerçekleşir ve analit derişimindeki değişiklikler de bu potansiyele göre farklılaşan bir akım oluşturacaktır (Chen, 2007).

Çalışma elektrodu olarak camsı karbon elektrot (CKE), karbon pasta elektrot ve perde baskılı karbon elektrot gibi karbon temelli katı elektrotlar; platin, altın ve gümüş gibi metal temelli katı elektrotlar kullanılabilir. Bunlara ek olarak asılı cıva elektrot ve damlayan cıva elektrot gibi cıva temelli elektrotlar da tercih edilebilir (Özkan ve ark., 2003; Ozkan ve ark., 2015).

2.1.1.2. Referans elektrot

Referans elektrot ideal polarize olmayan davranış gösteren, bilinen ve sabit bir potansiyele sahip elektrottur. Referans elektrodun potansiyeli analit çözeltisinin derişimine bağlı olarak değişiklik göstermez ve çalışma elektrodunun potansiyelinin karşılaştırılması için kullanılır. Bu özellikleri sağlamak için tercih edilen referans elektrotlar Ag/AgCl elektrot ve doymuş kalomel elektrot (Hg/Hg_2Cl_2) gibi redoks çiftlerinden oluşur. Doymuş kalomel elektrot doymuş Hg/Hg_2Cl_2 çözeltisi ile temas halinde civadan oluşan ve KCl içeren bir sistemdir. Ag/AgCl elektrot ise AgCl ile doyurulmuş KCl çözeltisine daldırılan Ag elektrottan oluşan bir sistemdir (Wang, 2006; Skoog ve ark., 2014 ve Ozkan ve ark., 2015).

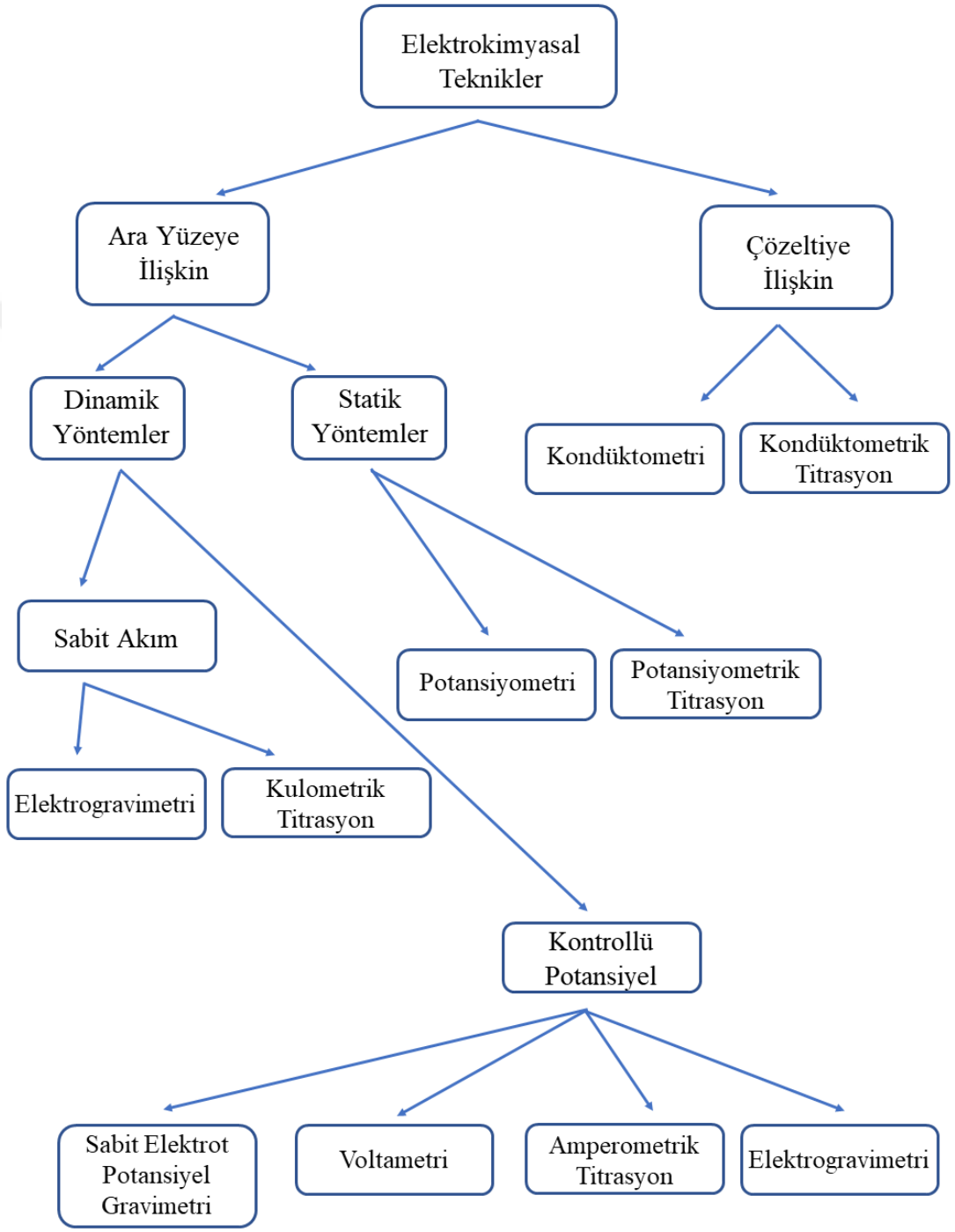
2.1.1.3. Yardımcı (karşıt) elektrot

Yardımcı (karşıt) elektrot, çalışma elektordunda gerçekleşen redoks reaksiyonunda etkisi olmaksızın çalışma elektordu için gerekli akımı sağlayan elektrottur. Bir elektrokimyasal hücre sisteminde yardımcı elektrotlar belirlenirken kimyasal olarak inert özellikte platin ve titanyum gibi metaller tercih edilir (Pletcher ve ark., 2001 ve Scholz, 2010).

2.2. Elektrokimyasal teknikler

Elektrokimyasal teknikler, analizi yapılacak maddenin çözeltisinin elektriksel özelliklerine dayanan kalitatif ve kantitatif analitik yöntemleri kapsamaktadır. Analitin akım, potansiyel ve yük gibi özellikleriyle bunların kimyasal parametrelerle olan ilişkisi ölçülür. Geniş kapsamlı bir karakterizasyon imkanı sunması, düşük teşhis sınırına ulaşabilme ve düşük maliyet gibi avantajları sayesinde elektrokimyasal teknikler çevre analizleri, biyomedikal analizler ve endüstriyel uygulamaları kapsayan çok geniş bir kullanım alanına sahiptir (Wang, 2006 ve Skoog ve ark., 2018).

Elektrokimyasal teknikler en temel anlamda ara yüzeye ilişkin ve çözeltiye ilişkin yöntemler olarak ayrılabilir. Şekil 2.1.'de elektrokimyasal tekniklerin sınıflandırılması daha detaylı olarak verilmiştir.



Şekil 2.1. Elektrokimyasal tekniklerin sınıflandırılması.

2.2.1. Polarografi

Polarografi, 1920'lerde Jaroslav Heyrovsky tarafından geliştirilen ve sonraki bölümlerde anlatılacak olan voltametrinin temelini oluşturan yöntemdir. Polarografide uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak akım ölçülmesi esastır. Bu yöntemi farklı kılan ise çalışma elektrodu olarak damlayan cıva elektrot kullanılmasıdır.

Polarografi 1960'lara kadar çeşitli inorganik iyonlar ve organik bileşiklerin analizinde yaygın olarak tercih edilen bir yöntem olsa da çalışma elektrotlarının ve kullanılan yöntemlerin gelişerek farklılaşmasıyla güncelliğini yitirmiştir (Skoog ve ark., 2018).

2.2.2. Voltametri

Polarografide olduğu gibi uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak akımın ölçüldüğü bir yöntem olan voltametri, elektrokimyasal teknikler arasında en yaygın olarak kullanılan yöntemdir. Bu tekniğin esasına daha detaylı bakılırsa; bir elektrokimyasal hücrede çalışma elektroduna uygulanan değişken potansiyel sonucu meydana gelen karakteristik akım yanıtı ölçülmektedir. Bir voltametrik analizde meydana gelen akım, kütle transferi (maddenin çözeltiden elektroda ulaşma oranı) ve yük transferi (çözelti-elektrot ara yüzeyinde oluşan elektron transferi) ile ilişkilidir. Konveksiyon, göç ya da karıştırma gibi mekanik bir etkiyle veya titreşim, sıcaklık ve yoğunluk gibi doğal etkilerle de oluşabilir. Göç ile kütle transferinde ise yüklü parçacıkların bölgesel elektrik alan ile hareketi söz konusudur. Difüzyonda ise molekül ve iyonların hareketi yüksek konsantrasyondan düşük konsantrasyon olan bölgeye doğrudur (Ozkan ve ark., 2015 ve Skoog ve ark., 2018).

Tüm elektrokimyasal reaksiyonlarda olduğu gibi voltametrik deneylerde de Nernst eşitliği söz konusudur. Yani indirgenen ve yükseltgenen türlerin konsantrasyonu ile elektrot potansiyeli arasında bir denge söz konusudur.

Elektrokimyasal hücrelerde uygulanan potansiyel sonucu meydana gelen indirgenme ve yükseltgenme reaksiyonları ile analit elektrot yüzeyine taşınır ve yüzeyde de indirgenme ya da yükseltgenme gerçekleşir. Tüm bunlar ölçülen akımı belirleyen etmenlerdir.

Voltametride incelenen elektrot reaksiyon mekanizmaları sonucu potansiyele karşı akımın grafiğe geçirilmesiyle voltamogram adı verilen grafikler elde edilir. Voltamogramlar sayesinde çeşitli kinetik, termodinamik ve analitik parametreler hakkında bilgi edinmek mümkündür. Voltametrik teknikler de uygulanan potansiyelin zamana karşı değişimine göre farklılaşmaktadır (Ozkan ve ark., 2015 ve Skoog ve ark., 2018).

2.2.2.1. Doğrusal taramalı voltametri

Elektrot potansiyelinin tek yönlü olarak belirli bir potansiyel aralığında ve tarama hızında taranmasını içeren bir yöntemdir. Potansiyel değişimi zamana karşı doğrusaldır. Elektrot reaksiyonlarıyla ilgili temel bilgiler edinmek için kullanılan bir yöntemdir (Bard ve Faulkner, 2001 ve Pletcher ve ark., 2001).

2.2.2.2. Dönüşümlü voltametri

Doğrusal taramalı voltametriye oldukça benzer olsa da dönüşümlü voltametride potansiyel taraması, potansiyel belirli bir değere ulaştıktan sonra ya başlangıç değerine ya da farklı bir değere döndürülerek yapılır. Yani potansiyel taraması isteğe göre bir ya da daha fazla döngü halinde gerçekleştirilir.

Dönüşümlü voltametri yöntemi sıklıkla kullanılan bir yöntem olup bir elektrokimyasal analizin ilk ve temel basamağı olarak değerlendirilir. En önemli

avantajı elektrokimyasal reaksiyon mekanizmaları ve elektron transfer kinetikleri hakkında bilgi sağlamasıdır. Voltamogramın pozitif alanında elde edilen pikler anodik, negatif alanında elde edilen pikler ise katodik pikleri ifade eder. Eğer pozitif ve negatif alanlardaki piklerin sadece biri elde edilmişse o elektrokimyasal reaksiyon tersinmez, eğer her ikisi de elde edilmişse tersinirdir. Bunlara ek olarak elektrot yüzeyinde gerçekleşen süreçlerin adsorpsiyon ya da difüzyon kontrollü olduğu da dönüşümlü voltametri tekniğiyle değerlendirilir (Pletcher ve ark., 2001; Ozkan ve ark., 2015 ve Skoog ve ark., 2018).

2.2.3. Puls voltametrisi

Puls voltametri teknikleri, bir elektrokimyasal analizde elde edilen bilgilerin geliştirilmesini sağlamak ve yöntemin hassasiyetini arttırmak için geliştirilen yöntemlerdir. Potansiyelin pulslar şeklinde uygulandığı puls voltametri teknikleri de pulsların uygulama şekline ve akımın ölçüldüğü zamana göre çeşitli alt yöntemlere ayrılır (Pletcher ve ark., 2001 ve Ozkan ve ark., 2015).

2.2.3.1. Kare dalga voltametrisi

Kare dalga voltametrisinde ileri ve geri şeklinde uygulanan her bir pulsun sonundan hemen önce akım ölçümü yapılarak aradaki fark hesaplanmaktadır. Oldukça hızlı ve yüksek hassasiyete sahip bir teknik olmasının yanı sıra elektrot yüzeyinin bloke olması gibi sorunların önüne geçilmesini sağlamasıyla öne çıkar. Bu nedenlerle de ilaç analizlerinde sıklıkla kullanılmaktadır (Brett ve Oliveira-Brett, 1999 ve Ozkan ve ark., 2015).

2.2.3.2. Diferansiyel puls voltametrisi

Diferansiyel puls voltametrisi (DPV), voltametrik teknikler arasında hassasiyeti en yüksek olandır. Akım ölçümü puls uygulamadan önce ve pulsun sonunda olmak üzere iki kez yapılarak aradaki fark alınır. Bu sayede voltamogramlarda elde edilen pikler analit konsantrasyonu ile doğrudan orantılıdır. DPV tekniğinin hem analitik hem kinetik amaçlarla kullanımı mümkündür. Yüksek hassasiyet ve düşük teşhis sınırı sayesinde elektrokimyasal analizde en sık tercih edilen tekniklerdendir (Pletcher ve ark., 2001 ve Ozkan ve ark., 2015).

2.2.4. Sıyırma voltametri teknikleri

Sıyırma voltametri teknikleri, analitin elektrot yüzeyinde biriktirilmesi sayesinde duyarlılığın daha da arttırılarak oldukça düşük teşhis sınırı değerlerine ulaşmayı sağlayan tekniklerdir. Sıyırma voltametrisinde seçilen süre aralığında ve belirli bir potansiyelde analit çözeltisinin karıştırılarak ya da elektrolitik olarak analitin elektrot yüzeyinde biriktirilmesi gerçekleştirilir. Hem biriktirme hem de tayin adımlarında potansiyel kontrollü yöntemler kullanılır (Brett ve Oliveira-Brett, 1999 ve Skoog ve ark., 2018).

2.2.4.1. Anodik sıyırma voltametrisi

Genellikle metal iyonlarının tayini için kullanılan bir tekniktir. Elektrot yüzeyinde biriktirme adımında analit indirgenirken tayin etme adımında yeniden yükseltgenme söz konusu olur. Düşük teşhis sınırına ulaşabilmesi, eş zamanlı çoklu analiz yapılabilmesi ve doğruluğu yüksek olan bir teknik olması sayesinde anodik sıyırma voltametrisi özellikle eser metal analizinde öne çıkan bir tekniktir (Ozkan ve ark., 2015).

2.2.4.2. Katodik sıyırma voltametrisi

Anodik sıyırma voltametrisi tekniğinin tam aksine elektrot yüzeyine analiti biriktirme adımında analit yükseltgenirken tayin etme adımında ise indirgenir. Katodik sıyırma voltametrisi genellikle inorganik iyonların ve bazı organik farmasötik moleküllerin tayininde kullanılır. Girişim ve seçicilik sorunları nedeniyle sıklıkla tercih edilen bir teknik olduğu söylenemez (Ozkan ve ark., 2015).

2.2.4.3. Adsorptif sıyırma voltametrisi

Adsorptif sıyırma voltametrisinde anodik ve katodik sıyırma voltametri tekniklerinden farklı olarak analitin yüzeyde biriktirilmesi elektrolitik olarak değil, çözeltinin karıştırılmasıyla fiziksel adsorpsiyon ile gerçekleştirilir. Adsorpsiyon özelliği taşıyan pek çok molekülün yüksek duyarlılıkla analizini yapmak bu teknikle mümkündür. Ancak, çözeltide bulunan diğer maddelerin girişim oluşturabilmesi bu tekniğin bir dezavantajı olarak sayılabilir (Ozkan ve ark., 2015).

2.3. Analitik yöntemlerde validasyon

Analitik yöntemlerde validasyon, bir analizin analitik özelliklerini, kalitesini, güvenilirliğini ve tutarlılığını doğrulamak için yapılan içeriği ve protokolleri Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (FDA) ve Uluslararası Uyum Konferansı (ICH) gibi uluslararası otoritelerce düzenlenen kılavuzlarla belirlenen çalışmalar bütünüdür. Yeni bir yöntem geliştirildiğinde ya da mevcut bir yöntem yeni bir moleküle uygulanacağında yöntemin valide edilmesi gerekmektedir. Analiz için geliştirilen bir analitik yöntemin validasyonunun yapılması o yöntemin hedeflenen amaca uygun olduğunu kanıtlaması açısından da önemlidir (Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 1995; Ozkan ve ark., 2015). Validasyon çalışmalarında

değerlendirilmesi gereken validasyon parametreleri sonraki bölümlerde açıklanacaktır.

2.3.1. Seçicilik

Analitik yöntemlerde validasyon yapılırken ilk değerlendirilen parametre seçiciliktir. ICH Kılavuzu seçicilik kavramını "Ortamda safsızlıklar, bozunma ürünleri ve analiz yapılan ortama ait diğer bileşikler gibi maddelerin varlığında analitin kesin ve doğru olarak tayin edilebilmesi." şeklinde tanımlar (Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 1995). Seçicilik, geliştirilen yöntemin hedef analiti diğer yakın ilişkili maddeler ile kalitatif ve kantitatif olarak ayırt edebilme yeteneği olarak ifade edilebilir. Bir yöntemin doğru ve güvenilir bir analiz yaptığını söyleyebilmek için seçicilik doğrudan etkili bir parametredir. Çünkü analiz ortamında bulunan ve girişim etkisi oluşturabilen bileşikler analizlerde hatalara neden olabilir. Bu nedenle de bir yöntemin seçiciliği değerlendirilirken girişim etkili herhangi bir madde bulunmayan ortamda elde edilen sonuçlarla, safsızlıklar ya da analite benzer yapılı moleküller gibi girişim etkili maddelerin eklendiği ortamda alınan sonuçlar karşılaştırılır (Swartz ve Krull, 2012 ve Ozkan ve ark., 2015).

2.3.2. Doğrusallık

Doğrusallık, belirli bir aralıkta analitin farklı derişimlerine ait ölçülen yanıtın analit derişimiyle doğru orantılı olmasıdır (Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 1995). Doğrusallık değerlendirilirken en az beş farklı derişim analiz edilmeli ve her bir derişimde en az üç tekrarlı ölçüm alınmalıdır. Doğrusallık incelenirken regresyon analizi yapılarak elde edilen doğru denklemine ait eğim (m), kesişim (n), korelasyon katsayısı (r) ve regresyon katsayısı (r^2) parametreleri ile doğrusallık ifade edilir. Doğrusallığın gerçekleşebilmesi için r ve r^2 değerlerinin 1'e oldukça yakın (0.99) olarak elde edilmesi istenir. Bunlara ek olarak eğim ve kesişimin standart hata değerleri de hesaplanır (Ozkan ve ark., 2015).

2.3.3. Aralık

Bir analitik yöntemin aralığı, uygun düzeyde kesinlik, doğruluk ve doğrusallıkta yöntemin geçerli olduğu en yüksek ve en düşük derişim aralığıdır (Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 1995). Bu aralık, analizin amacına uygun derişimleri kapsamalıdır ve genellikle istenen derişimin %50'si ve %150'si şeklinde olması uygundur (Ozkan ve ark., 2015)

2.3.4. Teşhis sınırı

Teşhis sınırı (TS, LOD), bir analitik yöntemde numune içinde analitin teşhis edilebildiği ancak belirli bir değerle tayin edilemediği en düşük derişimdir. Birimi analitin derişimiyle ifade edilir. TS'nin yöntemin hassasiyetini doğrudan ifade eden bir parametre olmadığına dikkat edilmelidir. TS değeri belirlenirken üç farklı yöntem kullanılabilir (Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 1995 ve Ozkan ve ark., 2015):

Gözleme dayalı: Derişimleri bilinen ve düşük olan analit çözeltileri hazırlanarak ölçüm yapılır ve analitin tayin edilip edilememesi değerlendirilerek TS belirlenir.
Sinyal/gürültü oranı ile: Gözlenebilir şekilde gürültü elde edilen yöntemlerde tercih edilebilir. Bilinen düşük derişimli bir analit çözeltisi ile kör çözeltisine ait ölçümlerde elde edilen sinyaller karşılaştırılır. Sinyal/gürültü oranının genellikle 3:1 (ya da 2:1) olduğu derişim TS değeri olarak değerlendirilir.
Standart sapmaya dayalı hesaplama: Analizde elde edilen kalibrasyon doğrusunun eğimi ve elde edilen yanıtın standart sapması kullanılarak hesaplanır.

$$TS = \frac{3 \times standart\ sapma}{m}$$

2.3.5. Tayin alt sınırı

Tayin alt sınırı (TAS, LOQ), bir analitik yöntemde numune içinde analitin uygun bir kesinlik ve doğrulukla kantitatif olarak tayin edilebildiği en düşük derişimdir. TS değeri her zaman TAS değerinden daha düşüktür. TS'de olduğu gibi TAS belirlenirken de aynı yöntemler kullanılır (Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 1995; Ozkan ve ark., 2015):

Gözleme dayalı: Bilinen derişimlerde analit çözeltileri ile analitin kantitatif olarak uygun düzeyde doğruluk ve kesinlikle tayin edilebildiği en düşük derişim belirlenir.
Sinyal/gürültü oranı ile: TS belirlenirken yapılan aynı işlemler yapılır ancak sinyal/gürültü oranının 10:1 olduğu derişim TAS olarak kabul edilir.
Standart sapmaya dayalı hesaplama: Analizde elde edilen kalibrasyon doğrusunun eğimi ve elde edilen yanıtın standart sapması kullanılarak hesaplanır.

$$TAS = \frac{10 \times standart\ sapma}{m}$$

2.3.6. Doğruluk

Doğruluk, bir analitik yöntemde elde edilen değerin gerçek değere ya da kabul edilen referans değere yakınlığı olarak ifade edilir. Sistematik hata ve tesadüfi hataların toplamı doğruluk üzerinde etkilidir. Doğruluk, %geri kazanım olarak ifade edilir ve bu parametre değerlendirilirken referans standart bir yöntem ile karşılaştırma yapılabilir, gerçek numune üzerine belirli derişimlerde analit ilave edilebilir ya da kör çözelti ortamına belirli derişimlerde analit ilave edilebilir. Her bir yöntemde de analitin düşük, orta ve yüksek derişimlerinde üçer kez ölçüm yapılarak %geri kazanım hesaplanır. Genellikle %95 ve %105 aralığında %geri kazanım değerleri elde edilir.

Referans standart bir yöntem ile karşılaştırma yapılırken student-t testi ile ortalamalara dayalı, F testi ile ise standart sapmalara dayalı bir değerlendirme yapmak mümkündür. %geri kazanıma ek olarak %bağıl standart sapma (%BSS) ve %bağıl hata (%BH) değerleri de hesaplanır (Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 1995; Swartz ve Krull, 2012 ve Ozkan ve ark., 2015):

$$\%BSS = \frac{standart\ sapma}{hesaplanan\ değer\ ortalaması}$$

$$\%BH = \frac{hesaplanan\ değer\ ortalaması - gerçek\ değer}{gerçek\ değer} \times 100$$

2.3.7. Kesinlik

Bir analitik yöntemin kesinliği optimum deney şartlarında aynı numuneden yapılan bir dizi ölçümde elde edilen sonuçlarının birbirine yakınlığı (dağılım derecesi) olarak ifade edilir. Kesinlik, %BSS ile ifade edilir. Bir analitik yöntemin kesinliği üç aşamada incelenir (Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 1995; Swartz ve Krull, 2012 ve Ozkan ve ark., 2015):

Tekrarlanabilirlik: Aynı numuneyle, aynı çözeltilerle, aynı deney koşullarında, aynı araç-gereç ve cihazlarla kısa bir süre aralığında yapılan ölçümlerle elde edilen kesinliğin bir ifadesidir. Bu nedenle analiz-içi kesinlik olarak da tanımlanabilir. En az altı ölçüm yapılarak %BSS değeri hesaplanır ve miktar tayini analizlerinde en fazla %2 olması beklenir.

Orta kesinlik: Geliştirilen analitik yöntemin kesinliğini etkileyebilecek farklılıkların değerlendirilmesidir. Gün, analizi gerçekleştiren kişi ve ekipmanlardaki farklılıklar olan laboratuvar içi deneysel farklılıklar değerlendirilir. Farklı günlerde yapılan üçer ölçüm üzerinden %BSS değeri hesaplanır.

Tekrar elde edilebilirlik: Aynı analite ait aynı analiz yönteminin farklı laboratuvarlarda gerçekleştirilmesiyle elde edilen laboratuvarlar arası kesinliktir. Orta kesinlikte olduğu gibi üçer ölçüm üzerinden %BSS değeri hesaplanır.

2.3.8. Duyarlılık

Analizde elde edilen kalibrasyon doğrusunun eğimi duyarlılığı ifade eder. Eğim arttıkça duyarlılık da artar. Başka bir ifadeyle analit derişimindeki değişimle ölçülen sinyalde meydana gelen değişimdir (Burgess, 2001 ve Ozkan ve ark., 2015).

2.3.9. Sağlamlık (Kararlılık)

Geliştirilen analitik yöntemin güvenilirliğini belirten bir validasyon parametresidir. Bir analitik yöntemde elde edilen sonuçların küçük değişiklikler karşısında etkilenmeden kalabilme kapasitesi sağlamlık (kararlılık) olarak tanımlanır. Bu değişiklikler bir deney sürecinde normal olan sıcaklık, pH, tampon derişimi gibi etkileri kapsar (Chan ve ark., 2004 ve Swartz ve Krull, 2012).

2.3.10. Tutarlılık

Geliştirilen analitik yöntemle bir numune analiz edilirken laboratuvarın, analizi yapan kişinin, cihazın ya da kullanılan kimyasalların serisinin/markasının değişmesi durumlarında tekrar elde edilebilirliği ifade eder. Elde edilen %BSS değerleri üzerinden değerlendirme yapılır (Burgess, 2001 ve Swartz ve Krull, 2012).

2.3.11. Stabilite

Bir analizde kullanılan standart analit çözeltilerinin, numune çözeltilerinin ve çalışma çözeltilerinin hazırlandıktan sonra kararlılıklarını koruyarak kullanılabildiği sürenin belirlenmesi stabiliteyi ifade eder. Analizin güvenilirliği ve sağlamlığıyla ilişkilidir. Çözeltilerin stabilitesi hem deney koşulları hem de saklama koşulları için değerlendirilmelidir. Stabilite çalışmaları yapılırken zaman aralığı çalışma için gerekli süre göz önünde bulundurularak (14 gün, 1 ay, 6 ay vb.) belirlenir. Yeni hazırlanmış çözeltiler ile elde edilen analiz cevabı ile istenilen süre boyunca bekletilmiş çözeltiden elde edilen cevap karşılaştırılır.

Eğer safsızlıklar ve bozunma ürünlerinin olduğu bir analiz söz konusuysa sıcaklık, nem, ışık, asidik/bazik ortam gibi şartlar altında bozunma çalışmaları da gerçekleştirilir (Chan ve ark., 2004 ve Ozkan ve ark., 2015).

2.4. Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler

Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddelerin tümü analitik saflıktadır ve kullanılmadan önce herhangi bir ön saflaştırma işlemi uygulanmamıştır. Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddelerin tümü Çizelge 2.1.'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal madde	Formül	Saflık	Marka
Bisfenol A	$C_{15}H_{16}O_2$	≥%99	Sigma-Aldrich
Bisfenol B	$C_{16}H_{18}O_2$	≥%99	Sigma-Aldrich
Bisfenol F	$C_{13}H_{12}O_2$	≥%99	Sigma-Aldrich
Bisfenol S	$C_{12}H_{10}O_4S$	≥%99	Sigma-Aldrich
4-aminofenol	C_6H_7NO	≥%98	Sigma-Aldrich
Metanol	CH_4O	≥%99.8	Sigma-Aldrich
Etanol	C_2H_6O	≥%99.8	Sigma-Aldrich

Çizelge 2.2. Devam Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal madde	Formül	Saflık	Marka
Anilin	C_6H_7N	≥%99.5	Sigma-Aldrich
Asetik asit	$C_2H_4O_2$	≥%99	Sigma-Aldrich
Etilen glikol	$C_2H_6O_2$	%99.8	Merck
Amonyak	H_3N	≥%99.98	Merck
Asetonitril	C_2H_3N	≥%99.8	Merck
Dimetil sülfoksit	C_2H_6OS	≥%99	Merck
Hidroklorik asit	HCl	%37	Merck
Polivinil alkol	C_2H_4O	≥%99	Sigma-Aldrich
Sodyum asetat trihidrat	$C_2H_9NaO_5$	>%99	Sigma-Aldrich
Sodyum hidroksit	NaOH	>%97	Sigma-Aldrich
Potasyum ferrisiyanür	$C_6FeK_3N_6$	%99	Merck
Potasyum ferrosiyanür	$C_{12}Fe_2K_7N_{12}$	%99	Merck
Potasyum klorür	KCl	≥%99	Sigma-Aldrich
2-hidroksietil metakrilat	$C_6H_{10}O_3$	≥%99	Sigma-Aldrich
Etilen glikol dimetakrilat	$C_{10}H_{14}O_4$	%98	Sigma-Aldrich
2,2′-azobis(2-metilpropiyonitril)	$C_8H_{12}N_4$	%98	Sigma-Aldrich
1H-benzotriazol	$C_6H_5N_3$	≥%99	Sigma-Aldrich
Trietilamin	$C_6H_{15}N$	≥%99.5	Sigma-Aldrich
Metakriloil klorür	C_4H_5ClO	≥%97	Sigma-Aldrich
3-(trimetoksisilil)propil metakrilat	$C_{10}H_{20}O_5Si$	≥%97	Sigma-Aldrich
Setiltrimetilamonyum bromür	$C_{19}H_{42}BrN$	≥%98	Merck
Tetraetoksisilan	$C_8H_{20}O_4Si$	%98	Merck
Ticari insan serumu	-	-	Sigma-Aldrich

2.5. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve ekipmanlar

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve ekipmanlar Çizelge 2.2.'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve ekipmanlar

Cihaz	Marka – Model
Hassas terazi	Ohaus Instruments (Shangai, China)
pH metre	Mettler-Toledo pH/ion S220 pH meter (Switzerland).
Termal çalkalayıcı	Thermo-Shaker (Biosan TS-100)
Ultrasonik banyo	J.P. Selecta (Barcelona, Spain)
İnkübatör	EN 055/120 – Nüve (Ankara, Turkey)
Vorteks karıştırıcı	ISOLAB Laborgeräte GmbH (Eschau, Germany)
Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometre	Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS10 (Waltham, MA, USA)
Raman spektrometre	JASCO NRS-4500 Confocal Raman Microscope
Damla şekil analizörü	KRUSS DSA100 (Hamburg, Germany)
Taramalı elektron mikroskobu	SEM, TESCAN GAIA 3, (Brno – Kohoutovice, Czech Republic)
UV lamba	UVP-B 100 AP – Analytik Jena US LLC (Canada)
Santrifüj cihazı	Nüve NF-200 (Ankara, Turkey)
Otomatik mikropipet	Eppendorf AG (Germany)

2.6. Tez çalışmasında kullanılan elektrokimyasal sistem ve bileşenleri

Tez çalışmasında kullanılan elektrokimyasal sistem ve bileşenleri Çizelge 2.3.'te verilmiştir.

Çizelge 2.3. Tez çalışmasında kullanılan elektrokimyasal sistem ve bileşenleri

Bileşen	Marka-Model
Potansiyostat – galvanostat sistemi	PalmSens Potensiostat (Netherlands)
Potansiyostat – galvanostat sistemi	AUTOLAB – NOVA 2.1.5 software (Netherlands)
Cam hücre	BASi® - MR 1208
Çalışma elektrodu (CKE, çap: 3 mm)	BASi® - MF 2012
Referans elektrot (Ag/AgCl)	BASi® - MF 2052
Yardımcı elektrot (Pt tel, 7.5 cm)	BASi® - MW 1032
Parlatma – cilalama seti	BASi® - MF 2060

2.7. Tez çalışmasında kullanılan çözeltilerin hazırlanması

2.7.1. Destek elektrolitlerin hazırlanması

Elektrokimyasal analizlerde destek elektrolit olarak pH 5.2 asetat tampon çözeltisi kullanılmıştır. 0.1 M pH 5.2 asetat tampon çözeltisinden 1 L hazırlamak için 21.8 g CH_3COONa tartılarak bir miktar saf suda çözülmüştür. Daha sonra balonjojeye alınarak üzerine 2.85 mL CH_3COOH ilave edilmiş ve saf su ile 1 L'ye tamamlanmıştır. Tampon çözelti hazırlandıktan sonra pH'ı ölçülmüş ve 1 M HCl veya 1 M NaOH kullanılarak pH ayarlaması yapılmıştır. Hazırlanan tampon çözelti +4°C'de buzdolabında saklanmış ve kullanılacağı zaman oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir.

2.7.2. Potasyum ferrisiyanür/ferrosiyanür çözeltisinin hazırlanması

Elektrokimyasal ölçümlerde redoks probu olarak 5 mM potasyum ferrisiyanür/ferrosiyanür ($[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$) çözeltisi kullanılmıştır. Bunun için 0.1 M KCl içinde ayrı ayrı hazırlanan 10 mM'lık potasyum ferrisiyanür ve potasyum ferrosiyanür çözeltileri hazırlanarak karıştırılmıştır.

2.7.3. Bisfenollerin standart çözeltilerinin hazırlanması

Tez kapsamında çalışılan BP'ler 10 mM'lık standart stok çözeltiler halinde hazırlanmıştır. Bunun için gerekli miktarlarda BP'ler tartılarak metanolde çözülmüş ve gerekle hacme tamamlanmıştır. Hazırlanan standart çözeltiler +4°C'de buzdolabında saklanmış ve kullanılacağı zaman oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir.

2.7.4. Geri kazanım çalışmalarında kullanılan çözeltilerinin hazırlanması

Geri kazanım çalışmalarında kullanılan ticari serum çözeltisi buzlukta -20°C'de saklanmıştır. Standart serum çözeltisi 0.1 mM olarak hazırlanmıştır. Bunun için 3.6 mL serum çözeltisi, 5.4 mL asetonitril ve 1 mL BP çözeltisi bir santrifüj tüpüne alınarak protein kalıntılarının çöktürülmesi için 20 dk 5000 rpm'de satrifüj edilmiştir. Üstte kalan sıvı ayrılarak tampon çözelti ile istenen derişimlere seyreltilmiştir. Geri kazanım çalışmaları için hazırlanan standart serum çözeltisi üzerine istenen derişimde standart BP çözeltisi ilave edilmiştir.

Su örneklerinden geri kazanım çalışmaları için iki farklı marka plastik şişe su alınarak 4 ay süreyle ayrı ayrı güneş ışığına, inkübatörde 50°C sıcaklığa ve 8 saat süreyle 254 nm UV ışığa maruz bırakılmıştır. Bu örneklerin sensörlerin doğrusal aralığında BP içermediği belirlendikten sonra istenen derişimde standart BP çözeltileri ilavesiyle geri kazanım çalışmaları yapılmıştır.

2.7.5. Girişim çalışmalarında kullanılan çözeltilerinin hazırlanması

Girişim çalışmaları için kanda bulunan bazı önemli moleküller olan dopamin (DOP), askorbik asit (AA), KCl ve Na_2SO_4 10 mM'lık stok çözeltiler olarak saf suda hazırlanmıştır. Bunlara ek olarak seçicilik çalışmasında kullanılan diğer BP'ler ve 4-aminofenol (4-AP) de 10 mM olarak metanolde hazırlanmıştır.

2.7.6. Tez çalışmasında kullanılan diğer çözeltilerin hazırlanması

0.1 M anilin (ANI), stok çözeltiden saf su ile seyreltilerek hazırlanmış ve koyu renkli şişede buzdolabında saklanmıştır. Polivinil alkol (PVA, 25 mg/mL) distile suda, 2,2′-azobis(2-metilpropiyonitril) (AIBN, 2mg/mL) dimetil sülfoksitte, N-metakriloil-L-tirozin (25 mg/mL) metanolde, %1'lik 3-(trimetoksisilil)propil metakrilat etanolde, setiltrimetilamonyum bromür (CTAB, 5 mM) saf suda ve L-triptofan (10 mM) metanolde hazırlanmıştır. TEOS etanol ile 1:1 oranında seyreltilerek hazırlanmıştır.

2.8. Tez çalışmasında kullanılan voltametrik yöntemler

2.8.1. Dönüşümlü voltametri

BPA için MIP temelli elektrokimyasal sensör hazırlanırken dönüşümlü voltametri (DV) ile elektropolimerizasyon (EP) yöntemi kullanılmıştır. EP için -0.2 V ile 0.8 V potansiyel aralığında EP çözeltisi içerisinde 50 mV/s tarama hızında DV ile 10 döngü alınmıştır. DV yöntemi ayrıca BPA, BPS ve BPF için sensör hazırlama aşamalarında karşılaştırma ve elektrokimyasal karakterizasyon için kullanılmıştır.

2.8.2. Elektrokimyasal impedans spektroskopisi

BPA, BPS ve BPF için geliştirilen MIP temelli elektrokimyasal sensörlerin elektrokimyasal karakterizasyonu için elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) yöntemi kullanılmıştır. Elektrokimyasal ölçümler 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisi içerisinde gerçekleştirilmiştir.

2.8.3. Diferansiyel puls voltametrisi

BPA, BPS ve BPF için geliştirilen MIP temelli elektrokimyasal sensörlerin analitik performansının değerlendirilmesi için diferansiyel puls voltametrisi (DPV) yöntemi ile 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisi kullanılmıştır.

2.9. Tez çalışmasında kullanılan MIP temelli elektrokimyasal sensörlerin hazırlanması

2.9.1. BPA için MIP temelli elektrokimyasal sensörün hazırlanması

İlk olarak CKE, metanol:su (1:1, h/h) karışımında 15 dk ultrasonik banyoda bekletildi. EP'den önce yüzeyin temizlenmesi için elektrot yüzeyi parlatma pedi ve alümina süspansiyonu ile parlatılıp distile su ile yıkandı ve oda sıcaklığında kurutuldu. EP'den önce ön işlem olarak -0.2 V ile 0.8 V arasında pH 5.2 asetat tamponunda 50 mV/s tarama hızında 15 döngü DV uygulandı. EP çözeltisi olarak 2 mM ANI, 0.1 mM BPA ve 0.1 M pH 5.2 asetat tamponu içeren bir çözelti hazırlandı ve CKE yüzeyinde EP adımı bu çözelti içerisinde -0.2 V ile 0.8 V arasında50 mV/s tarama hızında 10 döngü DV ile gerçekleştirildi. Bir sonraki adımda BPA'ya spesifik boşlukların oluşturulması için elde edilen MIP(ANI)/CKE sensörü 60 dk 10 M asetik asit çözeltisinde termal çalkalayıcı kullanılarak bekletildi. İstenen derişimlerde BPA'nın bağlanması ise 3 dk inkübasyon ile sağlandı. Baskılanmamış polimer (NIP) ise MIP ile aynı adımları izleyerek, ancak EP'de BPA kullanılmadan hazırlandı ve MIP(ANI)/CKE sensörün analitik performansının kontrolü ve doğrulaması için kullanıldı. Elektrokimyasal ölçümler için 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisi kullanıldı.

2.9.2. BPS için MIP temelli elektrokimyasal sensörün hazırlanması

İlk olarak CKE, metanol:su (1:1, h/h) karışımında 15 dk ultrasonik banyoda bekletildi. EP'den önce yüzeyin temizlenmesi için elektrot yüzeyi parlatma pedi ve alümina süspansiyonu ile parlatılıp distile su ile yıkandı ve oda sıcaklığında kurutuldu.

Polimerizasyondan önce elektrot yüzeyi 1 µL 3-(trimetoksisilil)propil metakrilat (TMSPMA) çözeltisi damlatılıp inkübatörde 50°'de 30 dk kurutularak modifiye edildi. Bu sayede, elektrot yüzeyi ile polimerik zincir arasında kovalent köprü oluşturulmuştur. Daha sonra N-metakriloil-L-tirozin (MA-Tyr) ve BPS 2:1 oranında karıştırılarak metanolde hazırlandı. Bu karışım üzerine 50 µL temel monomer 2-hidroksietil metakrilat (HEMA), 10 µL çapraz bağlayıcı etilen glikol dimetakrilat (EGDMA), 10 µL polivinil alkol (PVA) ve 20 µL başlatıcı 2,2′-azobis(2-metilpropiyonitril) (AIBN) eklenerek karıştırıldı. Hazırlanan bu polimer çözeltisinden 1 µL CKE yüzeyine damlatıldı ve UV ışın altında (100 W, 365 nm) 10 dk bekletilerek polimerizasyon gerçekleştirildi. Bir sonraki adımda BPS'ye spesifik boşlukların oluşturulması için elde edilen MA-Tyr@MIP/CKE sensörü 8 dk 10 M asetik asit çözeltisinde termal çalkalayıcı kullanılarak bekletildi. İstenen derişimlerde BPA'nın bağlanması ise 12 dk inkübasyon ile sağlandı. Baskılanmamış polimer (NIP) ise MIP ile aynı adımları izleyerek, ancak polimerizasyonda BPS kullanılmadan hazırlandı ve MA-Tyr@MIP/CKE sensörün analitik performansının kontrolü ve doğrulaması için kullanıldı. Elektrokimyasal ölçümler için 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisi kullanıldı.

2.9.3. BPF için MIP temelli elektrokimyasal sensörün hazırlanması

İlk olarak CKE, metanol:su (1:1, h/h) karışımında 15 dk ultrasonik banyoda bekletildi. EP'den önce yüzeyin temizlenmesi için elektrot yüzeyi parlatma pedi ve alümina süspansiyonu ile parlatılıp distile su ile yıkandı ve oda sıcaklığında kurutuldu. Polimerizasyon çözeltisi hazırlamak için 20 µL BPF çözeltisi, 20 µL L-triptofan (L-Trp) çözeltisi, 20 µL setiltrimetilamonyum bromür (CTAB), 20 µL NH_3 çözeltisi ve etanolle 1:1 oranında seyreltilmiş 20 µL TEOS çözeltisi karıştırıldı. Hazırlanan bu çözeltiden alınan 3 µL CKE yüzeyine damlatılarak inkübatörde 50°'de 30 dk kurutuldu. Termal polimerizasyon tamamlandıktan sonra, BPF'ye spesifik boşlukların oluşturulması için elde edilen MIP(TEOS:L-Trp)@CKE sensörü 10 dk 10 M asetik asit çözeltisinde termal çalkalayıcı kullanılarak bekletildi. İstenilen derişimlerde BPF'nin bağlanması ise 12 dk inkübasyon ile sağlandı. Baskılanmamış polimer (NIP) ise MIP ile aynı adımları izleyerek, ancak polimerizasyonda BPS kullanılmadan

hazırlandı ve MIP(TEOS:L-Trp)@CKE sensörün analitik performansının kontrolü ve doğrulaması için kullanıldı. Elektrokimyasal ölçümler için 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisi kullanıldı.

2.10. MIP temelli elektrokimyasal sensörlerin yüzey karakterizasyonu

Tez çalışmasında BPA, BPS ve BPF için geliştirilen MIP temelli elektrokimyasal sensörlerin karakterizasyonu için elektrokimyasal yöntemler olan DV ve EIS'ten yararlanılmıştır. Bunlara ek olarak; taramalı elektron mikroskopisi, Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi, temas açısı analizi ve Raman spektroskopisi yöntemleri de kullanılmıştır.

3. BULGULAR

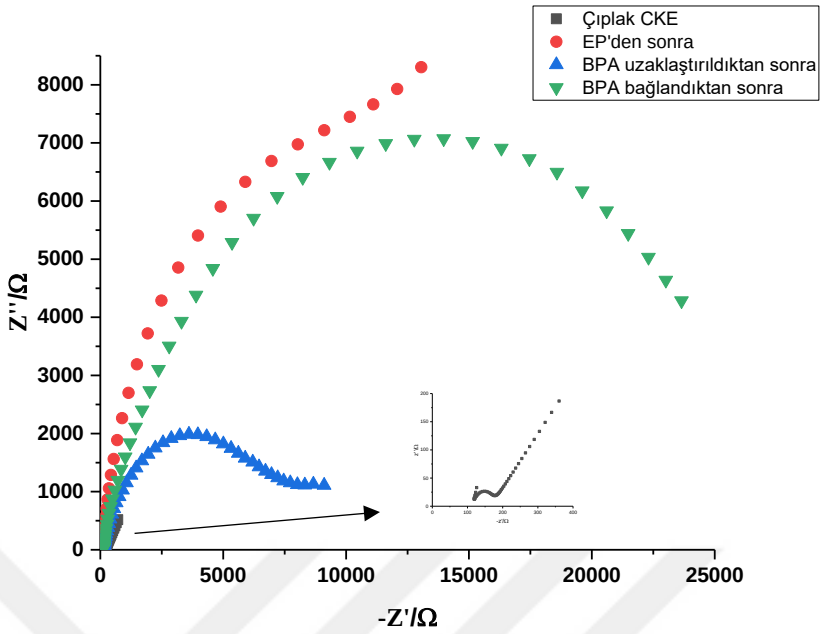
3.1. BPA'ya ait bulgular

3.1.1. MIP temelli elektrokimyasal sensörün karakterizasyonu

3.1.1.1. Elektrokimyasal karakterizasyon

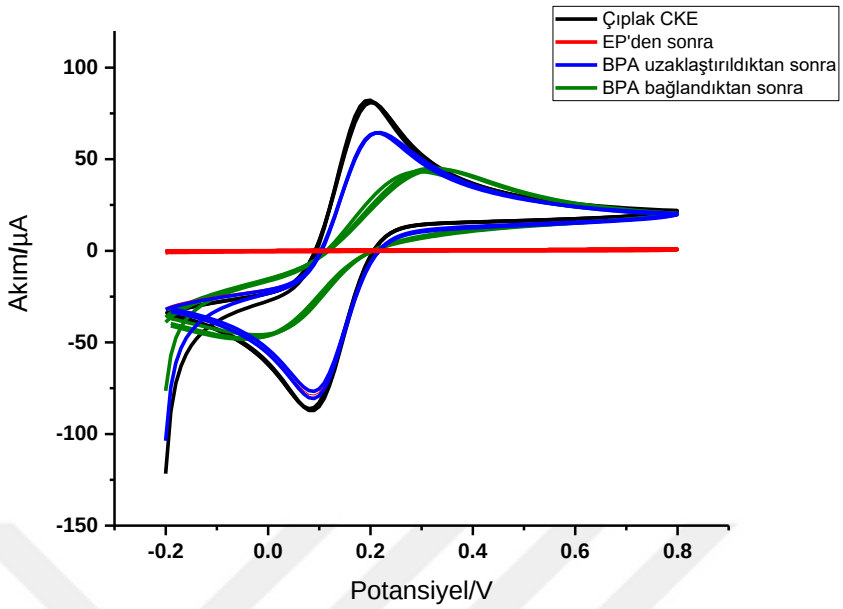
MIP(ANI)/CKE sensörünün karakterizasyonu elektrokimyasal yöntemler olan DV ve EIS kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemler çıplak ve polimerize elektrotların yüzey özellikleri hakkında bilgi verir. Bu amaçla, EP'den önce, EP'den sonra, BPA çıkarıldıktan ve bağlandıktan sonra 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisi içerisinde EIS ölçümleri yapılmıştır. EIS ölçümü ile elde edilen bir Nyquist grafiği, elektrodun elektron transferiyle ilişkili önemli özelliklerini açıklar. Ölçümlerde kullanılan devre sisteminde R_s, CPE, R_{ct} ve W sırasıyla çözelti direnci, çift katmanlı kapasitans ile ilişkili sabit faz elementi, yük transfer direnci ve sonlu uzunluklu Warburg kısa devre terimi olarak ifade edilir. R_{ct} değeri, elektrot reaksiyonu sırasında gerçekleşen yük transferini tanımlayan önemli bir parametre olup elektrot yüzeyinde elektron transferi gerçekleşiyorken düşük bir değer alır. Öte yandan elektrot yüzeyinde elektron transferini engelleyen bir durum söz konusuysa R_{ct} değeri yüksektir.

Şekil 3.1.'de görüldüğü üzere çıplak elektrot, yüzeyde elektron transferini zorlaştıran bir etken olmadığı için en düşük direnç değerine (71.41 Ω) sahiptir. Tam tersi, EP'den sonra oluşan iletken olmayan polimerin elektron transferini engellemesiyle en yüksek R_{ct} değeri (18217 Ω) elde edilir. Bu değer, BPA'nın çıkarılması ve bağlanmasından sonra ise sırasıyla 89.617 Ω ve 7171.1 Ω olmuştur. Bu durum da bağlanma sonrası BPA moleküllerinin elektrot yüzeyinde polimerdeki spesifik boşluklara tutunmasıyla açıklanabilir. Sonuç olarak; elektrot üzerindeki MIP yüzeyi elektron transfer kapasitesini azaltır ve çözeltideki $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ iyonlarının elektroda göç etmesini engeller.



Şekil 3.1. MIP(ANI)/CKE sensörün oluşturulma aşamalarında elde edilen Nyquist grafikleri.

MIP(ANI)/CKE sensörünün elektrokimyasal karakterizasyonu için DV yöntemi de uygulanmıştır. Şekil 3.2.'de görüldüğü üzere 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisine ait en yüksek DV piki çıplak CKE ile elde edilmiştir. EP'den sonra elektrot yüzeyinde oluşan polimer nedeniyle $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$'e ait pik akımı gözlemlenememiştir. BPA'nın uzaklaştırılma adımından sonra polimerde meydana gelen spesifik boşluklar sayesinde $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$'e ait pik akımı yeniden elde edilmiştir. BPA'nın bağlanmasından sonra elektrot yüzeyinde elektron transferi yeniden engellendiği için $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ piki düşmüştür.

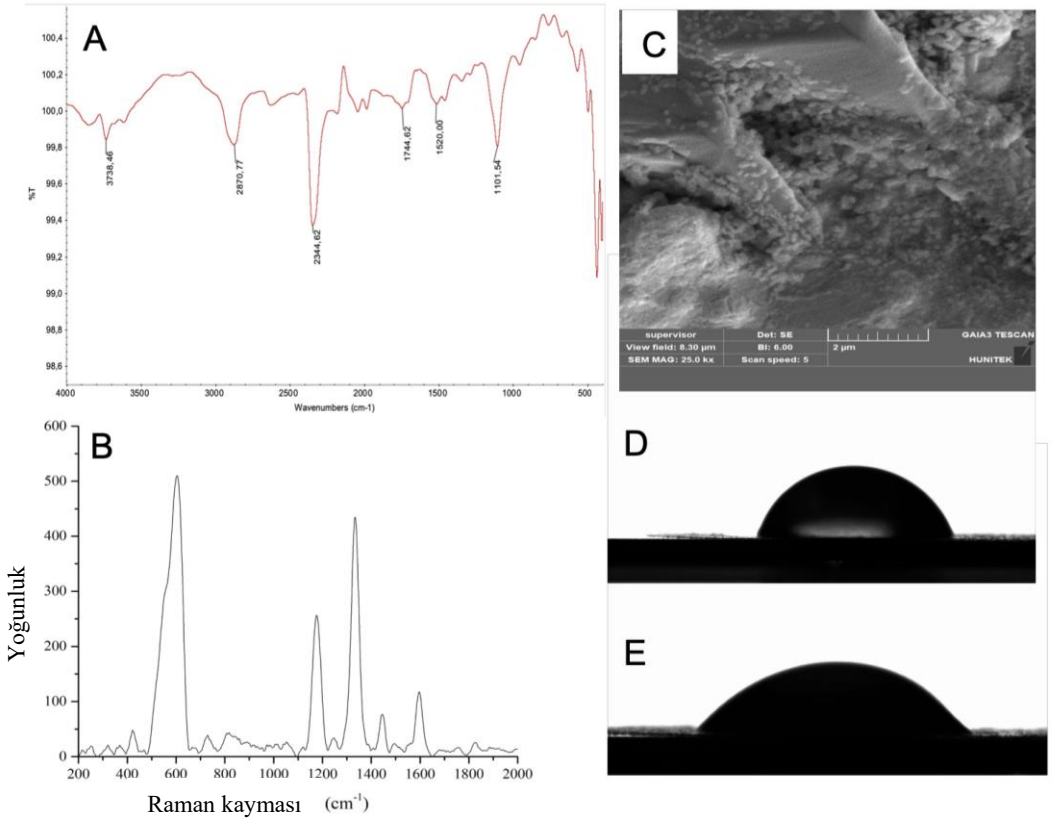


Şekil 3.2. MIP(ANI)/CKE sensörün oluşturulma aşamalarında elde edilen DV voltamogramları.

3.1.1.2. Yüzey karakterizasyonu

Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) kullanılarak elde edilen karakteristik pikler ile kimyasal yapı doğrulanmıştır (Şekil 3.3.A). 1520 ve 1744 cm^{-1}'deki pikler benzenoid halkasının C=C gerilme titreşimleri ile ilgili olabilir. 1101 cm^{-1}'deki bantlar sekonder aminin C–N bağının gerilme titreşimleri ile ilişkilidir. 2344 cm^{-1}'deki bantlar C=N gerilmesine ve 2870 cm^{-1}'deki bantlar C–H gerilmesine aitken, 3738 cm^{-1}'deki pikler ise oluşan amidin karakteristiğidir. Polianilinin (PANI) Raman spektrumlarında (Şekil 3.3.B) 1600 cm^{-1} civarında yer alan daha az yoğun bantlar PANI'nin benzoid halkalarının gerilme titreşimlerine aittir. 1500 cm^{-1} civarında yer alan bant ise N–H deformasyon titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. 1300 – 1400 cm^{-1}'deki bant ise PANI'nin $C–N^{+}$ polaronik yapısının taşıyıcı titreşimleri hakkında bilgi verir. 1250 cm^{-1} civarında yer alan bant polaronik ünitenin C–N germe moduyla ilgili olabilir. 1180 cm^{-1}'de gözlenen yoğun bant, aromatik halkaların C-H titreşimleriyle ilgilidir. Ayrıca 600 cm^{-1} civarında gözlenen pik de PANI zincirleri arasındaki çapraz bağlanmayla ilişkili olması nedeniyle öne çıkmaktadır. MIP(ANI)/CKE yapısının

yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ile incelenmiştir. Şekil 3.3.C'de görüldüğü üzere CKE üzerindeki BPA baskılı yüzey, polimerizasyon sırasında ANI'nin varlığından dolayı oldukça pürüzlü bir yapı meydana getirmiştir. Şekil 3.3.D ve E'de görüldüğü gibi çıplak CKE ve MIP(ANI)/CKE'nin temas açısı sırasıyla 61.26° ve 39.47° olup yüzeyin daha hidrofilik olduğunu gösterir.



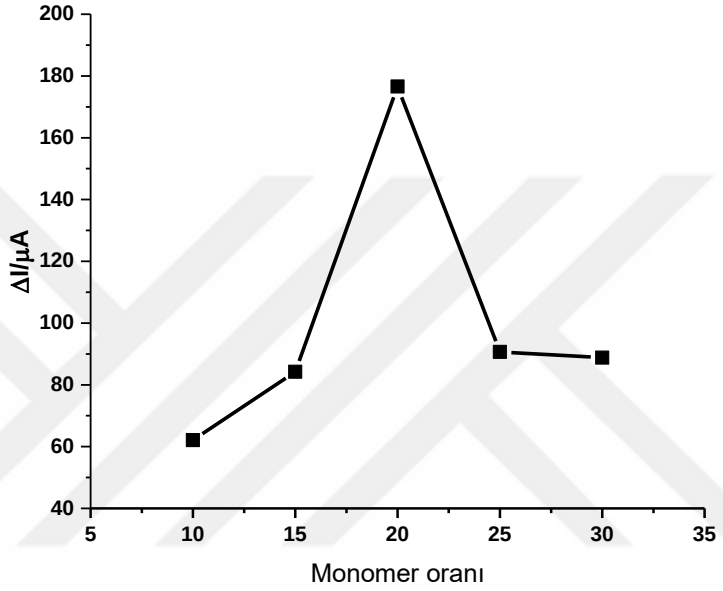
Şekil 3.3. MIP(ANI)/CKE sensörün yüzey karakterizasyonu: A) FTIR spektrumları, B) Raman spektrumları, C) SEM görüntüsü; çıplak CKE (D) ve MIP(ANI)/CKE (E) temas açıları görüntüleri.

3.1.2. Deneysel koşulların optimizasyonu

3.1.2.1. Monomer:hedef molekül oranı

Optimizasyon sürecinin ilk adımı olarak en uygun monomer:hedef molekül oranı belirlenmiştir. Bu oran, hedef moleküle spesifik boşluklara sahip stabil bir MIP

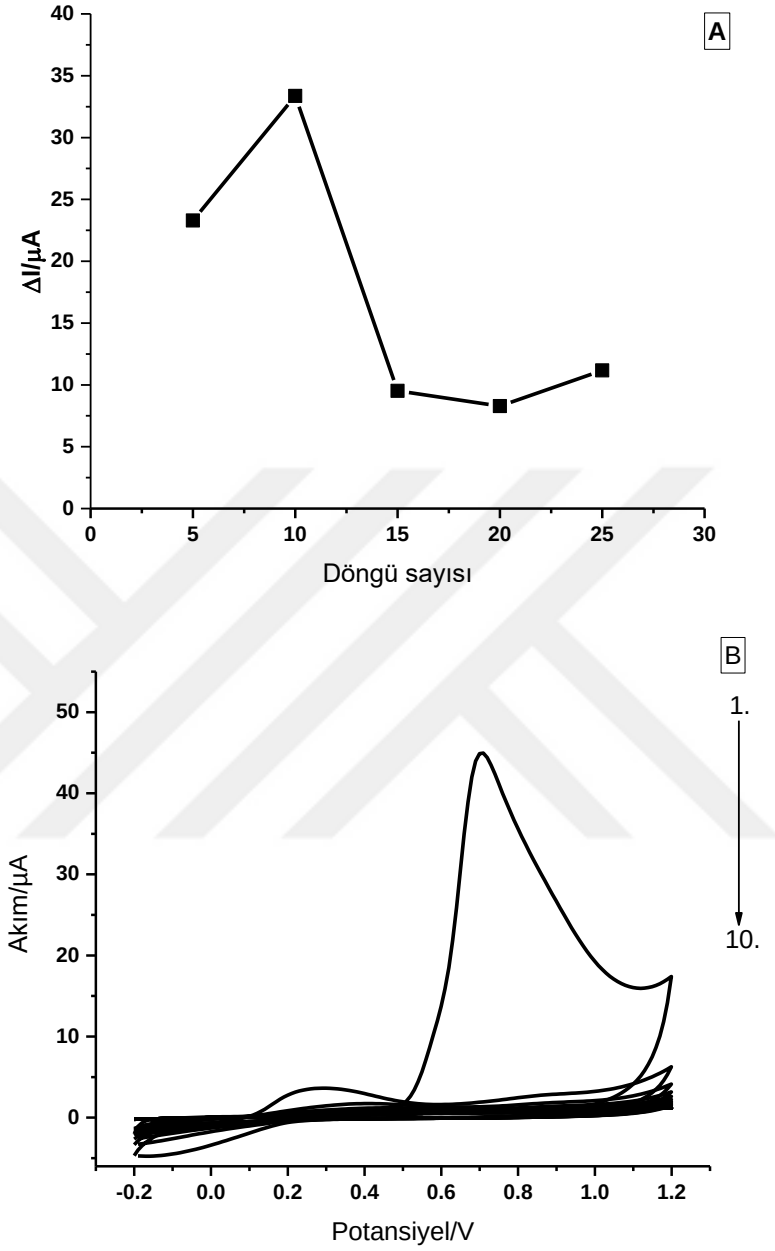
oluşturulabilmesi için oldukça önemlidir. Monomer:hedef molekül oranının seçimi için 10:1, 15:1, 20:1, 25:1 ve 30:1 gibi farklı oranlar değerlendirilmiştir (Şekil 3.4.). BPA'nın uzaklaştırılması ve EP sonrası elde edilen pik akımları arasındaki farklar karşılaştırıldığında 20:1'lik molar derişim oranının çıkarma ve bağlanma adımları için daha iyi performans ve stabilite gösterebilecek en optimum oran olduğu bulunmuştur.



Şekil 3.4. ΔI değerlerine karşılık farklı monomer:kalıp molekül oranlarının grafiği (Ölçümler 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisi içerisinde yapılmıştır.).

3.1.2.2. Elektropolimerizasyon için döngü sayısı

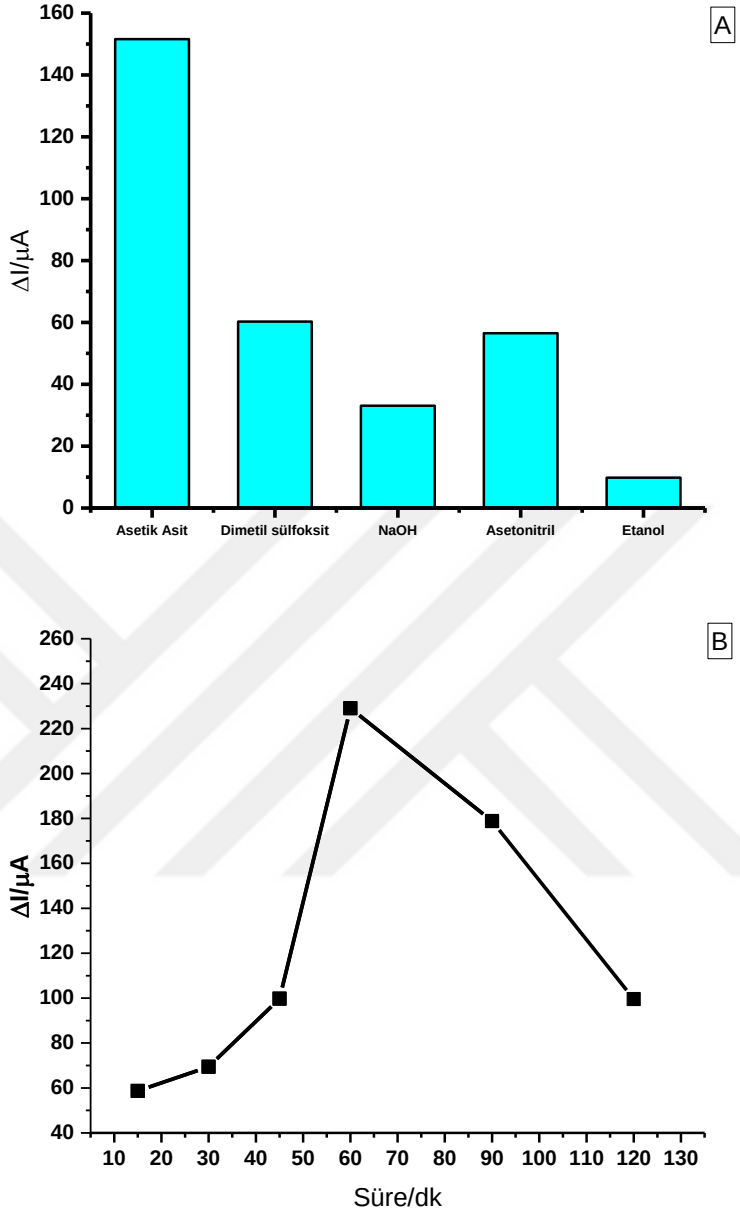
DV kullanılarak yapılan EP'de döngü sayısı, kararlı bir polimerik film oluşumunu ve sensörün genel performansını etkileyen bir diğer kritik parametredir. Bu aşamada, EP için 5, 10, 15, 20 ve 25 DV döngüleri karşılaştırıldı (Şekil 3.5.A). Her biri için, BPA'nın uzaklaştırılması ve bağlanmasından sonra elde edilen pik akımları arasındaki farklar (ΔI) değerleri karılaştırılarak en iyi sonucun bağlanma için de iyi bir performansa sahip olup olmadığı değerlendirilmiştir. Sonuç olarak 10 döngünün (Şekil 3.5.B) daha iyi yanıta sahip olduğu belirlenerek sonraki deneyler için optimum değer olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.5. A) ΔI değerlerine karşılık farklı döngü sayılarının grafiği (Ölçümler 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisi içerisinde yapılmıştır.) B)10 döngü DV ile ANI'nin elektropolimerizasyonu.

3.1.2.3. Hedef molekülün uzaklaştırılma işlemi

Hedef molekülün etkili şekilde uzaklaştırılabilmesi ve polimer film üzerinde hedef moleküle spesifik boşlukların elde edilebilmesi için en uygun çözeltinin ve sürenin seçilmesi oldukça kritiktir. Bu amaçla termal çalkalayıcı kullanılarak MIP(ANI)/CKE 15 dk süreyle farklı çözeltilerde (10 M asetik asit, 1 M dimetil sülfoksit, 1 M NaOH, 1 M asetonitril ve etanol) bekletildi. En etkili sonuç 10 M asetik asit çözeltisi ile elde edildi (Şekil 3.6.A). Daha sonra süre optimizasyonu için 10 M asetik asit çözeltisi ile 15, 30, 35, 45, 60, 90 ve 120 dk test edildi (Şekil 3.6.B). Elde edilen verilere göre en iyi sonuç 60 dk ile alınmış ve ilerleyen deneylerde uygulanmıştır.

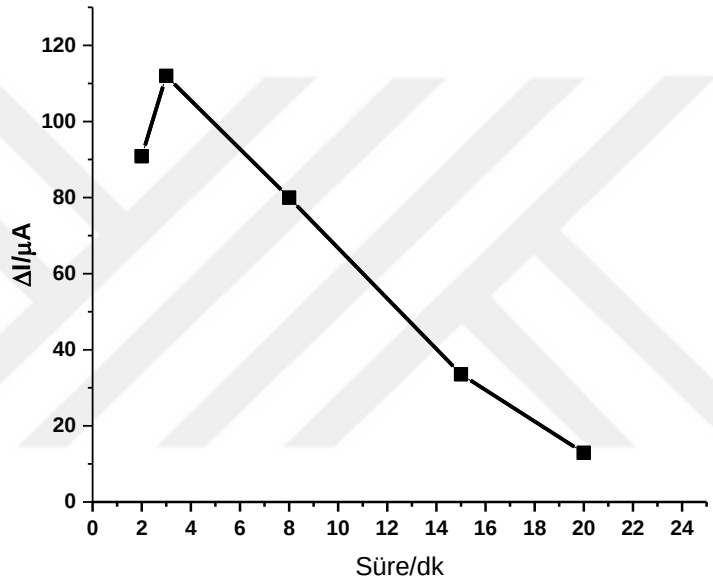


Şekil 3.6. ΔI değerlerine karşılık A) uzaklaştırma çözeltilerinin, B) 10 M asetik asit çözeltisi için uzaklaştırma sürelerinin grafiği (Ölçümler 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisi içerisinde yapılmıştır.).

3.1.2.4. Hedef molekülün bağlanma işlemi

Hedef molekül BPA'nın bağlanması için uygulanacak inkübasyon süresi geliştirilen MIP sensörün analitik özelliklerini ve performansını doğrudan etkileyerek

değiştirebilen bir parametredir. Bağlanma süresinin incelenmesi için MIP(ANI)/CKE 2, 3, 8, 15 ve 20 dk sürelerle $5x10^{-13}$ M BPA içinde çalkalayıcıda inkübe edildi. ΔI değerleri incelendiğinde (Şekil 3.7.) 3. dakikada meydana gelen artıştan sonra ΔI'nın sürekli azaldığı görülmektedir. Bağlanma süresinin daha uzun tutulması polimer boşluklarında doygunluğa ve sensör performansının bozulmasına neden olabilir. Bağlanma işlemi sırasında her bir farklı konsantrasyondan önce MIP(ANI)/CKE 30 saniye distile suyla yıkandı.

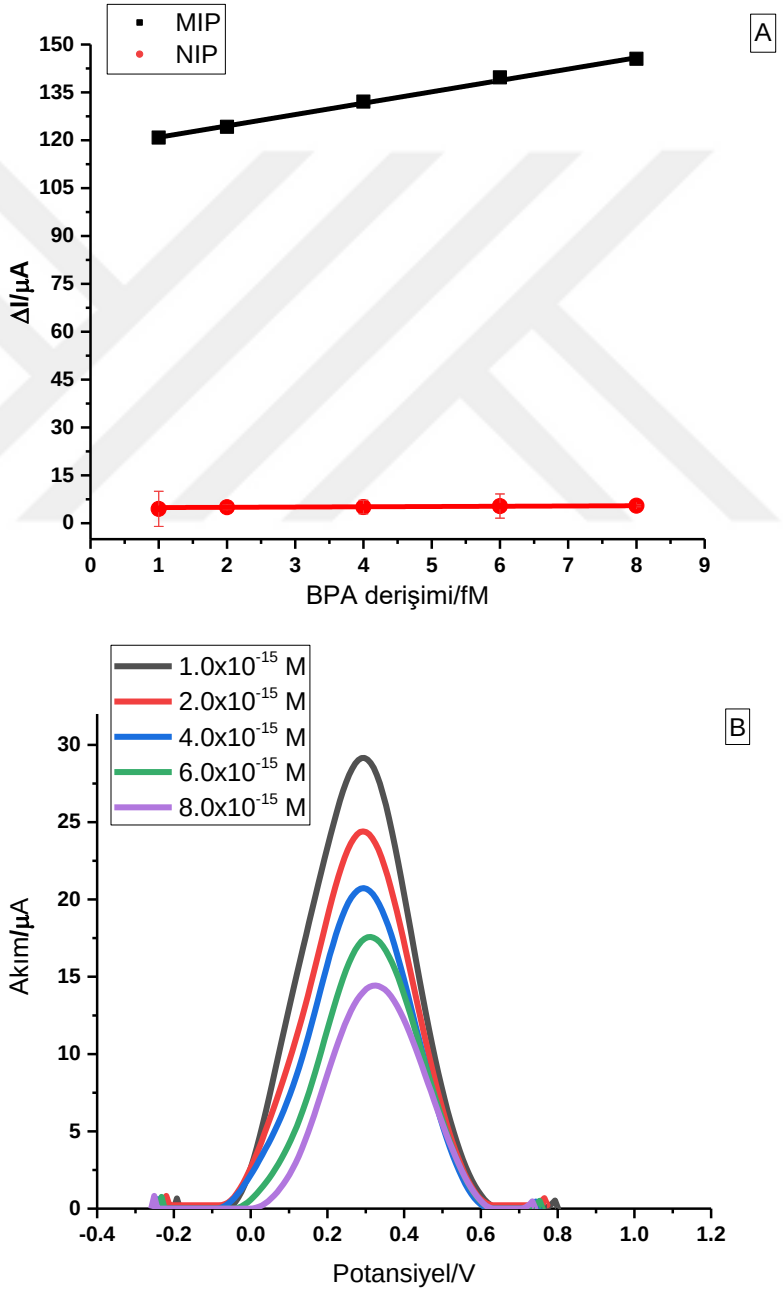


Şekil 3.7. ΔI değerlerine karşılık farklı bağlanma sürelerinin grafiği (Ölçümler 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisi içerisinde yapılmıştır.).

3.1.3. MIP(ANI)/CKE ile BPA'nın elektrokimyasal tayini

MIP(ANI)/CKE sensörünün analitik performansının değerlendirilmesi ve doğrulanması için optimize edilmiş deney koşullarında redoks probu olarak 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisi kullanılarak $1x10^{-15}$ M ile $8x10^{-15}$ M derişim aralığında BPA tayin edilmiştir. Şekil 3.8.A'da MIP(ANI)/CKE ve NIP(ANI)/CKE için oluşturulan ΔI değerlerine karşılık BPA derişimi grafiği verilmiştir. Şekil 3.8.B ise MIP(ANI)/CKE ile bu derişim aralığında elde edilen DPV voltamogramları gösterilmiştir.

MIP(ANI)/CKE'nin kalibrasyon grafiği, $\Delta I(\mu A)=3.599\times10^{15}C(M)+117.349$ ($r^2=0.997$) regresyon denklemiyle doğrusal bir yanıt gösterir. TS ve TAS değerleri ise standart sapmaya dayalı hesaplama yapılarak ve TS=3s/m ve TAS=10s/m denklemleri kullanılarak sırasıyla 0.193 fM ve 0.643 fM olarak bulunmuştur. Elde edilen kalibrasyon doğrusuna ait regresyon analizi sonuçları Çizelge 3.1.'de verilmiştir. MIP(ANI)/CKE sensörün doğrusal yanıtına karşın NIP temelli sensörün doğrusallık göstermemesi geliştirilen sensörün BPA'ya karşı seçiciliğini kanıtlamaktadır.



Şekil 3.8. A) MIP(ANI)/CKE ve NIP(ANI)/CKE sensörlerine ait DPV ile elde edilmiş kalibrasyon grafikleri B) Farklı derişimlerde BPA'nın bağlanmasıyla elde edilen 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisine ait DPV voltamogramları.

Çizelge 3.1. Standart çözelti ve serum numunelerinde MIP(ANI)/CKE sensörü ile BPA için elde edilen kalibrasyon eğrisine ait regresyon analizi sonuçları

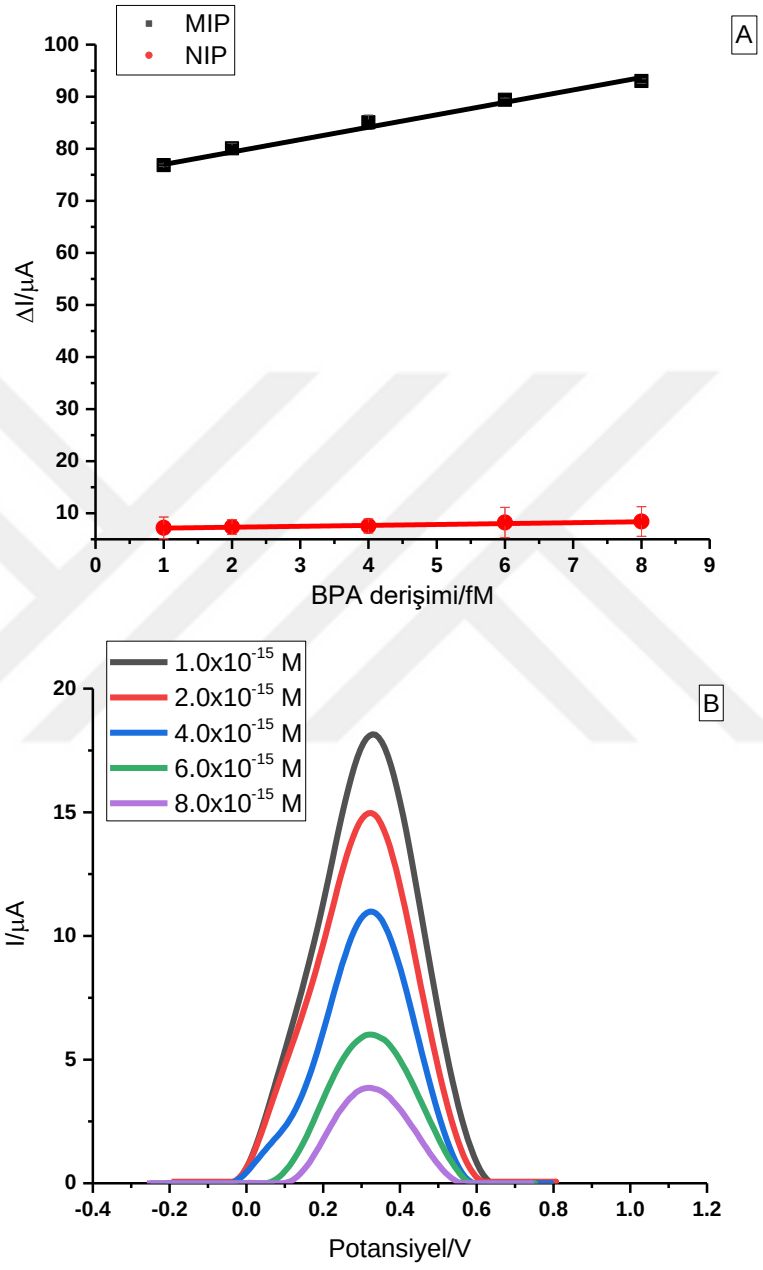
	Standart çözelti	**Serum**
Doğrusal aralık (M)	$1x10^{-15} – 8x10^{-15}$	$1x10^{-15} – 8x10^{-15}$
Eğim (μA M^{-1})	$3.599x10^{15}$	$2.293x10^{15}$
Eğimin standart hatası	6.319	4.139
Kesişim (μA)	117.349	75.523
Kesişimin standart hatası	3.609	2.063
Korelasyon katsayısı	0.998	0.996
Teşhis sınırı (M)	$1.93x10^{-16}$	$2.57x10^{-16}$
Tayin alt sınırı (M)	$6.43x10^{-16}$	$8.56x10^{-16}$
Tekrarlanabilirlik (%BSS)*	0.557	0.689
Tekrar elde edilebilirlik (%BSS)*	0.898	1.503

***Elde edilen %BSS değerlerinin ölçüm sayısı 3'tür.

3.1.4. Ticari insan serumu ve su numunelerinin analizi

Geliştirilen MIP(ANI)/CKE sensörünün uygulanabilirliğini değerlendirmek için ticari insan serumu ve plastik şişe su örneklerinden geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. BPA sürekli maruziyet sonucu kümülatif etkiyle yüksek seviyelere ulaşabilir, bu nedenle de serum ve şişe su gibi ortamlarda çok düşük miktarlarda bile tayin edilebilmesi önemlidir. Serum numunesinde yapılan kalibrasyona (Şekil 3.9.A) ait regresyon verileri Çizelge 3.1.'de verilmiştir. Serum numunelerinde farklı derişimlerde BPA'nın bağlanmasından sonra elde edilen DPV voltamogramları Şekil 3.9.B'de verilmiştir. TS ve TAS değerleri ise sırasıyla 0.257 fM ve 0.856 fM olarak

hesaplanmıştır. Serum örneğinde standart ekleme yapılarak BPA için geri kazanım çalışması yapılmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 3.2.'de verilmiştir.



Şekil 3.9. Ticari serum örneklerinde A) MIP(ANI)/CKE ve NIP(ANI)/CKE sensörlerine ait DPV ile elde edilmiş kalibrasyon grafikleri B) Farklı derişimlerde BPA'nın bağlanmasıyla elde edilen 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisine ait DPV voltamogramları.

İki farklı marka plastik şişe su örneği ile geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Bunun için, belirlenen üç farklı derişimde standart ekleme yapılarak BPA tayin edilmiştir. Geri kazanım çalışmasıyla elde edilen sonuçlar (Çizelge 3.3.) sensörün doğruluğunu ve uygulanabilirliğini göstermiştir.

Çizelge 3.2. Serum örneği için geri kazanım çalışmasına ait sonuçlar

	Serum örneği
Eklenen miktar (M)	$6x10^{-15}$
Bulunan miktar (M)	$6.08x10^{-15}$
Geri kazanım (%)	101.28
%BSS*	0.83
%BH	1.28

*****Elde edilen %BSS değerlerinin ölçüm sayısı 3'tür.

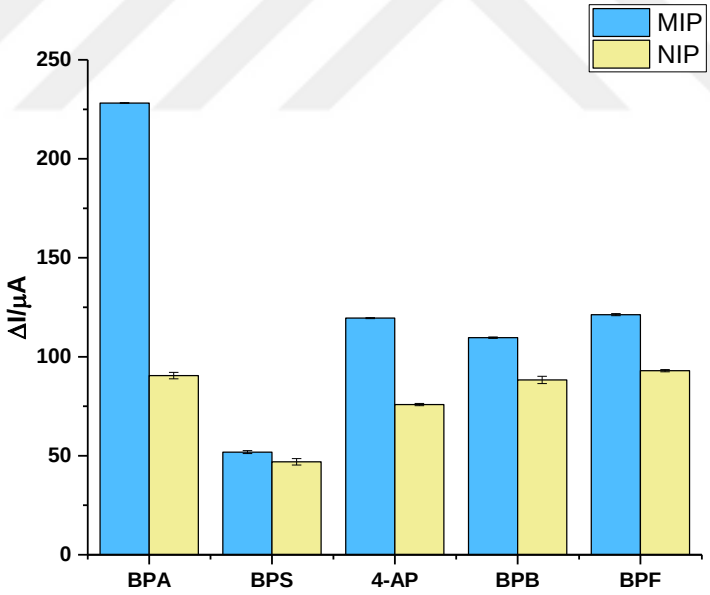
Çizelge 3.3. Su örnekleri için geri kazanım çalışmasına ait sonuçlar

Örnek	**Eklenen miktar (M)**	**Bulunan miktar (M)**	**Geri kazanım (%)**	**BSS (%)***	**BH (%)**
Şişe su-1	0	-	-	-	-
Şişe su -2	0	-	-	-	-
Şişe su -1	$2x10^{-15}$	$2.01x10^{-15}$	100.71	2.84	+0.71
Şişe su -2	$2x10^{-15}$	$2.05x10^{-15}$	102.43	1.89	+2.43
Şişe su -1	$4x10^{-15}$	$4.09x10^{-15}$	102.20	1.62	+2.20
Şişe su -2	$4x10^{-15}$	$3.99x10^{-15}$	99.93	2.33	– 0.93
Şişe su -1	$6x10^{-15}$	$6.13x10^{-15}$	102.19	1.36	+2.19
Şişe su -2	$6x10^{-15}$	$6.12x10^{-15}$	102.01	2.74	+2.01

*****Elde edilen %BSS değerlerinin ölçüm sayısı 3'tür.

3.1.5. Seçicilik çalışması

MIP(ANI)/CKE sensörünün seçiciliği değerlendirilirken BPA'ya benzer yapılı moleküller olan BPS, BPB, BPF ve 4-AP kullanılmıştır. NIP temelli sensörler, MIP temelli sensörlerdeki gibi hedef moleküle özel boşluklara sahip olmadığı için NIP temelli sensörlerde hedef molekülün bağlanması gerçekleşmez. Aynı prensiple değerlendirildiğinde, geliştirilen sensörün hedef molekül dışındaki moleküller için hem MIP hem NIP temelli sensörde bağlanma gözlenmez. Baskılama faktörü (IF) değeri, BPA için elde edilen ΔI değerinin diğer moleküller için elde edilen ΔI değerlerine oranı olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.10.). IF değeri hem MIP hem NIP için ayrı ayrı hesaplanmıştır. Bağıl IF (IF') ise MIP ve NIP için bulunan IF değerlerinin birbirine oranlanmasıyla hesaplanmıştır (Çizelge 3.4.). Elde edilen sonuçlar MIP(ANI)/CKE sensörünün BPA'ya bağlanma ilgisinin diğer moleküllere göre yüksek olduğunu ve sensördeki boşlukların BPA'ya spesifik olduğunu vurgulamıştır.



Şekil 3.10. BPA ve diğer benzer yapılı moleküller için IF çalışmalarının değerlendirilmesi.

Çizelge 3.4. BPA, BPS, 4-AP, BPB ve BPF için IF hesaplamaları

	MIP		**NIP**		
	ΔI/μA	**$IF_{(MIP)}$**	**ΔI/μA**	**$IF_{(NIP)}$**	**$IF'_{(MIP/NIP)}$**
BPA	228.185	–	90.500	–	–
BPS	51.858	4.400	46.952	1.928	2.283
4-AP	119.528	1.909	75.870	1.193	1.600
BPB	109.662	2.081	88.290	1.025	2.029
BPF	121.272	1.882	92.974	0.973	1.933

3.1.6. Girişim etkisinin değerlendirilmesi

Girişim etkili standart türler olan DOP, AA, Na^+, Cl^-, K^+, SO_4^{2-}'ın girişim etkisi BPA ile on kat daha yüksek derişimde karışımları halinde ölçüm yapılarak değerlendirildi. Hesaplanan %BSS ve %BH değerleri Çizelge 3.5.'te verilmiştir. %98.64 ile %101.84 arasında bulunan %BH değerleri geliştirilen sensör için BPA tayininde bu türlerin önemli bir girişim etkisi oluşturmadığını ifade etmektedir.

Çizelge 3.5. Girişim etkili türlerin BPA tayini üzerine etkisi

	Oran	**Geri kazanım (%)**	**BSS (%)***
DOP	1:10	99.86	1.59
AA	1:10	100.48	0.35
Na^+	1:10	98.64	0.23
Cl^-	1:10	101.84	1.35
K^+	1:10	101.84	1.35
SO_4^{2-}	1:10	98.64	0.23

***Elde edilen %BSS değerlerinin ölçüm sayısı 3'tür.

3.1.7. Stabilite çalışması

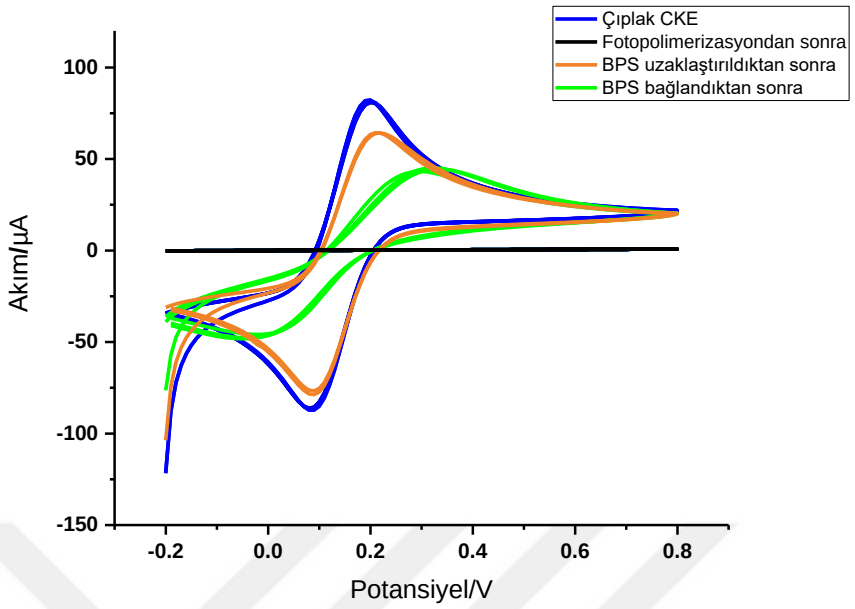
Yapılan çalışmalar sırasında hazırlanan MIP(ANI)/CKE sensörün gün boyu deneylerde kullanılabildiği ancak sonrasında stabil olmadığı gözlemlenmiştir.

3.2. BPS'ye ait bulgular

3.2.1. MIP temelli elektrokimyasal sensörün karakterizasyonu

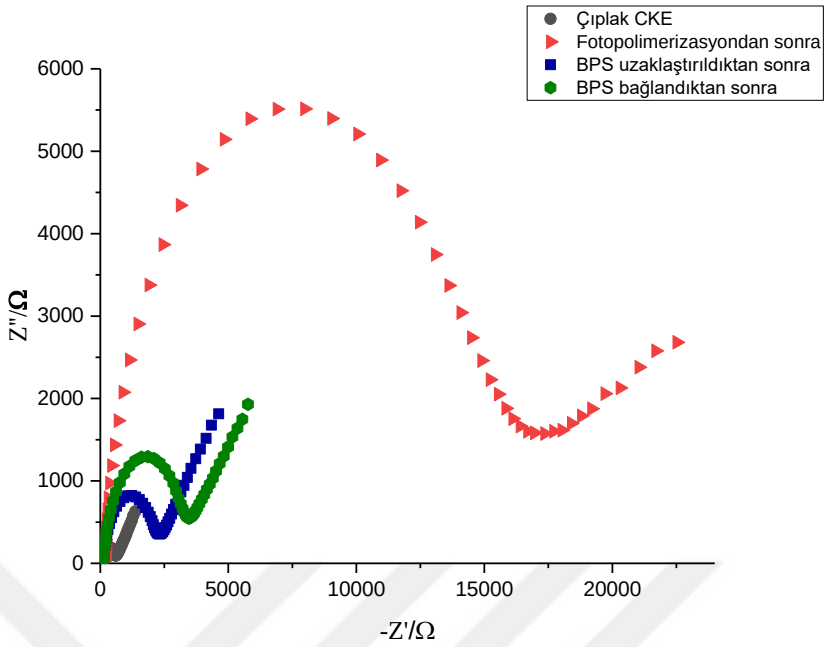
3.2.1.1. Elektrokimyasal karakterizasyon

MA-Tyr@MIP/CKE sensörünün elektrokimyasal karakterizasyonu DV ve EIS yöntemleri ile redoks probu olarak 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. CKE'nin yüzey ve iletkenlik özellikleri fotopolimerizasyondan önce/sonra ve BPS'nin uzaklaştırılması ve bağlanmasından sonra değerlendirilmiştir. Şekil 3.11.'deki DV voltamogramları polimer oluşumundan ve BPS'nin bağlanmasından sonra elektrot yüzeyinde elektron transferinin engellenmesi nedeniyle $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$'e ait pik akımının gözlemlenememesi ya da düşmesini göstermektedir. Çıplak CKE ile 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisine ait en yüksek DV piki elde edilmiştir.



Şekil 3.11. MA-Tyr@MIP/CKE sensörün oluşturulma aşamalarında elde edilen DV voltamogramları.

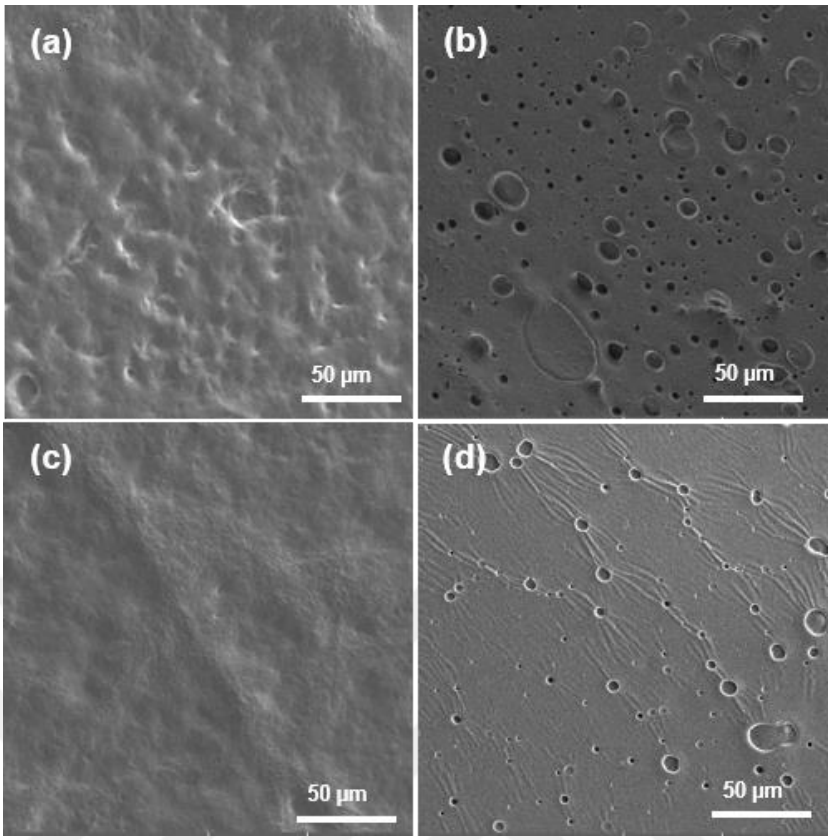
Şekil 3.12.'de ise MA-Tyr@MIP/CKE sensörünün oluşturulma aşamalarında EIS ölçümleriyle elde edilen Nyquist grafikleri gösterilmektedir. R_{ct} değeri, yük transfer direncini ifade etmektedir ve elektrot yüzeyindeki polimerik film elektron transferini engelleyeceği için daha yüksektir. Bu nedenle polimerizasyondan önce CKE en düşük R_{ct} değerine (95.75 Ω) sahipken fotopolimerizasyon işleminden sonra en yüksek değere (129.27 Ω) ulaşmaktadır. Kalıp molekülün uzaklaştırılması elektrot yüzeyindeki boşlukları ortaya çıkardığı için R_{ct} değeri (106.33 Ω) azalırken, BPS'nin bağlanması R_{ct} değerini (113.19 Ω) bir kez daha arttırmıştır.



Şekil 3.12. MA-Tyr@MIP/CKE sensörün oluşturulma aşamalarında elde edilen Nyquist grafikleri.

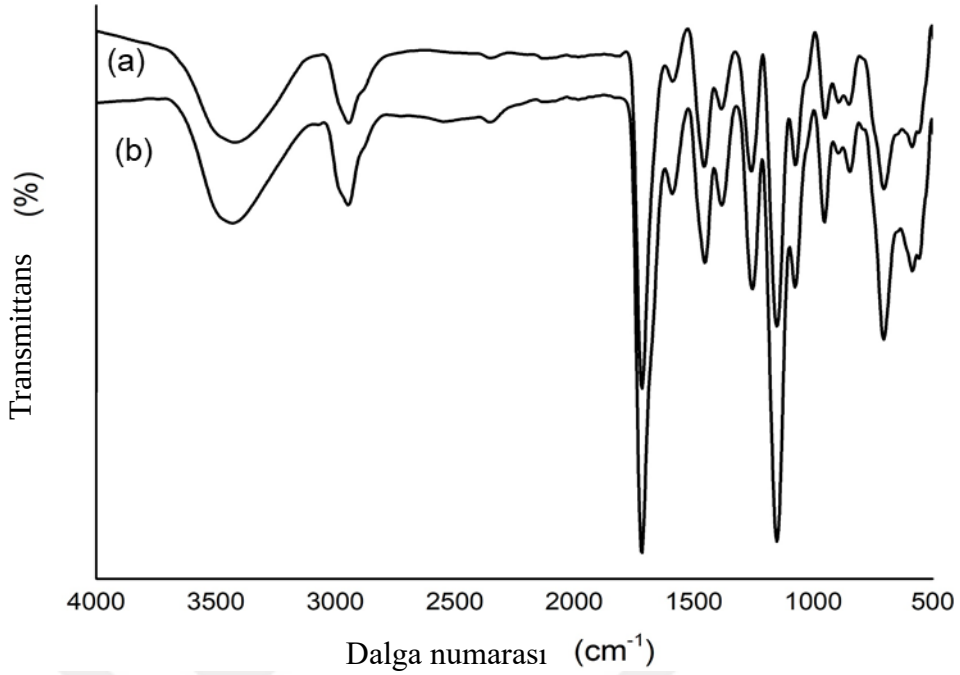
3.2.1.2. Yüzey karakterizasyonu

CKE yüzeyinde oluşturulan polimerik film sensör yüzeyinin SEM görüntülerinden Şekil 3.13.B ve Şekil 3.13.D'de MA-Tyr@MIP/CKE ve MA-Tyr@NIP/CKE sensörlerinin pürüzlü yüzeylerinin farklı gözenek boyutları ve morfolojilerine sahip olduğu görülmektedir. SEM görüntüleri PVA varlığında sensör yüzeyinde büyük gözenekler oluştuğunu ve gözenek çaplarının 1 – 20 µm arasında değiştiğini ortaya çıkarmıştır. Buna karşılık, Şekil 3.13.A ve Şekil 3.13.C'de PVA olmadan hazırlanan MA-Tyr@MIP/CKE ve MA-Tyr@NIP/CKE sensörlerinin yüzeylerinin pürüzsüz ve gözeneksiz olduğu görülmektedir.



Şekil 3.13. Polimerik filmlerin SEM görüntüleri: a) PVA olmadan MA-Tyr@MIP/CKE, b) PVA ile MA-Tyr@MIP/CKE, c) PVA olmadan MA-Tyr@NIP/CKE, d) PVA ile MA-Tyr@NIP/CKE.

Polimerik filmin kimyasal bileşiminin karakterize edilmesi için zayıflatılmış toplam yansıma kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR) kullanılmıştır. Şekil 3.14'te verilen MA-Tyr@MIP/CKE'nin ATR-FTIR spektrumları, amit-I ve amit-II (-NH) ile ilişkili 1580 cm^{-1} ve 1440 cm^{-1}'de görülmesi beklenen karakteristik titreşimler görülmektedir. 1710 cm^{-1}'de bulunan güçlü pik -COOH'ın gerilme titreşimi ile ilişkilidir. Ayrıca, ATR-FTIR spektrumunda 3420 cm^{-1}'de görülen geniş bant -OH bükülme titreşimi ile ilişkilidir. Bunlara ek olarak 2950 cm^{-1} civarında (C-H alifatik gerilme), 1370 cm^{-1} ve 1250 cm^{-1} civarında (-CO-O-R, eter ve ester gerilmesi) ve 1150 cm^{-1} civarında (C-H bükülmesi) bantlar gözlemlenmiştir. Bu verilerin tümü MIP matrislerinde güçlü bir şekilde bağlı fonksiyonel monomer MA-Tyr bulunduğunu ve bunun NIP sonuçlarıyla da tutarlı olduğunu ortaya koymaktadır.

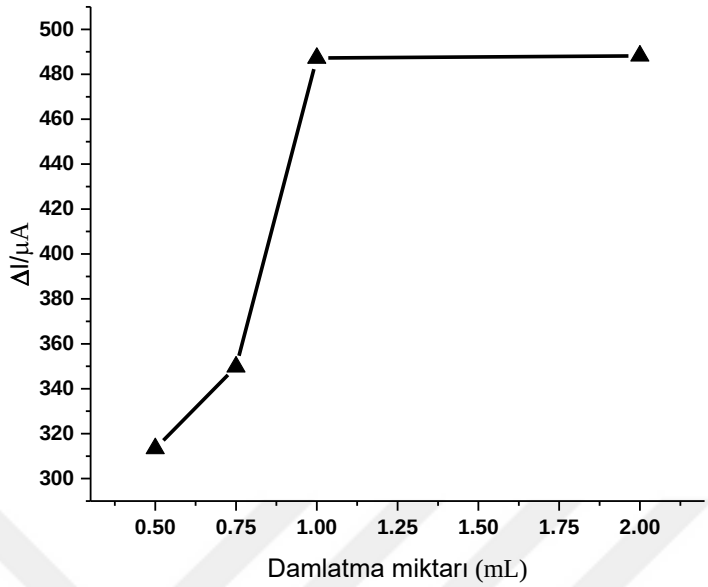


Şekil 3.14. a) MA-Tyr@MIP/CKE sensörün, b) MA-Tyr@NIP/CKE sensörün ATR-FTIR spektrumları.

3.2.2. Deneysel koşulların optimizasyonu

3.2.2.1. Damlatma miktarı

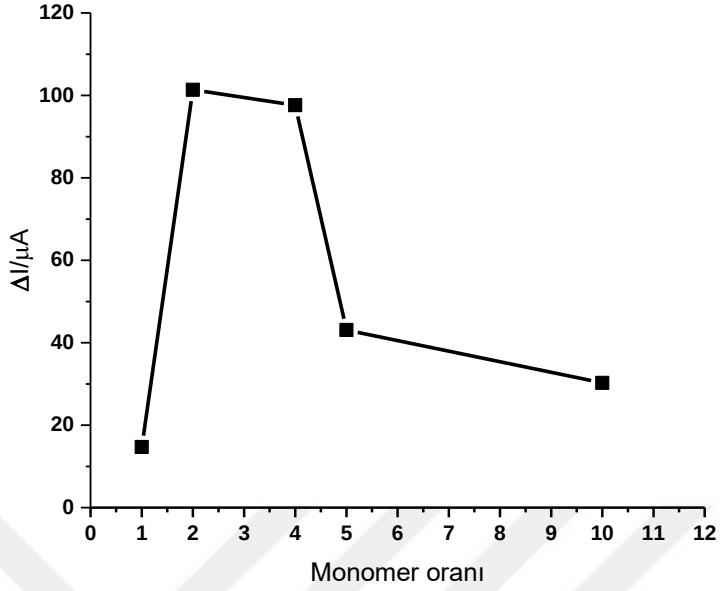
MIP'i etkileyen deney koşullarının optimizasyonu CKE yüzeyinde kararlı ve etkili bir polimerik film oluşturulması için kritik bir süreçtir. Bu bağlamda, elektrot yüzeyinde damlatılan fotopolimerizasyon çözeltisinin miktarı da MIP filminin stabilitesini ve sensör oluşturma sürecinin diğer adımlarını doğrudan etkiler. Bu nedenle, fotopolimerizasyon çözeltisinden elektrot yüzeyine 0.5 µL, 0.75 µL, 1 µL, ve 2 µL damlatılarak elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir (Şekil 3.15.). Oluşan polimerik filmlerin fiziksel stabilitesi, DV voltamogramları ve sayısal veriler karşılaştırıldığında polimer oluşumu için en iyi seçenek 1 µL olarak seçilmiştir. Daha sonraki deneysel aşamalarda tüm işlemler CKE yüzeyine fotopolimerizasyon çözeltisinden 1 µL damlatılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.15. Polimerizasyon öncesi ve sonrası elde edilen ΔI değerlerine karşılık damlatma miktarlarının grafiği (Ölçümler 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisi içerisinde yapılmıştır.).

3.2.2.2. Monomer:hedef molekül oranı

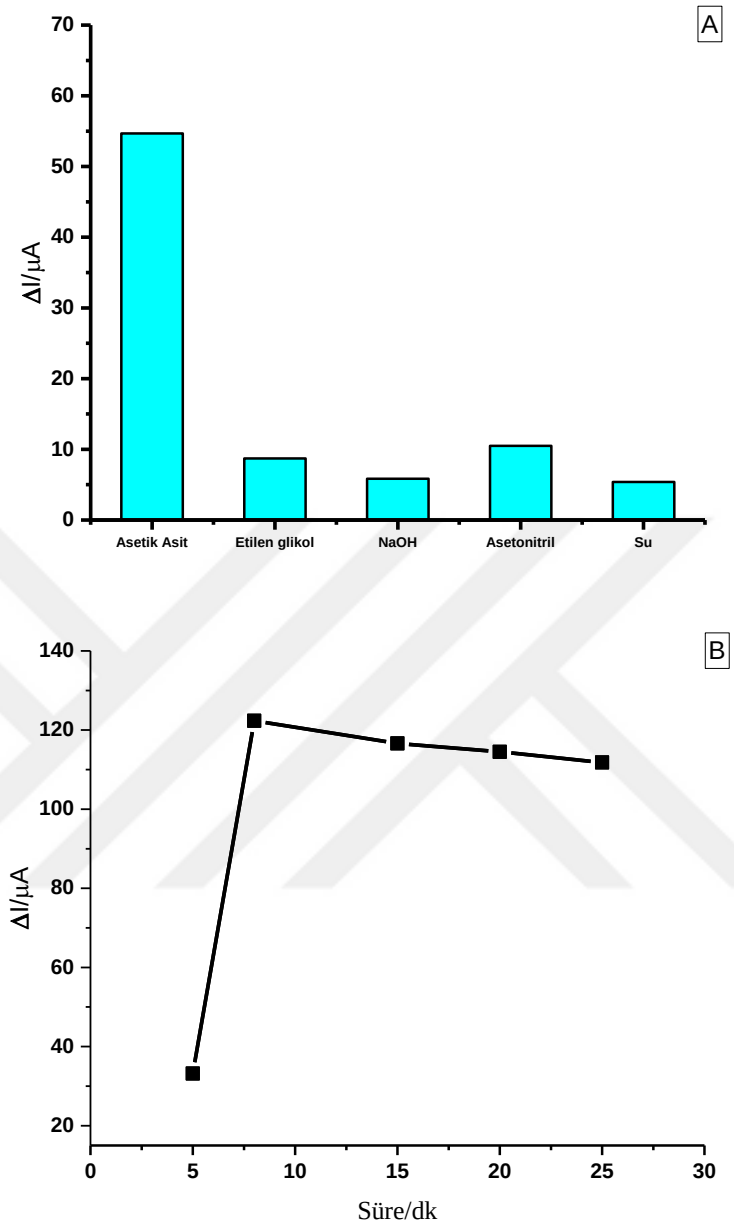
Monomer:hedef molekül oranı, polimerdeki bağlanma bölgeleri ve hedef moleküle monomer arasındaki etkileşimlerle ilgili bir parametredir. Hedef molekül uzaklaştırıldıktan sonra kolaylıkla spesifik boşlukların oluşturulabildiği stabil bir polimer kararlı ve doğru bir sensör geliştirilebilmesi için en kritik noktadır. Bu amaçla 1:1, 2:1, 4:1, 5:1 ve 10:1 oranları denenmiştir (Şekil 3.16.). Elde edilen sonuçlara göre, en kararlı ve hedef molekül ile monomer arasında en uygun yerlerde bağlanmayı sağlayan polimer film 2:1 oranı ile elde edilmiştir.



Şekil 3.16. ΔI değerlerine karşılık farklı monomer:hedef molekül oranlarının grafiği (Ölçümler 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisi içerisinde yapılmıştır.).

3.2.2.3. Hedef molekülün uzaklaştırılma işlemi

MIP yapısında kararlı ve tekrarlanabilir özellikte hedef moleküle spesifik boşluklar oluşturabilmek için hedef molekülün uzaklaştırılma işlemi optimizasyonda önemli bir diğer adımdır. Bu amaçla, MA-Tyr@MIP/CKE bir termal çalkalayıcı kullanılarak 650 rpm'de 8 dk boyunca DMSO, asetik asit, etilen glikol, asetonitril ve saf su olmak üzere farklı çözeltilerde ayrı ayrı inkübe edilmiştir. Bu işlem sonrasında ve fotopolimerizasyon sonrasında elde edilen pik akımları karşılaştırıldığında en iyi ve etkili performansı gösteren çözeltinin asetik asit olduğu bulunmuştur (Şekil 3.17.A). Daha sonra, asetik asit çözeltisi ile etkileşim süresinin değerlendirilmesi için 5 ile 25 dk aralığında farklı süreler test edilmiştir (Şekil 3.17.B). En iyi sonuç 8 dk ile edilmiş ve daha uzun sürelerde hemen hemen aynı yanıtın elde edildiği gözlemlenmiştir. Bu sebeple sonraki deneyler için en uygun değer 8 dk olarak seçilmiştir.

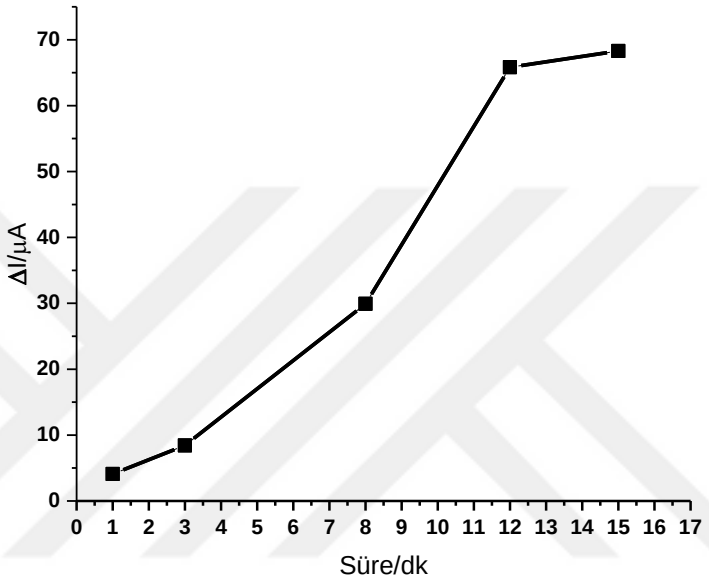


Şekil 3.17. ΔI değerlerine karşılık A) uzaklaştırma çözeltilerinin, B) 10 M asetik asit çözeltisi için uzaklaştırma sürelerinin grafiği (Ölçümler 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisi içerisinde yapılmıştır.).

3.2.2.4. Hedef molekülün bağlanma işlemi

Hedef molekülün bağlanması, geliştirilen sensörün analitik performansı ve doğrulanması ile doğrudan ilişkili bir parametredir. Hedef moleküle spesifik

boşluklara kararlı ve güçlü bir bağlanma sağlayabilmek için en uygun sürenin seçilmesi amacıyla 3, 5, 8, 12 ve 15 dk'lık inkübasyon süreleri test edilmiştir (Şekil 3.18.). Grafik incelendiğinde 12 dk'dan sonra ΔI değerinin sabit kalması ile boşlukların doymuş olduğu düşünülebilir bu nedenle bağlanma süresi olarak 12 dk seçilmiştir.



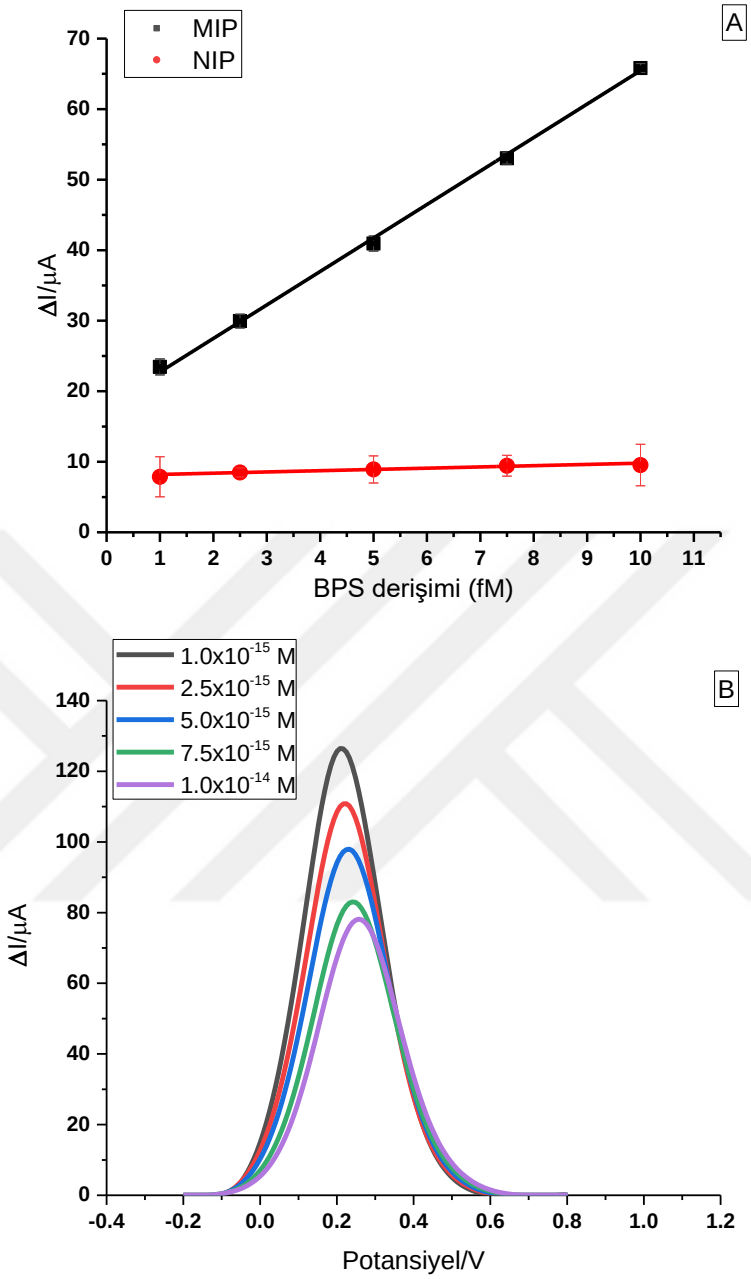
Şekil 3.18. ΔI değerlerine karşılık farklı bağlanma sürelerinin grafiği (Ölçümler 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisi içerisinde yapılmıştır.).

3.2.3. MA-Tyr@MIP/CKE ile BPS'nin elektrokimyasal tayini

MA-Tyr@MIP/CKE sensörünün analitik performansı ve doğrulanması 1 – 10 fM doğrusal aralığında BPS tayini için DPV ölçümleri gerçekleştirilerek değerlendirilmiştir. Kalibrasyon grafiği, redoks probu olarak 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisi ile MIP ve NIP temelli elektrotlar için ΔI değerlerine karşılık BPS derişimleri kullanılarak çizilmiştir (Şekil 3.19.A). MA-Tyr@MIP/CKE sensörünün kalibrasyon grafiği $\Delta I(\mu A)=4.967\times10^{15}C(M)+18.213$ ($r^2=0.999$) regresyon denklemi ile BPS derişimi ve ΔI değeri arasındaki doğrusal ilişkiyi göstermiştir. Elde edilen verilere göre TS ve TAS değerleri standart sapmaya dayalı hesaplama yapılarak ve TS=3s/m ve TAS=10s/m denklemleri kullanılarak sırasıyla 0.171 fM ve 0.569 fM olarak

bulunmuştur. Şekil 3.19.B, farklı BPS derişimlerinin bağlanmasından sonra elde edilen DPV voltamogramlarını gösterirken, Çizelge 3.6. ise MA-Tyr@MIP/CKE ile BPS için oluşturulan kalibrasyon doğrusuna ait regresyon verilerini özetlemektedir.

MA-Tyr@MIP/CKE sensörünün performansının kontrolü ve doğrulanması için hazırlanan NIP temelli sensörün MIP temelli sensör gibi BPS derişimlerine karşı doğrusal bir yanıt vermediği görülmektedir. Bu da NIP temelli sensörde BPS'ye spesifik boşluklarının oluşmaması ve MA-Tyr@MIP/CKE sensörünün BPS'ye seçici olması ile açıklanmaktadır.



Şekil 3.19. A) MA-Tyr@MIP/CKE ve MA-Tyr@NIP/CKE sensörlerine ait DPV ile elde edilmiş kalibrasyon grafikleri B) Farklı derişimlerde BPS'nin bağlanmasıyla elde edilen 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisine ait DPV voltamogramları.

Çizelge 3.6. Standart çözelti ve serum numunelerinde MA-Tyr@MIP/CKE sensörü ile BPS için elde edilen kalibrasyon eğrisine ait regresyon analizi sonuçları

	Standart çözelti	**Serum**
Doğrusal aralık (M)	$1x10^{-15}$ – $1x10^{-14}$	$1x10^{-15}$ – $1x10^{-14}$
Eğim (μA M^{-1})	$4.697x10^{15}$	$7.340x10^{15}$
Eğimin standart hatası	9.53	3.71
Kesişim (μA)	18.213	53.580
Kesişimin standart hatası	0.585	2.275
Korelasyon katsayısı	0.999	0.998
Teşhis sınırı (M)	$1.71x10^{-16}$	$2.29x10^{-16}$
Tayin alt sınırı (M)	$5.69x10^{-16}$	$7.62x10^{-16}$
Tekrarlanabilirlik (%BSS)*	0.801	0.434
Tekrar elde edilebilirlik (%BSS)*	1.444	1.908

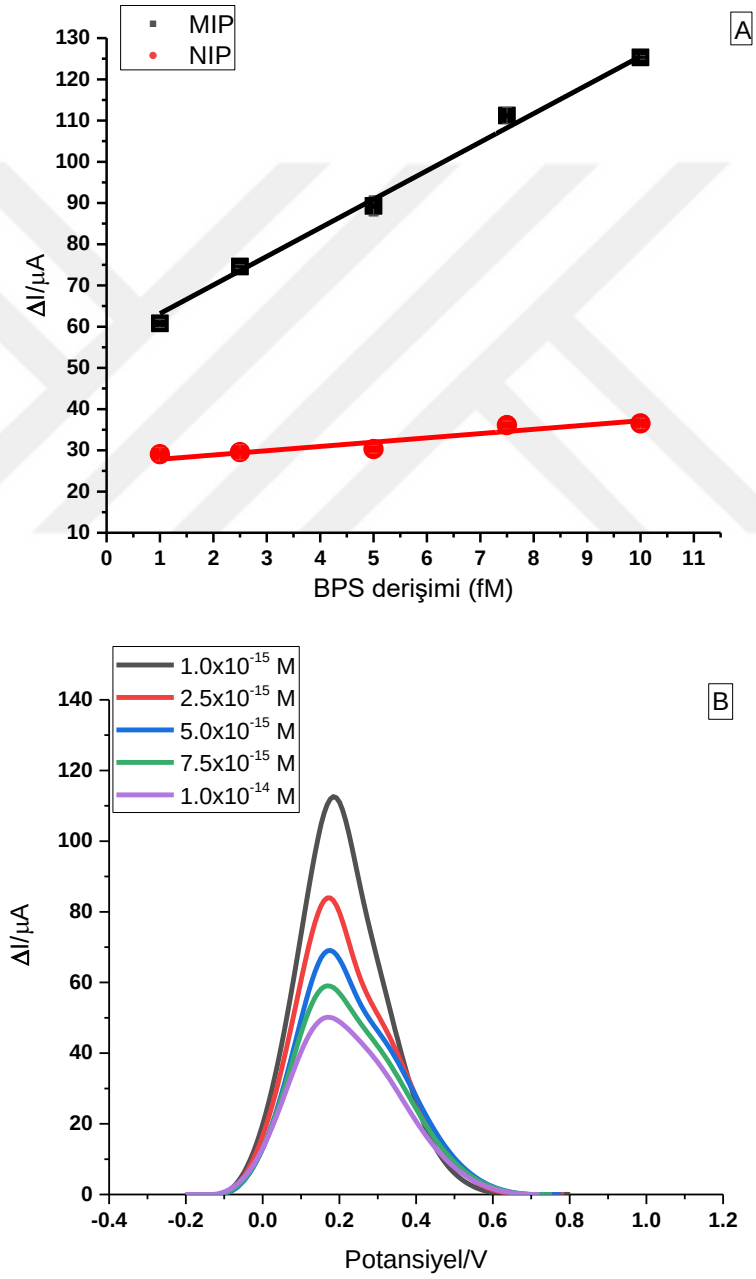
*****Elde edilen %BSS değerlerinin ölçüm sayısı 3'tür.

3.2.4. Ticari insan serumu ve su numunelerinin analizi

Günümüzde kullanılan pek çok ürün güvenli ve bisfenol içermez olarak tanıtılsa da BPS içerebilir ve düşük derişimlerde bile maruziyet vücutta birikim sonucu toksik etkilere neden olabilir. Bu nedenle biyolojik ve ticari örneklerde BPS'nin yüksek duyarlılıkla tayin edilmesi önemlidir. Özellikle serumda BPS varlığının tehlikeli düzeylere ulaşmadan belirlenmesi kritiktir. Geliştirilen MA-Tyr@MIP/CKE sensörü ticari insan serumu ve plastik şişe su numunelerinden BPS tayini için uygulanmıştır.

Serum numunesinde BPS 1 – 10 fM derişim aralığında $\Delta I(\mu A)=7.340\times10^{15}C(M)+53.580$ ($r^2=0.992$) regresyon denklemi ile belirlenmiştir.

Serum numunesinde yapılan kalibrasyona (Şekil 3.20.A) ait regresyon verileri Çizelge 3.6.'da verilmiştir. Serum numunelerinde farklı derişimlerde BPS'nin bağlanmasından sonra elde edilen DPV voltamogramları Şekil 3.20.B'de verilmiştir. TS ve TAS değerleri ise sırasıyla 0.229 fM ve 0.762 fM olarak hesaplanmıştır. Serum örneğinde standart ekleme yapılarak BPA için geri kazanım çalışması yapılmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 3.7.'de verilmiştir.



Şekil 3.20. Ticari serum örneklerinde A) MA-Tyr@MIP/CKE ve MA-Tyr@NIP/CKE sensörlerine ait DPV ile elde edilmiş kalibrasyon grafikleri B) Farklı

derişimlerde BPS'nin bağlanmasıyla elde edilen 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisine ait DPV voltamogramları.

İki farklı marka plastik şişe su örneği ile geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Bunun için, belirlenen üç farklı derişimde standart ekleme yapılarak BPS tayin edilmiştir. Geri kazanım çalışmasıyla elde edilen sonuçlar (Çizelge 3.8.) sensörün doğruluğunu ve uygulanabilirliğini göstermiştir.

Çizelge 3.7. Serum örneği için geri kazanım çalışmasına ait sonuçlar

	Serum örneği
Eklenen miktar (M)	$7.5x10^{-15}$
Bulunan miktar (M)	$7.72x10^{-15}$
Geri kazanım (%)	102.90
%BSS*	1.68
%BH	2.90

*****Elde edilen %BSS değerlerinin ölçüm sayısı 3'tür.

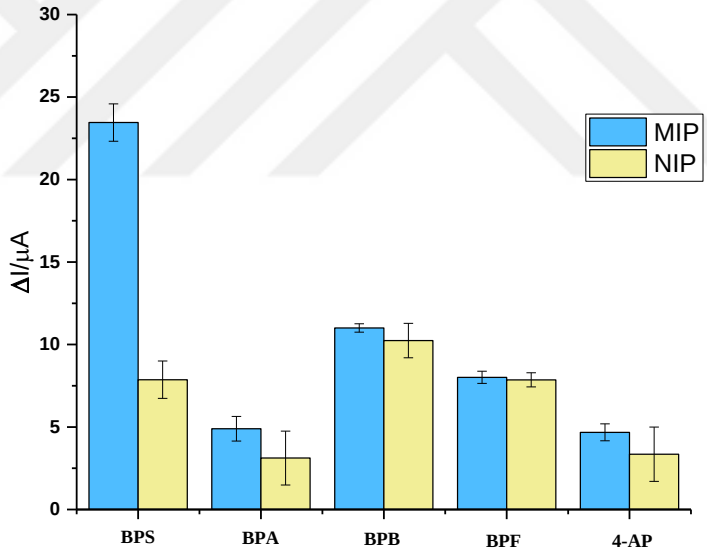
Çizelge 3.8. Su örnekleri için geri kazanım çalışmasına ait sonuçlar

Örnek	**Eklenen miktar (M)**	**Bulunan miktar (M)**	**Geri kazanım (%)**	**BSS (%)***	**BH (%)**
Şişe su-1	0	-	-	-	-
Şişe su -2	0	-	-	-	-
Şişe su -1	$5x10^{-15}$	$4.99x10^{-15}$	99.95	0.80	– 0.05
Şişe su -2	$5x10^{-15}$	$5.08x10^{-15}$	101.56	2.44	+ 1.56
Şişe su -1	$7.5x10^{-15}$	$7.54x10^{-15}$	100.48	0.94	+ 0.48
Şişe su -2	$7.5x10^{-15}$	$7.49x10^{-15}$	99.97	2.02	– 0.03
Şişe su -1	$1x10^{-14}$	$9.83x10^{-15}$	98.30	0.38	– 1.70
Şişe su -2	$1x10^{-14}$	$9.87x10^{-15}$	98.67	0.56	– 1.33

*****Elde edilen %BSS değerlerinin ölçüm sayısı 3'tür.

3.2.5. Seçicilik çalışması

Hedef moleküle spesifik boşluklar oluşturmak için baskılama sürecinin etkinliğini göstermek için BPS'ye benzer yapıda moleküller olan BPA, BPB, BPF ve 4-AP'nın geliştirilen sensöre bağlanma ilgileri değerlendirilmiştir. Baskılama faktörü (IF) değeri BPS için elde edilen ΔI değerinin diğer moleküller için elde edilen ΔI değerlerine oranı olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.21.). IF değeri hem MIP hem NIP için ayrı ayrı hesaplanmıştır. Bağıl IF (IF') ise MIP ve NIP için bulunan IF değerlerinin birbirine oranlanmasıyla hesaplanmıştır (Çizelge 3.9.). Elde edilen sonuçlar MA-Tyr@MIP/CKE sensörünün BPS'ye bağlanma ilgisinin diğer benzer yapılı moleküllere göre daha yüksek olduğunu ve sensördeki boşlukların BPS'ye spesifik olduğunu göstermiştir.



Şekil 3.21. BPS ve diğer benzer yapılı moleküller için IF çalışmalarının değerlendirilmesi.

Çizelge 3.9. BPS, BPA, 4-AP, BPB ve BPF için IF hesaplamaları

	MIP		NIP		
	ΔI/µA	**$IF_{(MIP)}$**	**ΔI/µA**	**$IF_{(NIP)}$**	**$IF'_{(MIP/NIP)}$**
BPA	23.456	–	7.869	–	–
BPS	4.896	4.791	3.119	2.523	1.899
4-AP	4.679	5.013	3.351	2.348	2.135
BPB	11.003	2.132	10.240	0.768	2.774
BPF	8.013	2.297	7.860	1.001	2.924

3.2.6. Girişim etkisinin değerlendirilmesi

En çok bilinen girişim etkili türler olan DOP, AA, Na^+, Cl^-, K^+, SO_4^{2-}'ın MA-Tyr@MIP/CKE ile BPS tayini üzerinde girişim etkisi 1:10 derişim oranında değerlendirilmiştir. Çizelge 3.10.'da girişim çalışmalarının %geri kazanım ve %BSS sonuçları verilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda %geri kazanım değerleri %98.87 ile %104.92 arasında bulunmuştur. Bu sonuçlar da seçilen bileşiklerin MA-Tyr@MIP/CKE ile BPS tayini üzerinde önemli bir girişim etkisinin olmadığını göstermiştir.

Çizelge 3.10. Girişim etkili türlerin BPS tayini üzerine etkisi

	Oran	**Geri kazanım (%)**	**BSS (%)***
DOP	1:10	98.87	0.71
AA	1:10	98.84	1.16
Na^+	1:10	100.92	0.95
Cl^-	1:10	104.92	0.46
K^+	1:10	104.92	0.46
SO_4^{2-}	1:10	100.92	0.95

***Elde edilen %BSS değerlerinin ölçüm sayısı 3'tür.

3.2.7. Stabilite çalışması

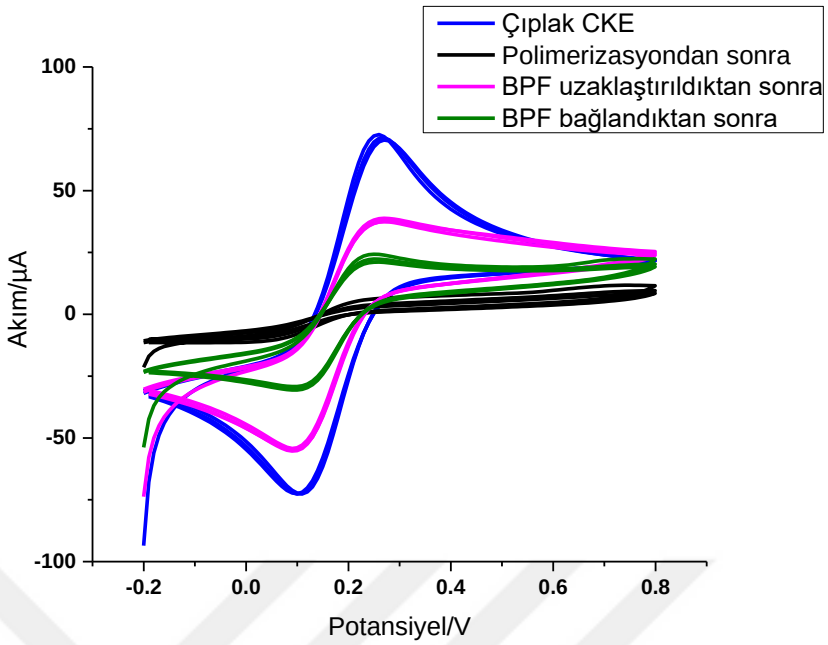
MA-Tyr@MIP/CKE sensörünün stabilitesi 14 günlük bir zaman diliminde 1., 3., 5., 8., 10., 12. ve 14. günlerde ölçüm alınarak belirlenmiştir. Hazırlanan sensör 25ºC'de oda koşullarında bekletilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre MA-Tyr@MIP/CKE sensörü 5. günde %85'e kadar stabilite göstermektedir. Ancak 5. günden sonra yarı yarıya düşerek daha sonra sabit kaldığı gözlemlenmiştir.

3.3. BPF'ye ait bulgular

3.3.1. MIP temelli elektrokimyasal sensörün karakterizasyonu

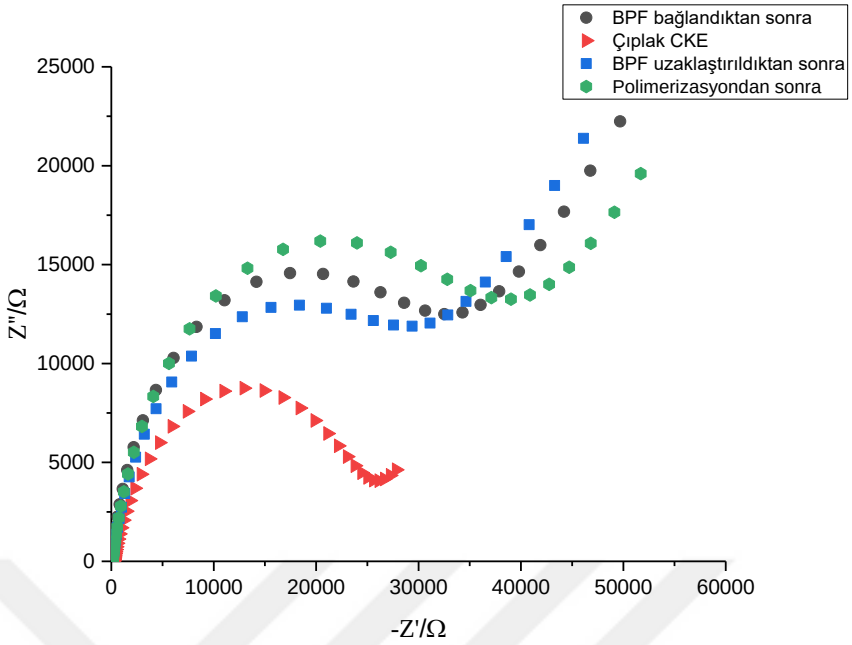
3.3.1.1. Elektrokimyasal karakterizasyon

Elektrokimyasal karakterizasyon için en çok tercih edilen teknikler olan DV ve EIS, MIP(TEOS:L-Trp)@CKE sensörün elektrokimyasal karakterizasyonu için kullanılmıştır. DV yöntemi ile polimerizasyonun farklı aşamalarında 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisinin pikleri değerlendirilmiştir (Şekil 3.22.). Çıplak CKE yüzeyinde elektron transferini engelleyici bir etken olmadığı için en yüksek pike sahiptir, aksine polimerizasyon sonrası yüzeyin kapanması ile pik gözlemlenemez. Bunlara ek olarak; hedef molekül uzaklaştırıldıktan sonra oluşan spesifik boşluklar sayesinde pik yükselirken, BPF'nin bağlanmasıyla pikin yeniden azaldığı gözlemlenmiştir.



Şekil 3.22. MIP(TEOS:L-Trp)@CKE sensörün oluşturulma aşamalarında elde edilen DV voltamogramları.

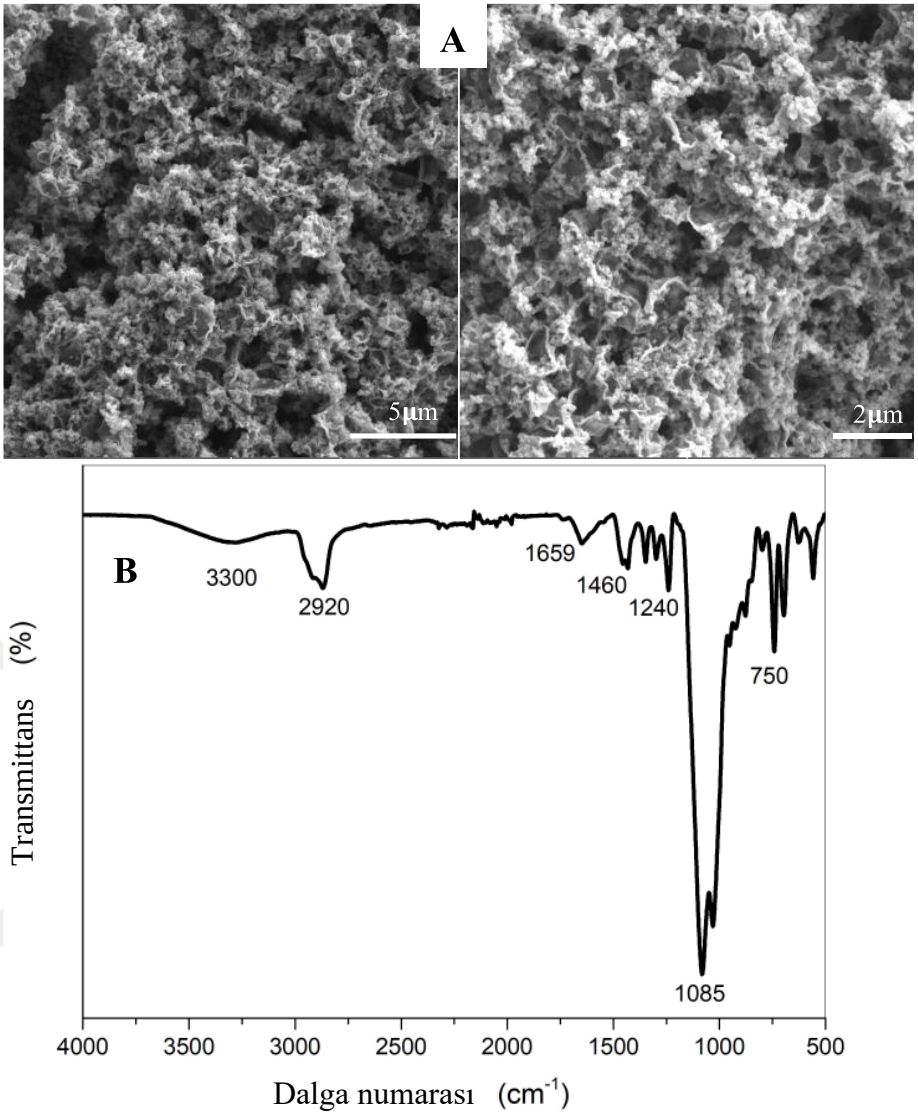
EIS ölçümleri Nyquist grafikleri ve R_{ct} değerlerinin hesaplanmasıyla ifade edilmiştir (Şekil 3.23.). Polimerizasyon öncesi çıplak CKE yüzeyinde yük transferi kolaylıkla gerçekleşebildiği için en düşük R_{ct} değerine (84.68 Ω) sahiptir. Ancak polimerizasyondan sonra elektrot yüzeyinde elektron transferi engellendiği için en yüksek R_{ct} değeri (176.2 Ω) bu aşamada elde edilmiştir. Kalıp molekül uzaklaştırıldıktan sonra baskılanmış boşlukların oluşması sayesinde R_{ct} değeri (130.3 Ω) düşmüştür. Buna karşılık, hedef molekül BPF'nin bağlanması ve gözenekli yapı oluşumuyla R_{ct} değeri 140.1 Ω'a yükselmiştir.



Şekil 3.23. MIP(TEOS:L-Trp)@CKE sensörün oluşturulma aşamalarında elde edilen Nyquist grafikleri.

3.3.1.2. Yüzey karakterizasyonu

CKE yüzeyinde gerçekleştirilen polimerizasyon işleminden sonra TEOS:L-Trp kaplamanın morfolojisi SEM tekniği ile karakterize edilmiş ve elde edilen SEM görüntüleri Şekil 3.24.A'da gösterilmiştir. Bu görüntüler, daha küçük parçacıklara ve daha büyük gözenek boyutlarına sahip, yüksek oranda çapraz bağlı polimer ağını göstermektedir. Şekil 3.24.A'dan birbirine bağlı gözenek boyutunun 2 – 10 µM olduğu belirlenebilir. Görüntülerden gözlemlendiği gibi morfoloji, boyutu 20 – 100 nm arasında değişen farklı partikül şekilleri ile sonuçlanan kümeler oluşturma eğilimindedir.



Şekil 3.24. MIP(TEOS:L-Trp)@CKE sensörün A) SEM görüntüsü, B) FTIR spektrumları.

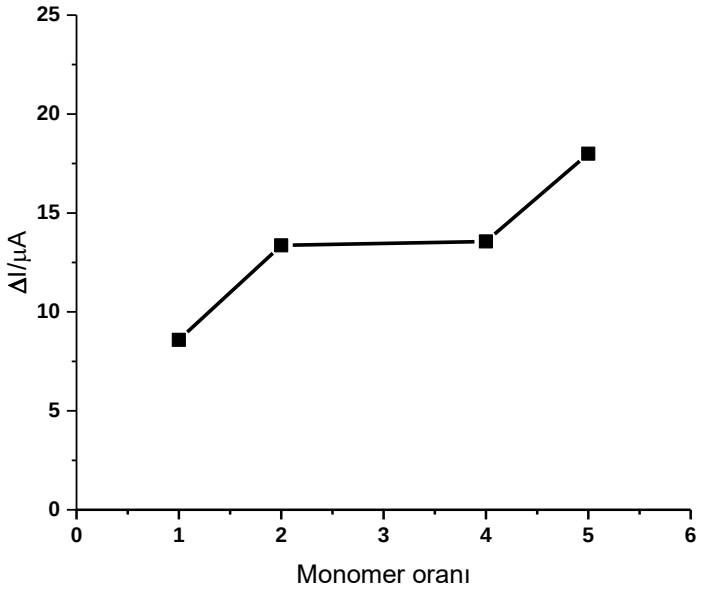
FTIR analizi, L-Trp'nin silika parçacıklarına başarılı bir şekilde dahil edilip edilmediğini doğrulamak için yapılmıştır. Şekil 3.24.B'de silika için Si-O-Si simetrik gerilme titreşimlerini temsil eden karakteristik bir pik olan yaklaşık 1080 cm^{-1}'de spesifik bir bant olduğu görülmektedir. 1659 cm^{-1}'de görülen bant ise, -C=O gerilme titreşimi ile ilişkili olup genellikle amino asitler için karakteristiktir. Trp için kızılötesi bölgedeki ek bant konumları olan 1460, 1240 ve 750 cm^{-1}, -NH, - C-N, ve -CH halka gerilme modlarına katkıda bulunabilir. Ayrıca, 3300 ve 2920 cm^{-1}'de görülen önemli bantlar da sırasıyla birincil aminlerdeki -NH_2'ye ve Trp'nin alifatik zincirindeki -CH_3'e karşılık gelmektedir. Bu bantlar, TEOS içindeki Trp'nin varlığını

kanıtlamaktadır ve dolayısıyla Trp'nin TEOS parçacıklarına başarılı bir şekilde dahil edildiğini göstermektedir.

3.3.2. Deney koşullarının optimizasyonu

3.3.2.1. Monomer:hedef molekül oranı

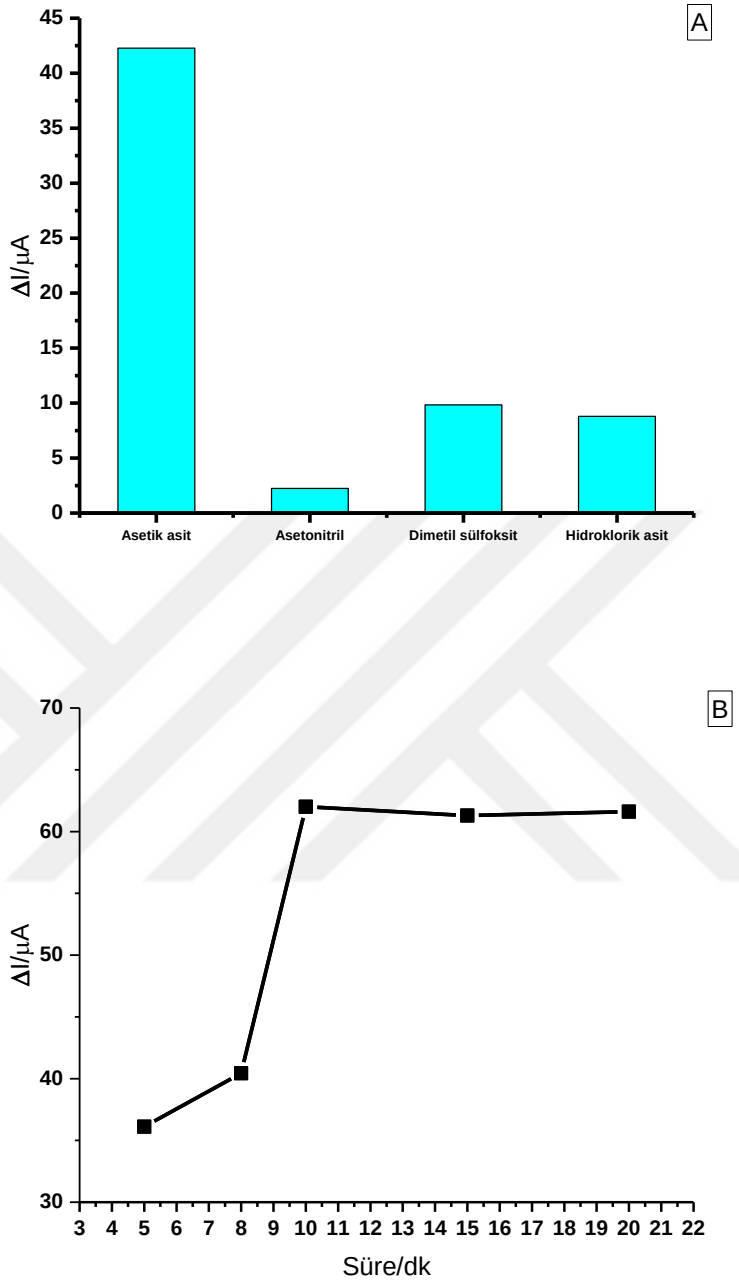
Monomer:hedef molekül oranı kararlı bir polimer yüzey ve sensör geliştirebilmek için kritik bir parametredir. Monomer ve hedef molekülün derişim oranlarındaki değişikliklerin polimer üzerindeki oluşumunu incelemek için 1:1, 1:2, 1:3 ve 1:4 oranları test edilmiştir (Şekil 3.25.). Polimerizasyon sonrası yüzeyin ne kadar kapandığı, $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisinin pik akımı değerlerindeki düşüşle değerlendirilmiştir. Buna göre, monomer oranı arttıkça etkin bir polimer oluşumu elde edilemediği belirlenmiştir. Bu sebeple, 1:1 oranı seçilerek sonraki deneylerde kullanılmıştır.



Şekil 3.25. Polimerizasyon sonrası elde edilen akım değerlerine karşılık farklı monomer:hedef molekül oranlarının grafiği (Ölçümler 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisi içerisinde yapılmıştır.).

3.3.2.2. Hedef molekülün uzaklaştırılma işlemi

Hedef molekülün uzaklaştırılma işleminin optimizasyonu, bağlanma adımı için uygun boşlukları açmak üzere hedef molekül BPF'nin uzaklaştırılması için optimum çözeltinin ve sürenin seçimini içerir. Bu amaçla, farklı çözeltilerin (asetik asit, asetonitril, DMSO ve su) uzaklaştırma etkisinin incelenmesi için MIP(TEOS:L-Trp)@CKE sensörü bu çözeltilerde termal çalkalayıcı kullanılarak 10 dk inkübe edilmiştir. Uzaklaştırma etkisi polimerizasyon ve uzaklaştırma adımlarından sonra $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisinin pik akımları arasındaki farklar üzerinden değerlendirilmiştir (Şekil 3.26.A). Sonuç olarak asetik asit çözeltisinin en iyi performansı gösterdiği belirlenerek bu çözeltinin etkisi 5, 8, 10, 15 ve 20 dk sürelerle test edilmiştir. Şekil 3.26.B'de görüldüğü üzere en iyi uzaklaştırma performansı 10 dk ile elde edilmiş ve sonraki deneylerde optimum süre olarak kullanılmıştır.

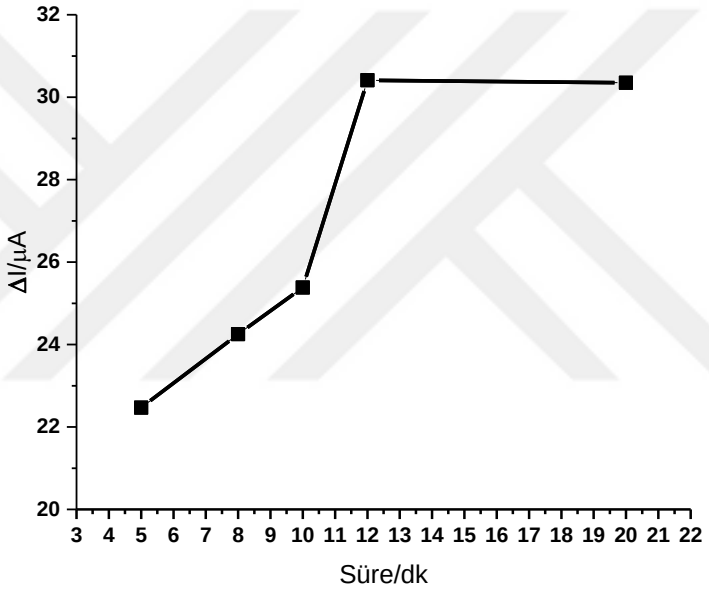


Şekil 3.26. ΔI değerlerine karşılık A) uzaklaştırma çözeltilerinin, B) 10 M asetik asit çözeltisi için uzaklaştırma sürelerinin grafiği (Ölçümler 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisi içerisinde yapılmıştır.).

3.3.2.3. Hedef molekülün bağlanma işlemi

Hedef molekülün bağlanma işlemi sensör performansını ve analiz süresini doğrudan etkileyen bir parametredir. Bu adımın optimize edilmesi için BPF

molekülleri için farklı inkübasyon süreleri (5, 8, 10, 12 ve 20 dk) değerlendirilmiştir (Şekil 3.27.). İnkübasyon işlemi, termal çalkalayıcı kullanılarak oda sıcaklığında ve 650 rpm'de gerçekleştirildi. Bu adımda, BPF'nin baskılı polimer ağında boşluklara kararlı biçimde bağlanabilmesi, bu sayede geliştirilen sensörün yeniden kullanılabilir olması ve tekrar edilebilir sonuçlar vermesi değerlendirilmiştir. Ayrıca, inkübasyon süresinin fazla uzun olmasıyla birlikte boşlukların aşırı doymasına neden olmaktan da kaçınmak gerekmektedir. Tüm bunlar göz önünde bulundurulduğunda en iyi ve etkili performansın 12 dk ile elde edildiği belirlenmiştir.

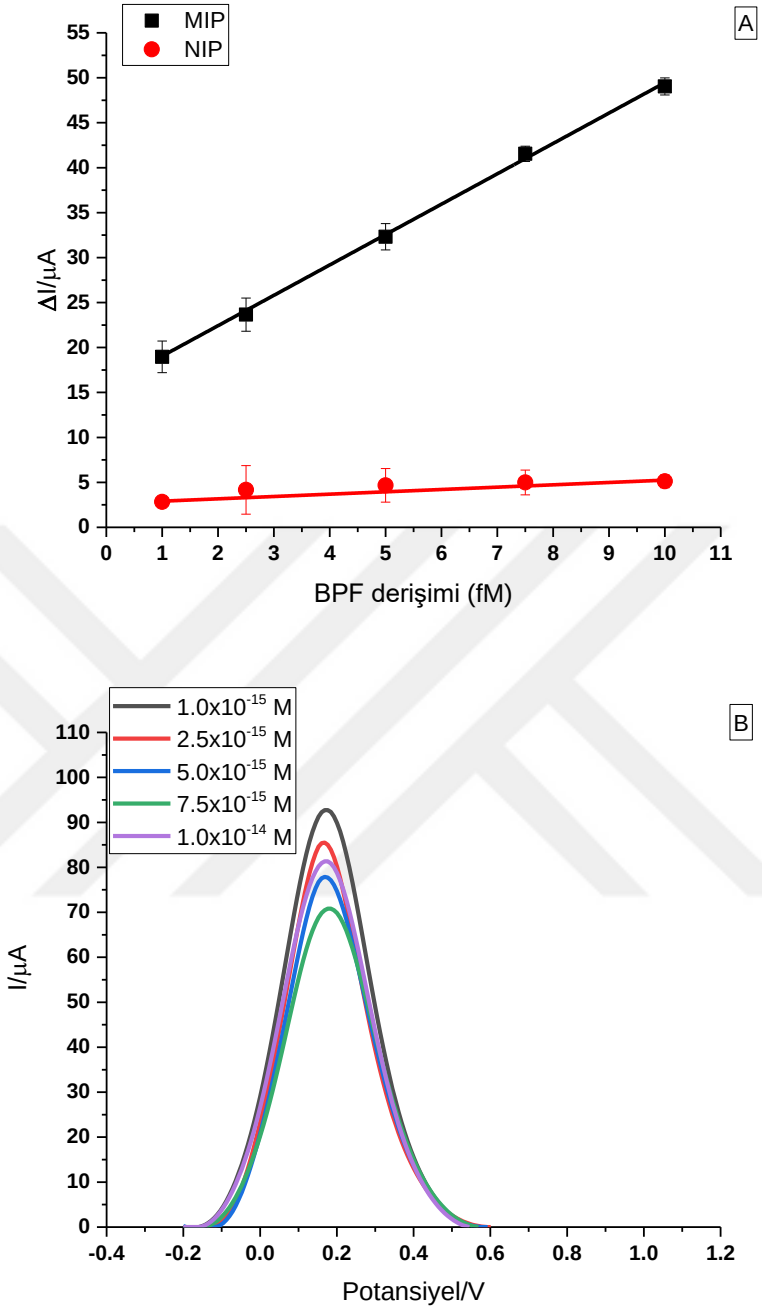


Şekil 3.27. ΔI değerlerine karşılık farklı bağlanma sürelerinin grafiği (Ölçümler 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisi içerisinde yapılmıştır.).

3.3.3. MIP(TEOS:L-Trp)@CKE ile BPF'nin elektrokimyasal tayini

BPF'nin $1x10^{-15}$ M ile $1x10^{-14}$ M derişim aralığında tayin edilmesi, DPV tekniği ve redoks probu olarak 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisi kullanılarak MIP(TEOS:L-Trp)@CKE sensöründe gerçekleştirilmiştir. MIP(TEOS:L-Trp)@CKE sensörünün performansını ve doğrulamasını değerlendirmek için doğrusal kalibrasyon grafiği (Şekil 3.28.A) ve regresyon verileri (Çizelge 3.11) kullanılmıştır. BPF'nin tayininde

MIP(TEOS:L-Trp)@CKE için $\Delta I(\mu A)=3.395\times10^{15}C(M)+15.446$ ($r^2=0.999$) doğrusal regresyon denklemi bulunmuştur. Elde edilen bu denklem ve kalibrasyon grafiği ΔI değerleri ile BPF derişimleri arasındaki doğrusallığı ifade etmiştir. TS ve TAS değerleri standart sapmaya dayalı hesaplama yapılarak ve TS=3s/m ve TAS=10s/m denklemleri kullanılarak sırasıyla 0.291 fM ve 0.971 fM olarak bulunmuştur. Belirlenen doğrusal aralıkta BPF'nin farklı derişimlerinin bağlanmasından sonra elde edilen 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisine ait DPV pikleri Şekil 3.28.B'de verilmiştir. MIP(TEOS:L-Trp)@CKE sensörü ile elde edilen doğrusallığın aksine NIP temelli sensör ΔI değerleri ile BPF derişimleri arasında bir doğrusal ilişki göstermemiştir. Bu sonuç MIP(TEOS:L-Trp)@CKE sensörünün seçiciliğini ve performansını doğrulamıştır.



Şekil 3.28. A) MIP(TEOS:L-Trp)@CKE ve NIP(TEOS:L-Trp)@CKE sensörlerine ait DPV ile elde edilmiş kalibrasyon grafikleri B) Farklı derişimlerde BPF'nin bağlanmasıyla elde edilen 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisine ait DPV voltamogramları.

Çizelge 3.11. Standart çözelti ve serum numunelerinde MIP(TEOS:L-Trp)@CKE sensörü ile BPF için elde edilen kalibrasyon eğrisine ait regresyon analizi sonuçları

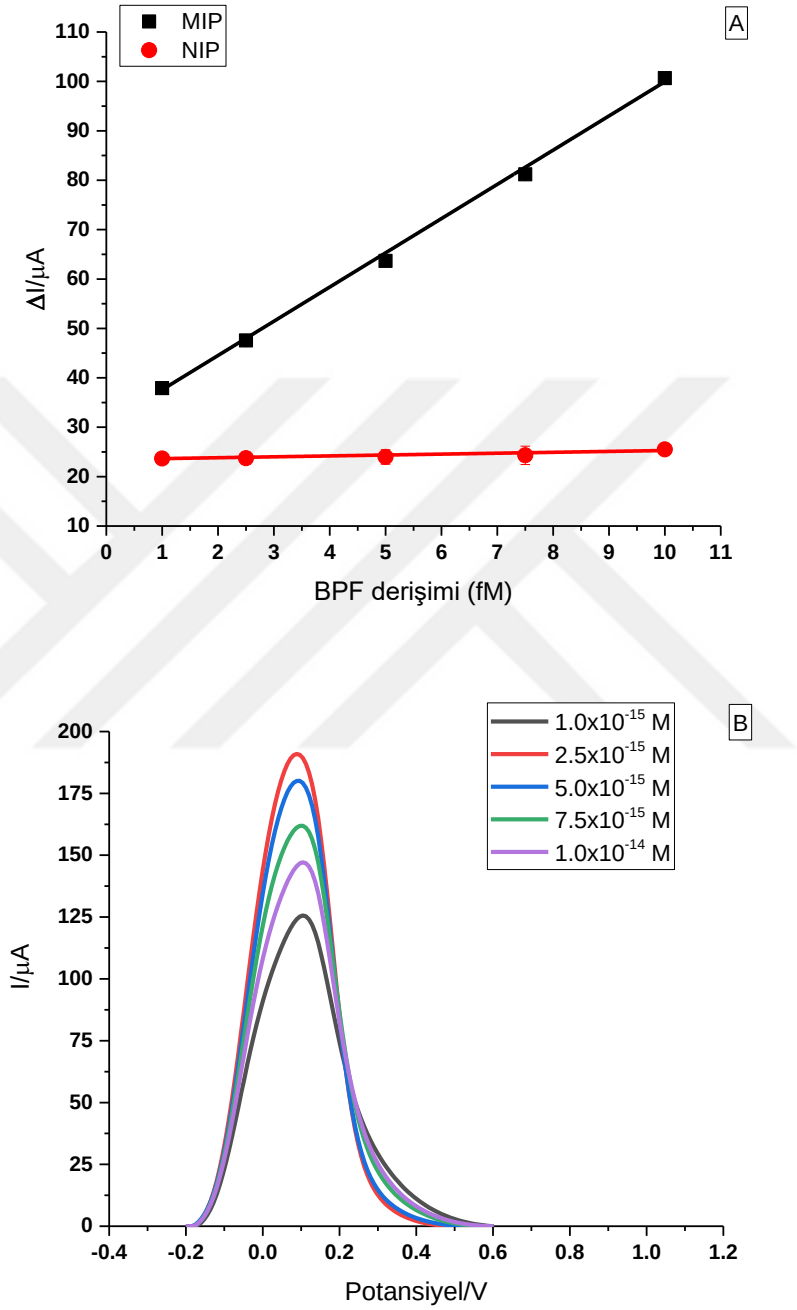
	Standart çözelti	**Serum**
Doğrusal aralık (M)	$1x10^{-15}$ – $1x10^{-14}$	$1x10^{-15}$ – $1x10^{-14}$
Eğim (μA M^{-1})	$3.395x10^{15}$	$6.933x10^{15}$
Eğimin standart hatası	8.72	1.18
Kesişim (μA)	15.446	30.146
Kesişimin standart hatası	0.656	0.520
Korelasyon katsayısı	0.999	0.999
Teşhis sınırı (M)	$2.91x10^{-16}$	$0.39x10^{-16}$
Tayin alt sınırı (M)	$9.71x10^{-16}$	$1.32x10^{-16}$
Tekrarlanabilirlik (%BSS)*	0.851	0.242
Tekrar elde edilebilirlik (%BSS)*	1.842	0.922

*****Elde edilen %BSS değerlerinin ölçüm sayısı 3'tür.

3.3.4. Ticari insan serumu ve su numunelerinin analizi

Ticari ürünlerde BPA yerine BPF gibi diğer BP analoglarının artan kullanımı kontaminasyon ve maruz kalma olasılığını artırmaktadır. Bu nedenle, bu çalışmada MIP(TEOS:L-Trp)@CKE sensörü ile ticari insan serumu ve plastik şişe su örneklerinden BPF tayini ve geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. BPF'nin tayini için standart çözelti ile aynı derişim aralığı (1 – 10 fM) uygulanmıştır. Serum örneği için doğrusal regresyon denklemi, sırasıyla 0.039 fM ve 0.132 fM TS ve TAS değerleri ile $\Delta I(\mu A)=6.933\times10^{15}C(M)+30.146$ ($r^2=0.998$) olarak bulunmuştur (Şekil 3.29.A, Çizelge 3.11.). BPF moleküllerinin farklı derişimlerinin bağlanmasından sonra elde edilen DPV voltamogramları da sensör yanıtının doğrusallığını gösterirken (Şekil

3.29.B), serum örneğindeki geri kazanım çalışmaları sensörün doğruluğunu ortaya koymuştur. (Çizelge 3.12.).



Şekil 3.29. Ticari serum örneklerinde A) MIP(TEOS:L-Trp)@CKE ve NIP(TEOS:L-Trp)@CKE sensörlerine ait DPV ile elde edilmiş kalibrasyon grafikleri B) Farklı derişimlerde BPF'nin bağlanmasıyla elde edilen 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisine ait DPV voltamogramları.

Çizelge 3.12. Serum örneği için geri kazanım çalışmasına ait sonuçlar

	Serum örneği
Eklenen miktar (M)	$5x10^{-15}$
Bulunan miktar (M)	$4.96x10^{-15}$
Geri kazanım (%)	99.13
%BSS*	0.97
%BH	0.87

*****Elde edilen %BSS değerlerinin ölçüm sayısı 3'tür.

Su örneğine uygulama çalışmalarının ilk adımı, bölüm plastik su şişelerinin güneş ışığına, yüksek sıcaklığa ve UV ışığına maruz bırakılmasıydı. Belirli zaman aralıklarında ölçümler yapıldıktan sonra, iki marka plastik şişe su numunesinin MIP(TEOS:L-Trp)@CKE sensörünün doğrusal aralığında BPF içermediği bulunmuştur. Bir sonraki adım olarak, serum çözeltisine belirlenen üç farklı derişimde BPF ilave edilerek ölçümler yapılmıştır. Çizelge 3.13.'te gösterilen geri kazanım çalışması sonuçları, MIP(TEOS:L-Trp)@CKE sensörünün uygulanabilirliğini ve doğruluğunu göstermiştir.

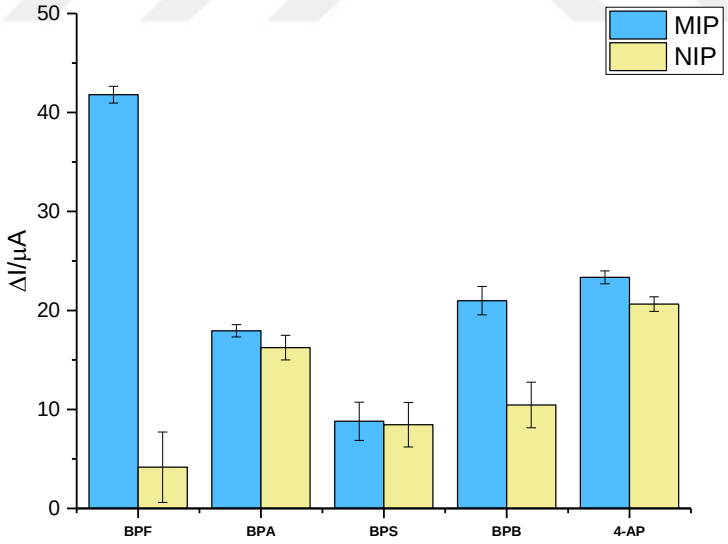
Çizelge 3.13. Su örnekleri için geri kazanım çalışmasına ait sonuçlar

Örnek	**Eklenen miktar (M)**	**Bulunan miktar (M)**	**Geri kazanım (%)**	**BSS (%)***	**BH (%)**
Şişe su-1	0	-	-	-	-
Şişe su -2	0	-	-	-	-
Şişe su -1	$1x10^{-15}$	$1.01x10^{-15}$	100.53	2.32	+ 0.53
Şişe su -2	$1x10^{-15}$	$0.99x10^{-15}$	98.83	2.17	– 1.17
Şişe su -1	$2.5x10^{-15}$	$2.52x10^{-15}$	100.76	2.72	+ 0.76
Şişe su -2	$2.5x10^{-15}$	$2.56x10^{-15}$	102.37	2.94	+ 2.37
Şişe su -1	$5x10^{-15}$	$5.11x10^{-15}$	102.21	1.07	+ 2.21
Şişe su -2	$5x10^{-15}$	$5.07x10^{-15}$	98.67	0.56	+ 1.42

*****Elde edilen %BSS değerlerinin ölçüm sayısı 3'tür.

3.3.5. Seçicilik çalışması

IF değeri, hedef molekül ile diğer her bir bileşiğin MIP ve NIP temelli sensörlere bağlanma ilgisini değerlendirerek sensörün seçiciliğini gösterir. MIP temelli sensöre ait ΔI değerlerinin NIP temelli sensöre ait ΔI değerlerine oranı olarak hesaplanabilen IF değerinin daha yüksek olması spesifik boşlukların varlığından dolayı hedef bileşik için daha yüksek seçiciliği göstermektedir. Şekil 3.30.'da görüldüğü üzere, diğer rakip bileşiklere kıyasla en yüksek IF değerinin BPF'ye ait olması, MIP(TEOS:L-Trp)@GCE sensörünün seçiciliğini doğrulamaktadır. BPF, BPA, BPS, BPB ve 4-AP'ye ait IF hesaplamaları Çizelge 3.14.'te verilmiştir. Bağıl IF (IF') değeri ise $IF'=IF_{(MIP)}/IF_{(NIP)}$ olarak hesaplanır ve hedef moleküle spesifik boşlukların oluştuğunun bir diğer göstergesidir. Elde edilen sonuçlar, MIP(TEOS:L-Trp)@CKE sensörünün diğer benzer yapılı moleküllere kıyasla çok iyi bir seçicilik gösterdiğini ortaya koymuştur.



Şekil 3.30. BPF ve diğer benzer yapılı moleküller için IF çalışmalarının değerlendirilmesi.

Çizelge 3.14. BPF, BPS, BPA, 4-AP ve BPB için IF hesaplamaları

	MIP		**NIP**		
	ΔI/µA	**$IF_{(MIP)}$**	**ΔI/µA**	**$IF_{(NIP)}$**	**$IF'_{(MIP/NIP)}$**
BPF	41.801	–	4.168	–	–
BPA	17.944	2.330	16.248	0.257	9.081
4-AP	23.344	1.791	20.647	0.202	8.870
BPB	20.990	1.991	10.454	0.399	4.995
BPS	8.803	4.748	8.454	0.493	9.631

3.3.6. Girişim etkisinin değerlendirilmesi

BPF'nin tayini için seçilen girişim etkili maddelerin MIP(TEOS:L-Trp)@CKE üzerindeki girişim etkisi, her bir madde için 1:10 konsantrasyon oranında bir karışım kullanılarak araştırılmıştır. Burada girişim etkili maddeler olarak DOP, AA, Na^+, Cl^-, K^+, SO_4^{2-} seçilmiştir. ΔI değerine dayalı olarak, her bileşik için %geri kazanım ve %BSS değerleri hesaplanmıştır. (Çizelge 3.15.). Geri kazanım değerleri %98.26 ile %99.08 arasında hesaplanırken, %BSS sonuçları %0.80 ile %1.85 arasında bulunmuştur. Sonuçlar, MIP(TEOS:L-Trp)@CKE'nin BPF'nin tayini için girişimden etkilenmeyen bir performansa sahip olduğunu göstermektedir.

Çizelge 3.15. Girişim etkili türlerin BPF tayini üzerine etkisi

	Oran	**Geri kazanım (%)**	**BSS (%)***
DOP	1:10	99.08	1.73
AA	1:10	98.60	1.09
Na^+	1:10	98.26	1.85
Cl^-	1:10	98.45	0.80
K^+	1:10	98.45	0.80
SO_4^{2-}	1:10	98.26	1.85

***Elde edilen %BSS değerlerinin ölçüm sayısı 3'tür.

3.3.7. Stabilite çalışması

MIP(TEOS:L-Trp)@CKE sensörünün stabilitesi 14 günlük bir zaman diliminde 1., 3., 5., 8., 10., 12. ve 14. günlerde ölçüm alınarak belirlenmiştir. Hazırlanan sensör 25ºC'de oda koşullarında bekletilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre MIP(TEOS:L-Trp)@CKE sensörü 5. günde %91'e kadar stabilite göstermektedir. Ancak 7. günden sonra yaklaşık olarak %60'a düştüğü gözlemlenmiştir.

4. TARTIŞMA

Doktora tezi kapsamında endokrin bozucu kimyasalların en önemli gruplarından olan bisfenollerden BPA, BPS ve BPF'nin analizi için MIP temelli elektrokimyasal sensörler geliştirilmiştir. Bu sensörlerin hazırlanması, karakterizasyonu, deneysel koşulların optimizasyonu, sensörün analitik performansının değerlendirilmesi ve validasyonu için çeşitli elektrokimyasal, mikroskopik ve spektroskopik tekniklerden yararlanılmıştır. Geliştirilen sensörlerin doğruluğunun ve uygulanabilirliğinin ortaya koyulması için ticari serum ve plastik şişe su örneklerinin analizleri gerçekleştirilmiştir.

Doktora tezi kapsamında çalışılan BP'lerden ilk olarak bu grubun en çok bilinen, kullanılan ve analiz edilen üyesi olan BPA'nın elektrokimyasal analizi için MIP temelli bir sensör geliştirilmiştir. Bu aşamada BPA için geliştirilen MIP çalışmalarında sıklıkla tercih edilen fonksiyonel monomerler yerine ANI tercih edilmiştir. Polimerizasyon adımında ise CKE üzerine elektropolimerizasyon yöntemi ile MIP oluşturulması tercih edilmiştir. Bu sayede kolay uygulanabilir ve hızlı bir polimerizasyon sağlanmıştır. PANI'nin asidik ortamda daha kararlı ve daha iyi bir performans gösterdiği literatür incelemesi sonucu belirlenerek tampon çözelti olarak pH 5.2 seçilmiştir.

DV, DPV ve EIS temelli elektrokimyasal ölçümlerde redoks probu olarak 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisinden yararlanılması sayesinde dolaylı ölçüm yaklaşımı kullanılmıştır. Doğrudan hedef moleküle ait pik akımlarını ölçmek yerine hedef molekülün uzaklaştırılması ve bağlanmasından sonra elde edilen $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ pikleri arasındaki farkların değerlendirilmesi böylelikle doğrudan yöntemlere göre daha düşük derişimlerde çalışma ve daha düşük TS değerlerine ulaşma imkanı elde edilmiştir.

Optimizasyon çalışmaları ile hedef molekülün uzaklaştırılması için gereken süre 10 M asetik asit çözeltisi kullanılarak 60 dk olarak bulunmuştur. Bu süre nispeten uzun olarak düşünülebilir ancak BPA'nın bağlanma süresinin 3 dk olması sensör performansı ve analiz süresini doğrudan etkileyen parametre olarak oldukça avantajlıdır.

Geliştirilen MIP(ANI)/CKE sensörünün doğrusal çalışma aralığı $1x10^{-15}$ M ile $8x10^{-15}$ M arasında bulunmuştur. Çalışma aralığının dar olmasına karşılık femtomolar seviyesinde oldukça düşük TS (0.193 fM) ve TAS (0.643 fM) değerleri elde edilmesi sayesinde BPA varlığını çok düşük derişimlerde yakalayabilen bir sensör geliştirilmiştir. BPA maruziyeti özellikle kümülatif etki ile birlikte sağlığa zararlı sonuçlar doğurabilir. Bu nedenle serum gibi biyolojik örneklerde ve plastik şişe sular gibi BPA içerebilen ticari ürünlerden analiz çok önemlidir. MIP(ANI)/CKE sensörü ile serum örneğinde yapılan analizde doğrusal aralık $1x10^{-15}$ M ile $8x10^{-15}$ M arasında, TS ve TAS değerleri ise sırasıyla 0.257 fM ve 0.856 fM olarak bulunmuştur. Elde edilen %geri kazanım sonuçları da sensörün doğruluğunu ve uygulanabilirliğini kanıtlamıştır.

BPA'nın plastikten suya geçişini arttırmak ve hızlandırmak için iki farklı plastik şişe su 4 ay süreyle ayrı ayrı güneş ışığına, inkübatörde 50°C sıcaklığa ve 8 saat süre ile 254 nm UV ışığa maruz bırakılmıştır. Bu örneklerin MIP(ANI)/CKE sensörünün doğrusal aralığında BPA içermediği belirlendikten sonra üç farklı derişimde standart BPA çözeltileri ilavesiyle geri kazanım çalışmaları başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. %99.93 ile %102.43 arasında elde edilen %geri kazanım sonuçları sensörün su analizlerinde uygulanabilirliğini göstermiştir.

Benzer yapılı moleküller BPS, BPF, BPB ve 4-AP ile yapılan IF çalışmaları sensörün BPA için çok iyi seçiciliğe sahip olduğunu ortaya koymuştur. Böylelikle elektrokimyasal yöntemlerde karşılaşılan seçicilik sorunu bu MIP temelli sensör ile aşılmıştır. Bunlara ek olarak, MIP(ANI)/CKE sensörü girişim etkili maddelerden

etkilenmeyen bir performansa da sahiptir. Ancak, geliştirilen sensör sadece gün boyu kullanılabilmekte ve her gün polimer yüzeyin yeniden hazırlanması gerekmektedir.

Sonuç olarak; BPA analizi için geliştirilen MIP temelli elektrokimyasal sensör MIP(ANI)/CKE, literatürde BPA analizi için yer alan çalışmalara kıyasla daha seçici, duyarlı, düşük maliyetli ve kolay uygulanabilir bir sensör olma özelliği taşır.

Tez çalışması kapsamında bir diğer önemli BP türevi olan ve BPA'ya alternatif olarak benzer özellikleri sayesinde plastiklerin yapısında kullanılmakta olan BPS'nin elektrokimyasal analizi için MIP temelli bir sensör geliştirilmiştir. Bu sensör geliştirilirken MIP oluşturulması için BPA çalışmasından farklı olarak amino asit temelli olarak sentezlenmiş bir fonksiyonel monomer olan MA-Tyr kullanılmıştır. MIP(ANI)/CKE sensöründe monomer ve kalıp molekül dışında bir MIP bileşeni kullanılmazken bu sensörde temel monomer HEMA, çapraz bağlayıcı EGDMA, gözenek oluşturucu PVA ve başlatıcı AIBN kullanılmıştır. Polimerizasyon adımında ise CKE üzerinde UV ışın ile fotopolimerizasyon ile MIP oluşturulmuştur. Kullanılan fonksiyonel monomerin yapı olarak BPS ile polimerizasyonu uygun olması ve fotopolimerizasyon ile 10 dk gibi kısa bir sürede oldukça kararlı bir polimer film elde edilebilmesi bu sensörün diğerine göre avantajlarını ortaya koymaktadır.

BPS analizinde de BPA analizi için olduğu gibi DV, DPV ve EIS temelli elektrokimyasal ölçümlerde redoks probu olarak 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisinden yararlanılması sayesinde dolaylı ölçüm yaklaşımı kullanılmıştır. Doğrudan hedef moleküle ait pik akımlarını ölçmek yerine hedef molekülün uzaklaştırılması ve bağlanmasından sonra elde edilen $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ pikleri arasındaki farkların değerlendirilmesi böylelikle doğrudan yöntemlere göre daha düşük derişimlerde çalışma ve daha düşük TS değerlerine ulaşma imkanı elde edilmiştir.

Optimizasyon çalışmalarında BPA ve BPF çalışmalarından farklı olarak CKE yüzeyine damlatılan fotopolimerizasyon çözeltisinin miktarı da optimize edilerek 1 μL olarak belirlenmiştir. MA-Tyr@MIP/CKE sensöründe hedef molekülün

uzaklaştırılması için en uygun çözelti ve süre, optimizasyon çalışmaları ile 10 M asetik asit çözeltisi ile 8 dk olarak belirlenmiştir. BPS'nin bağlanma süresi için en uygun değer ise 12 dk olarak seçilmiştir. Bu da analiz süresini kısaltan avantajlı bir durum olarak değerlendirilebilir.

MA-Tyr@MIP/CKE sensörünün doğrusal çalışma aralığı MIP(ANI)/CKE sensörüne kıyasla daha geniş olmak üzere $1x10^{-15}$ M ile $1x10^{-14}$ M arasında bulunmuştur. TS ve TAS değerleri ise sensörün yüksek duyarlılıkta olduğunu ortaya koyacak şekilde sırasıyla 0.171 fM ve 0.693 fM olarak hesaplanmıştır.

Biyolojik örneklerden analizin önemi nedeniyle MA-Tyr@MIP/CKE sensörünün doğruluğu ve uygulanabilirliği ticari serum örneği ile değerlendirilmiştir. Bu çalışmaların sonucunda doğrusal aralık $1x10^{-15}$ M ile $1x10^{-14}$ M arasında, TS ve TAS değerleri ise sırasıyla 0.229 fM ve 0.762 fM olarak bulunmuştur. %geri kazanım ve %BSS değerleri ise sırasıyla %102.9 ve %1.68 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar da MA-Tyr@MIP/CKE sensörünün serum örneklerine yüksek doğrulukla uygulanabilirliğini göstermiştir.

BPA tayini için belirli koşullarda bekletilerek hazırlanan plastik şişe su örnekleri ile BPS tayini için yapılan analizler sonucu bu örneklerin MA-Tyr@MIP/CKE sensörünün doğrusal aralığında BPS içermediği belirlendikten sonra üç farklı derişimde standart BPS çözeltileri ilavesiyle geri kazanım çalışmaları başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. %98.30 ile %101.56 arasında elde edilen %geri kazanım sonuçları sensörün su analizlerinde uygulanabilirliğini göstermiştir.

Girişim etkisinin değerlendirilmesi ve IF çalışmaları da MIP(ANI)/CKE sensörü ile aynı adımlarla gerçekleştirilmiştir. MA-Tyr@MIP/CKE sensörü BPS için oldukça seçici ve girişimden etkilenmeyen bir performans göstermiştir.

Bunlara ek olarak, MA-Tyr@MIP/CKE sensörünün stabilitesi 14 gün süreyle, hazırlanan sensör oda koşullarında 25°C'de bekletilerek değerlendirilmiştir. Elde

edilen sonuçlara göre MA-Tyr@MIP/CKE sensörü 5. günde %85'e kadar stabilite göstermektedir. Bu da MIP(ANI)/CKE sensörüne göre daha stabil ve kararlı bir MIP oluşturulduğunu ifade etmektedir. MA-Tyr@MIP/CKE sensörünün hazırlık ve polimerizasyon süreci MA-Tyr@MIP/CKE sensörüne göre daha uzun olmasına karşılık, daha iyi stabilite ve uzun süre kullanılabilirliği sayesinde avantajlıdır.

Tez çalışması kapsamında son olarak BPA'ya alternatif olarak plastiklerin yapısında dayanıklılık arttırıcı olarak kullanılan bir BP türevi olan BPF'nin elektrokimyasal analizi için MIP temelli bir sensör geliştirilmiştir. Bu sensör geliştirilirken, diğer iki sensörden de farklı olarak TEOS ve CTAB kullanılarak silika temelli, gözenekli bir polimer yüzey oluşturulmuştur. Fonksiyonel monomer olarak ise L-Trp tercih edilmiştir. NH_3 ise TEOS'un hidrolizi ile polimer oluşumu üzerinde etkisi nedeniyle kullanılmıştır.

Polimerizasyon adımı ise CKE yüzeyine polimerizasyon çözeltisi damlatıldıktan sonra inkübatörde 50°C'de 30 dk süreyle termal polimerizasyon ile gerçekleştirilmiştir. MIP(TEOS:L-Trp)@CKE sensörünün hazırlık aşamaları MA-Tyr@MIP/CKE sensörü ile benzerlik göstermekle birlikte polimerizasyonun ısı ile gerçekleşmesi ve MIP(ANI)/CKE ve MA-Tyr@MIP/CKE sensörlerine göre daha uzun sürede gerçekleşmesi açısından farklılık göstermektedir.

BPF analizinde de BPA ve BPS analizi için olduğu gibi DV, DPV ve EIS temelli elektrokimyasal ölçümlerde redoks probu olarak 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisinden yararlanılması sayesinde dolaylı ölçüm yaklaşımı kullanılmıştır. Doğrudan hedef moleküle ait pik akımlarını ölçmek yerine hedef molekülün uzaklaştırılması ve bağlanmasından sonra elde edilen $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ pikleri arasındaki farkların değerlendirilmesi böylelikle doğrudan yöntemlere göre daha düşük derişimlerde çalışma ve daha düşük TS değerlerine ulaşma imkanı elde edilmiştir.

Optimizasyon çalışmalarında yine hedef molekülün uzaklaştırılması ve bağlanması adımları optimize edilmiştir. Buna göre, hedef molekülün uzaklaştırılması

10 M asetik asit çözeltisi ile 10 dk'da gerçekleştirilirken BPF'nin bağlanması ise 12 dk'da sağlanmıştır.

MIP(TEOS:L-Trp)@CKE sensörünün doğrusal çalışma aralığı MA-Tyr@MIP/CKE sensörü ile aynı bulunmuştur ($1x10^{-15}$ M ile $1x10^{-14}$ M arasında). TS ve TAS değerleri ise sırasıyla 0.291 fM ve 0.971 fM olarak bulunmuştur. Hesaplanan bu değerler de MIP(TEOS:L-Trp)@CKE sensörünün literatürde BPF analizi yapılan çalışmalara göre daha duyarlı olduğunu göstermektedir.

BPA kullanımının kısıtlı ve kontrollü olması ticari ürünlerde BPF gibi diğer BP türevlerinin kullanımını arttırmıştır. Bu nedenle, bu çalışmada MIP(TEOS:L-Trp)@CKE sensörü ile ticari insan serumu ve plastik şişe su örneklerinden BPF tayini ve geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmaların sonucunda serum örneği için doğrusal aralık $1x10^{-15}$ M ile $1x10^{-14}$ M arasında bulunurken, TS ve TAS değerleri ise sırasıyla 0.039 fM ve 0.132 fM olarak hesaplanmıştır. Serum örneğinden geri kazanım çalışması sonucu %geri kazanım ve %BSS değerleri ise sırasıyla %99.13 ve %0.97 olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak MIP(TEOS:L-Trp)@CKE sensörü, iyi bir geri kazanım ve doğrulukla BPF tayini için serum numunelerine uygulanabilmektedir.

BPA tayini için belirli koşullarda bekletilerek hazırlanan plastik şişe su örnekleri BPF tayini için yapılan analizlerde de kullanılmıştır. Ölçümler sonucunda bu örneklerin MIP(TEOS:L-Trp)@CKE sensörünün doğrusal aralığında BPF içermediği belirlenmiştir. Bunun üzerine iki farklı markada su örneğine üç farklı derişimde standart BPF çözeltileri ilavesiyle geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. %geri kazanım değerleri %98.83 ve %102.37 arasında bulunmuştur. %BSS değerlerinin de iyi olması bu sensörün su numunelerine de başarılı bir şekilde uygulanabildiğini göstermiştir.

Sensörün seçiciliğini değerlendirmede kullanılan parametreler olan IF hesaplamaları ve girişim etkisi MIP(TEOS:L-Trp)@CKE sensörü için de uygulanmıştır. Buna göre MIP(TEOS:L-Trp)@CKE sensörünün BPF'ye olan ilgisi diğer benzer yapılı moleküller olan BPA, BPS, BPB ve 4-AP'ye kıyasla daha yüksek

olup BPF tayini için seçiciliğe sahip bir analiz gerçekleştirilebilmektedir. Ayrıca girişim yapan türlerden etkilenmeden BPF tayin edilebilmektedir.

Son olarak, MIP(TEOS:L-Trp)@CKE sensörünün stabilitesi 14 gün süren bir çalışmayla, belirli aralıklarla ölçümler alınarak saptanmıştır. Buna göre MIP(TEOS:L-Trp)@CKE sensörü 5. günde %91'e kadar stabilite göstermektedir. Bu da BPF analizi için geliştirilen sensörün BPA ve BPS analizi için geliştirilen sensörlere göre daha kararlı olduğunu ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak, BPA, BPS ve BPF'nin analizi için geliştirilen MIP temelli elektrokimyasal sensörler bu moleküllerin analizi için literatürde yer alan diğer çalışmalara kıyasla daha hassas, daha kolay uygulanabilir, daha uygun maliyetli, çevre ve kullanıcı dostu seçenekler olarak öne çıkmaktadır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında endokrin bozucu kimyasal gruplarından bisfenollerin en önemli türevleri BPA, BPS ve BPF'nin elektrokimyasal analizi için MIP temelli sensörler geliştirilerek serum ve plastik şişe su örneklerinin analizlerine uygulanmıştır. Bu bileşiklerin analizi için geliştirilen MIP temelli elektrokimyasal sensörlerin analitik yöntem validasyonu yapılmıştır.

Giriş bölümünde doktora tez çalışmasının amacı açıklanmış ve endokrin bozucu kimyasallar ile tez kapsamında çalışılan bisfenoller ile ilgili bilgiler verilmiştir. Sensör geliştirmede kullanılan moleküler baskılama teknolojisi ve MIP'ler de bu bölümlerin devamında detaylı olarak açıklanmıştır. Gereç ve yöntem bölümünde sensör geliştirme ve analiz için tercih edilen ana yöntem olan elektrokimya ve elektrokimyasal teknikler anlatılırken, tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler, cihaz ve ekipmanlar, elektrokimyasal sistem ve çözeltilerin hazırlanması da bu bölümde açıklanmıştır. BPA, BPS ve BPF için geliştirilen sensörlerin karakterizasyonu, deney koşullarının optimizasyonu, elektrokimyasal tayin, seçicilik, girişim ve stabilite çalışmalarının sonuçları ise bulgular bölümünde açıklanmıştır.

Tez kapsamında bütün analizlerde kullanılan elektrokimyasal sistemde çalışma elektrodu CKE'dir. Sensörlerin analitik değerlendirmesi ile ilgili tüm elektrokimyasal ölçümlerde DV ve DPV yöntemleri ile 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisi kullanılmıştır.

İlk olarak; BPA'nın serum ve su örneklerinden, yüksek hassasiyetle, seçici ve hızlı olarak tayin edilebilmesi için MIP temelli bir elektrokimyasal sensör geliştirilmiştir. MIP(ANI)/CKE sensörü hazırlanırken fonksiyonel monomer ANI'nın hedef molekül BPA varlığında elektropolimerizasyonu CKE üzerinde DV yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. MIP(ANI)/CKE sensörünün yüzeyi DV, EIS, FTIR, SEM yöntemleri kullanılarak ve temas açısı ölçümleri ile karakterize edilmiştir. MIP(ANI)/CKE sensörünün $1x10^{-15}$ M ile $8x10^{-15}$ M doğrusal aralığında oldukça duyarlı bir performans gösterdiği belirlenmiştir. TS ve TAS değerleri ise sırasıyla

0.193 fM ve 0.643 fM olarak hesaplanmıştır. MIP(ANI)/CKE sensörünün doğruluğu ve uygulanabilirliğinin değerlendirilmesi için ticari insan serumu ve plastik şişe su örnekleri kullanılmıştır. Serum örneğinde doğrusal aralık $1x10^{-15}$ M ile $8x10^{-15}$ M arasında bulunurken TS ve TAS değerleri ise 0.257 fM ve 0.856 fM olarak hesaplanmıştır. Geri kazanım çalışmaları sonucunda %geri kazanım değerleri %99.93 ve %102.43 arasında bulunmuş, bu da sensörün doğruluğunu kanıtlamıştır. IF çalışmaları ve girişim etkisinin değerlendirilmesi için diğer BP türevleri ve girişim etkili moleküller kullanılarak sensörün seçiciliği ifade edilmiştir. Bunlara ek olarak sensörün performansının kontrolü NIP temelli sensör uygulaması ile kontrol edilmiştir. Sonuç olarak, geliştirilen MIP(ANI)/CKE sensörü literatürde yer alan diğer çalışmalara kıyasla BPA tayini için oldukça duyarlı, seçici ve kolay uygulanabilir bir seçenek olarak öne çıkmaktadır.

Bir sonraki adımda; BPS'nin seçici ve duyarlı tayini için, MA-Tyr fonksiyonel monomeri kullanılarak CKE üzerine fotopolimerizasyon ile MIP temelli bir elektrokimyasal sensör geliştirilmiştir. MA-Tyr@MIP/CKE sensörünün karakterizasyonu için DV, EIS, SEM ve FTIR yöntemleri kullanılmıştır. DPV ölçümleri ise geliştirilen MA-Tyr@MIP/CKE sensörünün analitik performansının değerlendirilmesi için kullanılmıştır. MIP'i etkileyen deneysel koşullar optimize edilmiş ve bu koşullar altında BPS derişimin $1x10^{-15}$ M ile $1x10^{-14}$ M aralığında ΔI değerine karşı doğrusallık gösterdiği bulunmuştur. Yapılan hesaplamalar doğrultusunda TS ve TAS değerleri 0.171 fM ve 0.569 fM olarak bulunmuştur. MA-Tyr@MIP/CKE sensörünün biyolojik ve ticari örneklere uygulanabilirliğinin gösterilmesi için ticari insan serumu ve plastik şişe su örneklerinden analizler gerçekleştirilmiştir. Serum örneği için TS, TAS ve %geri kazanım değerleri sırasıyla 0.229 fM, 0.762 fM ve %102.90 olarak hesaplanmıştır. IF ve girişim çalışmalarıyla da MA-Tyr@MIP/CKE sensörünün yüksek duyarlılığa, iyi bir seçicilik, stabilite ve tekrarlanabilirliğe sahip olduğu kanıtlanmıştır.

Son olarak; BPF'nin seçici olarak tayini için TEOS kullanılarak gözenekli bir MIP temelli elektrokimyasal sensör geliştirilmiştir. MIP(TEOS:L-Trp)@CKE sensörü hazırlanırken TEOS ve fonksiyonel monomer L-Trp'nin yanı sıra gözenek oluşturucu

olarak CTAB kullanılmış ve CKE yüzeyi üzerinde polimerizasyon için elektrot 50°C'de inkübatörde 30 dk bekletilmiştir. Sensör yüzeyinin yapısının incelenmesi ve karakterizasyonu için SEM, Raman spektroskopisi, DV ve EIS yöntemlerinden yararlanılmıştır. Hazırlanan MIP(TEOS:L-Trp)@CKE sensörü, $1x10^{-15}$ M ile $1x10^{-14}$ M doğrusal aralığında BPF tayini için çok düşük TS ve TAS değerlerine ulaşabilmiştir. Bu değerler TS ve TAS için sırasıyla 0.291 fM ve 0.971 fM olarak hesaplanmıştır. Sensörün uygulanabilirliğini ve doğruluğunu gösteren serum örneği uygulamasında ise yine aynı doğrusal derişim aralığında oldukça düşük TS (0.039 fM) ve TAS (0.132 fM) değerleri bulunmuştur. Plastik şişe su ve serum örneklerinden yapılan geri kazanım çalışmalarında bulunan %geri kazanım değerleri ise %98.83 ile %102.42 arasında değişmektedir. IF ve girişim çalışmalarıyla da seçiciliğin kanıtlandığı bu sensör BPF tayini için basit, düşük maliyetli, kararlı, duyarlı ve seçici bir sensör olarak belirlenmiştir.

Sonuç olarak doktora tez çalışması kapsamında endokrin bozucu kimyasallar olan BPA, BPS ve BPF tayini için geliştirilen MIP temelli elektrokimyasal sensörlerin, ucuz, hazırlaması kolay, çok düşük analit derişimlerinde bile duyarlı, seçici ve kararlı analiz seçenekleri olarak BP'lerin toksik düzeylere ulaşmadan erken tayin için oldukça avantajlı sensörler olarak değerlendirilebileceği ön görülmektedir.

ÖZET

Endokrin Bozucu Bazı Kimyasalların Seçici ve Hassas Sensörlerle Tayini

Doktora tez çalışması kapsamında endokrin bozucu kimyasalların en önemli grubu bisfenollerden bisfenol A (BPA), bisfenol S (BPS), bisfenol F (BPF)'nin seçici ve hassas tayini için moleküler baskılı polimer (MIP) temelli elektrokimyasal sensörler geliştirilmiştir. Tüm elektrokimyasal ölçümlerde redoks probu olarak 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisi kullanılmıştır. Baskılanmamış polimer (NIP) sensörlerin performansının kontrolünde kullanılmıştır.

BPA'nın hassas, seçici ve hızlı tayini için MIP temelli elektrokimyasal sensör hazırlanırken fonksiyonel monomer anilin ile elektropolimerizasyon yapılmıştır. MIP(ANI)/CKE sensörünün karakterizasyonunda dönüşümlü voltametri (DV), elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS), taramalı elektron mikroskopisi (SEM), Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ve temas açısı ölçümleri yapılmıştır. MIP(ANI)/CKE sensörü standart çözelti ve serum için $1x10^{-15}$ M - $8x10^{-15}$ M doğrusal aralığına ve femtomolar seviyesinde teşhis sınırı (TS) ve tayin alt sınırına (TAS) sahiptir. Sensörün doğruluğu serum ve plastik şişe su örneklerinde geri kazanım çalışmaları ile gösterilmiştir. Baskılama faktörü (IF) ve girişim çalışmaları da seçiciliği kanıtlamıştır. Bu sensör, BPA analizi için oldukça kullanışlı, yüksek duyarlılık ve seçicilikte, düşük maliyetli ve güvenilir bir seçenektir.

BPS'nin elektrokimyasal analizi için amino asit temelli olarak sentezlenen fonksiyonel monomer N-metakriloil-L-tirozin ile fotopolimerizasyon yapılarak MIP temelli bir sensör hazırlanmıştır. Sensörün karakterizasyon çalışması için DV, EIS, SEM ve FTIR yöntemlerinden yararlanılmıştır. MA-Tyr@MIP/CKE sensörünün doğrusal aralığı $1x10^{-15}$ M - $1x10^{-14}$ M bulunmuş, TS ve TAS ise 0.171 fM ve 0.569 fM olarak hesaplanmıştır. Serum ve plastik şişe su örnekleri ile elde edilen iyi geri kazanım değerleri sensörün bu örneklere başarıyla uygulanabildiğini göstermiştir. 14 günlük stabilite değerlendirmesi sensörün 5. güne kadar yüksek stabiliteye sahip olduğu gösterilmiştir. IF çalışmaları da bu sensörün kararlılık, duyarlılık ve tekrarlanabilirlik ile yüksek seçiciliğe sahip olduğunu göstermektedir.

BPF'nin seçici ve duyarlı analizi için fonksiyonel monomer olarak L-Triptofan, tetraetil ortosilikat ve setiltrimetilamonyum bromür kullanılarak gözenekli yapıda bir MIP temelli elektrokimyasal sensör hazırlanmıştır. MIP yüzeyinin karakterizasyonunda SEM, Raman spektroskopisi, DV ve EIS kullanılmıştır. MIP(TEOS:L-Trp)@CKE sensörünün standart çözelti ve serum örneği için doğrusal aralığı $1x10^{-15}$ M - $1x10^{-14}$ M olarak bulunmuştur. Sensörün yüksek duyarlılığını gösteren TS ve TAS 0.291 fM ve 0.971 fM olarak hesaplanmıştır. Plastik şişe su ve serum örnekleri ile elde edilen iyi %geri kazanım değerleri sensörün doğruluğunu göstermiştir. Girişim ve IF analizleri yüksek seçiciliği kanıtlamıştır. Ayrıca, sensörün 5 güne kadar stabil olduğu bulunmuştur. MIP(TEOS:L-Trp)@CKE sensörü BPF tayini için duyarlı, kararlı, seçici ve uygulaması kolay bir seçenektir.

Sonuç olarak; BPA, BPS ve BPF'nin elektrokimyasal analizi için geliştirilen MIP temelli sensörlerin bisfenol analizi için mevcut yöntemlere kıyasla daha avantajlı ve alternatif olarak tercih edilebilecek yöntemler olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Bisfenol A, Bisfenol F, Bisfenol S, Elektrokimyasal sensör, Moleküler baskılı polimer.

SUMMARY

Determination of Some Endocrine Disrupting Chemicals with Selective and Sensitive Sensors

Within the scope of this doctoral thesis, molecularly imprinted polymer (MIP) based electrochemical sensors were developed for the selective and sensitive determination of bisphenol A (BPA), bisphenol s (BPS) and bisphenol F (BPF), the most important group of endocrine disrupting chemicals. 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ solution was used as the redox probe in all electrochemical measurements. Non-imprinted polymer (NIP) was used to control the performance of the sensors.

During the preparation of the MIP based electrochemical sensor for the sensitive, selective and rapid determination of BPA, electropolymerization was performed with the functional monomer aniline. For the characterization of the MIP(ANI)/GCE sensor, cyclic voltammetry (CV), electrochemical impedance spectroscopy (EIS), scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and contact angle measurements were performed. The MIP(ANI)/GCE sensor has a linear range of $1x10^{-15}$ M - $8x10^{-15}$ M for standard solution and serum, and limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) values at femtomolar level. The accuracy of the sensor was demonstrated by recovery studies in serum and plastic bottled water samples. Imprinting factor (IF) and interference studies also proved the selectivity. This sensor is a very useful, highly sensitive and selective, low cost and reliable option for BPA analysis.

For the electrochemical analysis of BPS, a MIP-based sensor was prepared by photopolymerization with the amino acid-based functional monomer N-methacryloyl-L-tyrosine. For the characterization study of the sensor, CV, EIS, SEM and FTIR methods were used. The linear range of the MA-Tyr@MIP/GCE sensor was found as $1x10^{-15}$ M - $1x10^{-14}$ M, while LOD and LOQ were calculated as 0.171 fM and 0.569 fM. Good recovery values obtained with serum and plastic bottled water samples showed that the sensor could be successfully applied to these samples. A 14-day stability assessment demonstrated that the sensor had high stability up to day 5. IF studies also show that this sensor has high selectivity with stability, sensitivity and repeatability.

For the selective and sensitive analysis of BPF, a porous MIP-based electrochemical sensor was prepared using L-Tryptophan as functional monomer, tetraethyl orthosilicate and cetyltrimethylammonium bromide. SEM, Raman spectroscopy, CV and EIS were used to characterize the MIP surface. The linear range of the MIP(TEOS:L-Trp)@GCE sensor for standard solution and serum sample was found as $1x10^{-15}$ M - $1x10^{-14}$ M. The LOD and LOQ showing the high sensitivity of the sensor were calculated as 0.291 fM and 0.971 fM. Good recovery% values obtained with plastic bottled water and serum samples indicated the accuracy of the sensor. Interference and IF analyzes proved high selectivity. Also, the sensor has been found to be stable up to 5 days. The MIP(TEOS:L-Trp)@GCE sensor is a sensitive, stable, selective and easy-to-apply option for BPF determination.

Consequently; it was shown that the MIP-based sensors developed for the electrochemical analysis of BPA, BPS and BPF are more advantageous and alternative methods for bisphenol analysis compared to existing methods.

Keywords: Bisphenol A, Bisphenol F, Bisphenol S, Electrochemical sensor, Molecularly imprinted polymer.

KAYNAKLAR

ABUBAKAR, Y, TIJJANI, H, EGBUNA, C, ADETUNJI, CO, KALA, S, KRYEZIU, TL, IFEMEJE, JC, PATRICK-IWUANYANWU, KC (2020) Pesticides, History, and Classification. *Nat. Remedies Pest, Dis. Weed Control*,: 29–42.

ADUMITRĂCHIOAIE, A, TERTIŞ, M, CERNAT, A, SĂNDULESCU, R, CRISTEA, C (2018) Electrochemical methods based on molecularly imprinted polymers for drug detection. A review. *Int. J. Electrochem. Sci.*, **13**: 2556–2576.

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.

AKHBARIZADEH, R, DOBARADARAN, S, SCHMIDT, TC, NABIPOUR, I, SPITZ, J (2020) Worldwide bottled water occurrence of emerging contaminants: A review of the recent scientific literature. *J. Hazard. Mater.*, **392**: 122271.

ALNAIMAT, AS, BARCIELA-ALONSO, MC, BERMEJO-BARRERA, P (2019) Determination of bisphenol A in tea samples by solid phase extraction and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Microchem. J.*, **147**: 598–604.

AZZOUZ, A, KAILASA, SK, KUMAR, P, BALLESTEROS, E, KIM, KH (2019) Advances in functional nanomaterial-based electrochemical techniques for screening of endocrine disrupting chemicals in various sample matrices. *TrAC - Trends Anal. Chem.*, **113**: 256–279.

BAGHAYERI, M, ANSARI, R, NODEHI, M, RAZAVIPANAH, I, VEISI, H (2018) Voltammetric aptasensor for bisphenol A based on the use of a MWCNT/Fe3O4@gold nanocomposite. *Microchim. Acta*, **185**.. doi:10.1007/s00604-018-2838-y.

BARD, AJ, FAULKNER, LR (2001) Electrochemical Methods Fundamentals and Applications. Second Edi. John Wiley & Sons, Inc. doi:10.1038/s41929-019-0277-8.

BELENGUER-SAPIÑA, C, PELLICER-CASTELL, E, AMORÓS, P, SIMÓ-ALFONSO, EF, MAURI-AUCEJO, AR (2020) A new proposal for the determination of polychlorinated biphenyls in environmental water by using host-guest adsorption. *Sci. Total Environ.*, **724**: 138266.

BELKHAMSSA, N, DA COSTA, JP, JUSTINO, CIL, SANTOS, PSM, CARDOSO, S, DUARTE, AC, ROCHA-SANTOS, T, KSIBI, M (2016) Development of an electrochemical biosensor for alkylphenol detection. *Talanta*, **158**: 30–34.

BELTRAN, A, BORRULL, F, MARCÉ, RM, CORMACK, PAG (2010) Molecularly-imprinted polymers: Useful sorbents for selective extractions.

TrAC - Trends Anal. Chem., **29**: 1363–1375.

BODUR, S, ERARPAT, S, DALGIÇ BOZYIĞIT, G, SELALI CHORMEY, D, ÖZ, E, ÖZDOĞAN, N, BAKIRDERE, S (2020) A sensitive determination method for trace bisphenol A in bottled water and wastewater samples: Binary solvent liquid phase microextraction-quadrupole isotope dilution-gas chromatography-mass spectrometry. *Microchem. J.*, **159**: 1–7.

BOUSOUMAH, R, LESO, V, IAVICOLI, I, HUUSKONEN, P, VIEGAS, S, PORRAS, SP, SANTONEN, T, FRERY, N, ROBERT, A, NDAW, S (2021) Biomonitoring of occupational exposure to bisphenol A, bisphenol S and bisphenol F: A systematic review. *Sci. Total Environ.*, **783**: 146905.

BRETT, CMA, OLIVEIRA-BRETT, AM (1999) Electrochemistry Principles, Methods, and Applications. doi:10.1515/bmte.1999.44.s2.11.

BURGESS, C (2001) Valid Analytical Methods and Procedures. Royal Society of Chemistry.

CABALLERO-CASERO, N, LUNAR, L, RUBIO, S (2016) Analytical methods for the determination of mixtures of bisphenols and derivatives in human and environmental exposure sources and biological fluids. A review. *Anal. Chim. Acta*, **908**: 22–53.

CHAN, CC, LAM, H, LEE, YC, ZHANG, X-M, eds (2004) Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification. John Wiley & Sons, Inc. doi:10.1385/1-59259-670-3:387.

CHEN, L, WANG, X, LU, W, WU, X, LI, J (2016) Molecular imprinting: Perspectives and applications. *Chem. Soc. Rev.*, **45**: 2137–2211.

CHEN, S (2007) Practical electrochemical cells. In Handbook of Electrochemistry. Ed C.G. Zoski. Elsevier B.V. pp 33–56.

CHEN, X, WEI, L, LIU, Q, ZHAO, J (2021) Solid-liquid-solid conversion microextraction combined with high-performance liquid chromatography for determination of bisphenols. *Microchem. J.*, **169**: 106538.

COLE, L (2016) Chapter 3.1 - The Endocrine System. In Human Physiology Biochemistry and Basic Medicine. Elsevier Inc. pp 69–77.

COOKE, PS, SIMON, L, DENSLOW, ND (2013) Endocrine Disruptors. doi:10.1016/B978-0-12-415759-0.00037-6.

COOPER, JE, KENDIG, EL, BELCHER, SM (2011) Assessment of bisphenol A released from reusable plastic, aluminium and stainless steel water bottles. *Chemosphere*, **85**: 943–947.

CUI, B, LIU, P, LIU, X, LIU, S, ZHANG, Z (2020) Molecularly imprinted polymers for electrochemical detection and analysis: progress and perspectives. *J. Mater. Res. Technol.*, **9**: 12568–12584.

CUNHA, SC, INÁCIO, T, ALMADA, M, FERREIRA, R, FERNANDES, JO (2020) Gas chromatography–mass spectrometry analysis of nine bisphenols in canned

meat products and human risk estimation. *Food Res. Int.*, **135**: 109293.

DANG, Y, CUI, R, WANG, X, ZHOU, Y (2018) The construction of an electrochemical sensing interface based on nano-CeO2 cubes for highly sensitive detection of bisphenol A. *New J. Chem.*, **42**: 13856–13863.

ELADAK, S, GRISIN, T, MOISON, D, GUERQUIN, MJ, N'TUMBA-BYN, T, POZZI-GAUDIN, S, BENACHI, A, LIVERA, G, ROUILLER-FABRE, V, HABERT, R (2015) A new chapter in the bisphenol a story: Bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound. *Fertil. Steril.*, **103**: 11–21.

FANG, L, JIA, M, ZHAO, H, KANG, L, SHI, L, ZHOU, L, KONG, W (2021) Molecularly imprinted polymer-based optical sensors for pesticides in foods: Recent advances and future trends. *Trends Food Sci. Technol.*, **116**: 387–404.

FREITAS, JM, WACHTER, N, ROCHA-FILHO, RC (2020) Determination of bisphenol S, simultaneously to bisphenol A in different water matrices or solely in electrolyzed solutions, using a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode. *Talanta*, **217**: 121041.

GOEURY, K, VO DUY, S, MUNOZ, G, PRÉVOST, M, SAUVÉ, S (2019) Analysis of Environmental Protection Agency priority endocrine disruptor hormones and bisphenol A in tap, surface and wastewater by online concentration liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1591**: 87–98.

GRANDIN, FC, LACROIX, MZ, GAYRARD, V, VIGUIÉ, C, MILA, H, DE PLACE, A, VAYSSIÈRE, C, MORIN, M, CORBETT, J, GAYRARD, C, GELY, CA, TOUTAIN, PL, PICARD-HAGEN, N (2019) Is bisphenol S a safer alternative to bisphenol A in terms of potential fetal exposure ? Placental transfer across the perfused human placenta. *Chemosphere*, **221**: 471–478.

GUO, J, WU, C, ZHANG, J, XIAO, H, LV, S, LU, D, QI, X, FENG, C, LIANG, W, CHANG, X, ZHANG, Y, XU, H, CAO, Y, WANG, G, ZHOU, Z (2020) Early life triclosan exposure and neurodevelopment of children at 3 years in a prospective birth cohort. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, **224**: 113427.

HAGINAKA, J (2009) Molecularly imprinted polymers as affinity-based separation media for sample preparation. *J. Sep. Sci.*, **32**: 1548–1565.

HELOU, K, HARMOUCHE-KARAKI, M, KARAKE, S, NARBONNE, JF (2019) A review of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in Lebanon: Environmental and human contaminants. *Chemosphere*, **231**: 357–368.

HOSHYAR, SA, BARZANI, HAH, YARDIM, Y, ŞENTÜRK, Z (2021) The effect of CTAB, a cationic surfactant, on the adsorption ability of the boron-doped diamond electrode: Application for voltammetric sensing of Bisphenol A and Hydroquinone in water samples. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, **610**.. doi:10.1016/j.colsurfa.2020.125916.

HUANG, M, LIU, S, FU, L, JIANG, X, YANG, M (2020) Bisphenol A and its analogues bisphenol S, bisphenol F and bisphenol AF induce oxidative stress

and biomacromolecular damage in human granulosa KGN cells. *Chemosphere*, **253**.. doi:10.1016/j.chemosphere.2020.126707.

HUANG, YY, PANG, YH, SHEN, XF, JIANG, R, WANG, YY (2022) Covalent organic framework DQTP modified pencil graphite electrode for simultaneous determination of bisphenol A and bisphenol S. *Talanta*, **236**: 122859.

HUELSMANN, RD, MARTENDAL, E (2020) A Simple and Effective Liquid-Liquid-Liquid Microextraction Method with Ultraviolet Spectrophotometric Detection for the Determination of Bisphenol A in Aqueous Matrices and Plastic Leachates. *J. Brazilian Chem. Soc.*, **31**: 1575–1584.

JIANG, X, JIANG, N, ZHANG, H, LIU, M (2007) Small organic molecular imprinted materials: Their preparation and application. *Anal. Bioanal. Chem.*, **389**: 355–368.

KAYA, SI, CETINKAYA, A, BAKIRHAN, NK, OZKAN, SA (2020) Trends in sensitive electrochemical sensors for endocrine disruptive compounds. *Trends Environ. Anal. Chem.*, **28**: e00106.

KOMIYAMA, M, TAKEUCHI, T, MUKAWA, T, ASANUMA, H (2003) Molecular Imprinting: From Fundamentals to Applications.

KONIECKI, D, WANG, R, MOODY, RP, ZHU, J (2011) Phthalates in cosmetic and personal care products: Concentrations and possible dermal exposure. *Environ. Res.*, **111**: 329–336.

KRYSCIO, DR, PEPPAS, NA (2012) Critical review and perspective of macromolecularly imprinted polymers. *Acta Biomater.*, **8**: 461–473.

KUBIAK, A, BIESAGA, M (2019) Application of Molecularly Imprinted Polymers for Bisphenols Extraction from Food Samples–A Review. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **0**: 1–11.

LI, H, WANG, W, LV, Q, XI, G, BAI, H, ZHANG, Q (2016) Disposable paper-based electrochemical sensor based on stacked gold nanoparticles supported carbon nanotubes for the determination of bisphenol A. *Electrochem. commun.*, **68**: 104–107.

LIU, J, LIU, Q, WEI, L, CHEN, X, LI, Z, XU, Y, GAO, X, LU, X, ZHAO, J (2022) A novel polyhedral oligomeric silsesquioxane-based hybrid monolith as a sorbent for on-line in-tube solid phase microextraction of bisphenols in milk prior to high performance liquid chromatography-ultraviolet detection analysis. *Food Chem.*, **374**: 131775.

LÓPEZ DE ALDA, MJ, BARCELÓ, D (2000) Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **892**: 391–406.

MADIKIZELA, LM, NOMNGONGO, PN, PAKADE, VE (2022) Synthesis of molecularly imprinted polymers for extraction of fluoroquinolones in environmental, food and biological samples. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **208**:

114447.

MAJDINASAB, M, DANESHI, M, LOUIS MARTY, J (2021) Recent developments in non-enzymatic (bio)sensors for detection of pesticide residues: Focusing on antibody, aptamer and molecularly imprinted polymer. *Talanta*, **232**: 122397.

MALIK, MI, SHAIKH, H, MUSTAFA, G, BHANGER, MI (2019) Recent Applications of Molecularly Imprinted Polymers in Analytical Chemistry. *Sep. Purif. Rev.*, **48**: 179–219.

MATWIEJCZUK, N, GALICKA, A, BRZÓSKA, MM (2020) Review of the safety of application of cosmetic products containing parabens. *J. Appl. Toxicol.*, **40**: 176–210.

MOID ALAMMARI, A, RIZWAN KHAN, M, AQEL, A (2020) Trace identification of endocrine-disrupting bisphenol A in drinking water by solid-phase extraction and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. King Saud Univ. - Sci.*, **32**: 1634–1640.

MONTAGNINI, BG, PERNONCINE, KV, BORGES, LI, COSTA, NO, MOREIRA, EG, ANSELMO-FRANCI, JA, KISS, ACI, GERARDIN, DCC (2018) Investigation of the potential effects of triclosan as an endocrine disruptor in female rats: Uterotrophic assay and two-generation study. *Toxicology*, **410**: 152–165.

NAG, SK, DAS SARKAR, S, MANNA, SK (2018) Triclosan–an antibacterial compound in water, sediment and fish of River Gomti, India. *Int. J. Environ. Health Res.*, **28**: 461–470.

NOSZCZYŃSKA, M, PIOTROWSKA-SEGET, Z (2018) Bisphenols: Application, occurrence, safety, and biodegradation mediated by bacterial communities in wastewater treatment plants and rivers. *Chemosphere*, **201**: 214–223.

NOWAK, K, RATAJCZAK-WRONA, W, GÓRSKA, M, JABŁOŃSKA, E (2018) Parabens and their effects on the endocrine system. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **474**: 238–251.

VAN OVERMEIRE, I, VRIJENS, K, NAWROT, T, VAN NIEUWENHUYSE, A, VAN LOCO, J, REYNS, T (2019) Simultaneous determination of parabens, bisphenols and alkylphenols in human placenta by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **1121**: 96–102.

OWCZAREK, K, KUBICA, P, KUDŁAK, B, RUTKOWSKA, A, KONIECZNA, A, RACHOŃ, D, NAMIEŚNIK, J, WASIK, A (2018) Determination of trace levels of eleven bisphenol A analogues in human blood serum by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Sci. Total Environ.*, **628**–**629**: 1362–1368.

OZKAN, SA, KAUFFMANN, J-M, ZUMAN, P (2015) Electroanalysis in Biomedical and Pharmaceutical Sciences. Springer. doi:10.1007/978-3-662-47138-8.

OZKAN, SA, USLU, B, ABOUL-ENEIN, HY (2003) Analysis of pharmaceuticals and biological fluids using modern electroanalytical techniques. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **33**: 155–181.

PANG, YH, HUANG, YY, WANG, L, SHEN, XF, WANG, YY (2020) Determination of bisphenol A and bisphenol S by a covalent organic framework electrochemical sensor. *Environ. Pollut.*, **263**: 114616.

PARK, JC, LEE, MC, YOON, DS, HAN, J, KIM, M, HWANG, UK, JUNG, JH, LEE, JS (2018) Effects of bisphenol A and its analogs bisphenol F and S on life parameters, antioxidant system, and response of defensome in the marine rotifer Brachionus koreanus. *Aquat. Toxicol.*, **199**: 21–29.

PAZ, JC, VIZMEG, J (2014) Endocrine System. In Acute Care Handbook for Physical Therapists: Fourth Edition. Fourth Edi. Elsevier Inc. pp 243–263.

PLETCHER, D, GREFF, R, PEAT, R, ROBINSON, J (2001) Instrumental Methods in Electrochemistry. Woodhead Publishing Limited. doi:10.1016/s0003-2670(00)87868-x.

RAMADAN, M, COOPER, B, POSNACK, NG (2020) Bisphenols and phthalates: Plastic chemical exposures can contribute to adverse cardiovascular health outcomes. *Birth Defects Res.*,: 1–24.

RAO, H, ZHAO, X, LIU, X, ZHONG, J, ZHANG, Z, ZOU, P, JIANG, Y, WANG, X, WANG, Y (2018) A novel molecularly imprinted electrochemical sensor based on graphene quantum dots coated on hollow nickel nanospheres with high sensitivity and selectivity for the rapid determination of bisphenol S. *Biosens. Bioelectron.*, **100**: 341–347.

REBELO, P, COSTA-RAMA, E, SEGURO, I, PACHECO, JG, NOUWS, HPA, CORDEIRO, MNDS, DELERUE-MATOS, C (2021) Molecularly imprinted polymer-based electrochemical sensors for environmental analysis. *Biosens. Bioelectron.*, **172**.. doi:10.1016/j.bios.2020.112719.

ROCHA, BA, DA COSTA, BRB, DE ALBUQUERQUE, NCP, DE OLIVEIRA, ARM, SOUZA, JMO, AL-TAMEEMI, M, CAMPIGLIA, AD, BARBOSA, F (2016) A fast method for bisphenol A and six analogues (S, F, Z, P, AF, AP) determination in urine samples based on dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*, **154**: 511–519.

ROCHA, BA, DE OLIVEIRA, ARM, BARBOSA, F (2018) A fast and simple air-assisted liquid-liquid microextraction procedure for the simultaneous determination of bisphenols, parabens, benzophenones, triclosan, and triclocarban in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*, **183**: 94–101.

SAFE, S, JUTOORU, I, CHADALAPAKA, G (2010) Estrogenic Endocrine Disruptors: Molecular Characteristics and Human Impacts. In Comprehensive Toxicology, Second Edition. pp 609–621.

SANCHIS, Y, COSCOLLÀ, C, YUSÀ, V (2019) Analysis of four parabens and

bisphenols A, F, S in urine, using dilute and shoot and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Talanta*, **202**: 42–50.

SCHOLZ, F, ed (2010) Electroanalytical Methods. 2nd Ed., Springer-Verlag. doi:10.1007/978-3-642-02915-8.

SILVEIRA, RS, ROCHA, BA, RODRIGUES, JL, BARBOSA, F (2020) Rapid, sensitive and simultaneous determination of 16 endocrine-disrupting chemicals (parabens, benzophenones, bisphenols, and triclocarban) in human urine based on microextraction by packed sorbent combined with liquid chromatography tandem mass spectrom. *Chemosphere*, **240**: 124951.

SKOOG, DA, HOLLER, JF, CROUCH, SR (2018) Principles of Instrumental Analysis. Seventh Ed.

SKOOG, DA, WEST, DM, HOLLER, FJ, CROUCH, SR (2014) Fundamentals of Analytical Chemistry. Ninth Edit. Brooks/Cole, Cengage Learning.

SONG, Z, LI, J, LU, W, LI, B, YANG, G, BI, Y, ARABI, M, WANG, X, MA, J, CHEN, L (2022) Molecularly imprinted polymers based materials and their applications in chromatographic and electrophoretic separations. *TrAC Trends Anal. Chem.*, **146**: 116504.

STOKER, TE, KAVLOCK, RJ (2010) Pesticides as Endocrine-Disrupting Chemicals. Third Edit. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-374367-1.00018-5.

SWARTZ, ME, KRULL, IS (2012) Handbook of Analytical Validation. Taylor & Francis Group, LLC. doi:10.1201/b12039.

TURIEL, E, ESTEBAN, AM (2019) Molecularly imprinted polymers. In Solid-Phase Extraction. Elsevier Inc. pp 215–233.

USMAN, A, IKHLAS, S, AHMAD, M (2019) Occurrence, toxicity and endocrine disrupting potential of Bisphenol-B and Bisphenol-F: A mini-review. *Toxicol. Lett.*, **312**: 222–227.

Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (1995) *Int. Conf. Harmon. Guidel.*,.. doi:10.1016/B978-0-12-386454-3.00861-7.

WANG, J (2006) Analytical Electrochemistry. Third Edit. John Wiley & Sons, Inc. doi:10.1002/0471790303.

WANG, R, DONG, S, WANG, P, LI, T, HUANG, Y, ZHAO, L, SU, X (2021) Development and validation of an ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for twelve bisphenol compounds in animal feed. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **1178**: 122613.

WANG, X, YANG, L, JIN, X, ZHANG, L (2014) Electrochemical determination of estrogenic compound bisphenol F in food packaging using carboxyl functionalized multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. *Food Chem.*, **157**: 464–469.

WANG, Y, LIANG, Y, ZHANG, S, WANG, T, ZHUANG, X, TIAN, C, LUAN, F, NI, SQ, FU, X (2021) Enhanced electrochemical sensor based on gold

nanoparticles and MoS2 nanoflowers decorated ionic liquid-functionalized graphene for sensitive detection of bisphenol A in environmental water. *Microchem. J.*, **161**: 105769.

WEI, Y, AN, H, YANG, W, GUO, H (2017) Preparation of 3D Au NPs-poly-L-glutamate/graphene nanocomposite modified electrode for sensing of bisphenol A. *Int. J. Electrochem. Sci.*, **12**: 11818–11832.

WILLHITE, CC, DASTON, GP (2019) Bisphenol exposure, hazard and regulation. *Toxicology*, **425**: 10–12.

WITORSCH, RJ, THOMAS, JA (2010) Personal care products and endocrine disruption: A critical review of the literature. *Crit. Rev. Toxicol.*, **40**: 1–30.

WŁOCH, M, DATTA, J (2019) Synthesis and polymerisation techniques of molecularly imprinted polymers. In Comprehensive Analytical Chemistry. Elsevier B.V. pp 17–40.

XIAO, Z, WANG, R, SUO, D, LI, T, SU, X (2020) Trace analysis of bisphenol A and its analogues in eggs by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chem.*, **327**: 126882.

XING, Y, ZHOU, S, WU, G, WANG, C, YUAN, X, FENG, Q, ZHU, X, QU, J (2021) A sensitive electrochemical sensor for bisphenol F detection and its application in evaluating cytotoxicity. *Microchem. J.*, **168**: 106414.

YAO, J, CHEN, M, LI, N, LIU, C, YANG, M (2019) Experimental and theoretical studies of a novel electrochemical sensor based on molecularly imprinted polymer and B, N, F-CQDs/AgNPs for enhanced specific identification and dual signal amplification in highly selective and ultra-trace bisphenol S determi. *Anal. Chim. Acta*, **1066**: 36–48.

YAO, J, LIU, C, YANG, M (2019) An Ultrasensitive and Highly Selective Electrochemical Aptasensor for Environmental Endocrine Disrupter Bisphenol A Determination Using Gold Nanoparticles/Nitrogen, Sulfur, and Phosphorus Co-Doped Carbon Dots as Signal Enhancer and Its Electrochemical Kin. *J. Electrochem. Soc.*, **166**: B1161–B1170.

YILDIRIM, E, GÜRKAN, R, ALTUNAY, N (2017) A New Ultrasonic Thermostatic-Assisted Cloud Point Extraction/Spectrophotometric Method for the Preconcentration and Determination of Bisphenol A in Food, Milk, and Water Samples in Contact with Plastic Products. *Food Anal. Methods*, **10**: 1765–1776.

ZHANG, H, ZHANG, Y, LI, J, YANG, M (2019) Occurrence and exposure assessment of bisphenol analogues in source water and drinking water in China. *Sci. Total Environ.*, **655**: 607–613.

ZHANG, P, GAO, C, ZHAO, B, SUN, G (2014) Using data mining and UV-VIS spectrophotometric to determine the content of bisphenol A in plastics. *J. Chem. Pharm. Res.*, **6**: 2553–2557.

ZHANG, Y, LEI, Y, LU, H, SHI, L, WANG, P, ALI, Z, LI, J (2021) Electrochemical

detection of bisphenols in food: A review. *Food Chem.*, **346**: 128895.

ZHAO, Y, BAI, XL, SONG, T, ZHANG, GL, YUAN, YC, LIU, YM, LIAO, X (2019) Determination of environmental estrogens and bisphenol A in water samples by ultra-high performance liquid chromatography coupled to Q-Exactive high resolution mass spectrometry after magnetic solid-phase extraction. *Microchem. J.*, **151**: 104212.

ZHU, Z, MIAO, X, YAN, D (2021) An Electrochemical Sensor Based on Bimetallic PtPd Nanoparticles for the Determination of Bisphenol A. *Int. J. Electrochem. Sci.*, **16**: 1–9.

ZHUANG, Y, ZHOU, M, GU, J, LI, X (2014) Spectrophotometric and high performance liquid chromatographic methods for sensitive determination of bisphenol A. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, **122**: 153–157.