



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



OPIOİD ANALJEZİKLER İÇİN OPTİK VE ELEKTROKİMYASAL SENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

Merve YENCE

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. Mehmet Gökhan ÇAĞLAYAN

ANKARA

2024

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OPIOİD ANALJEZİKLER İÇİN OPTİK VE
ELEKTROKİMYASAL SENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

Merve YENCE

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Mehmet Gökhan ÇAĞLAYAN

ANKARA
2024

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Opiooid Analjezikler İçin Optik ve Elektrokimyasal Sensör Geliştirilmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan hazırlanmıştır. Tezimin fikri tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı : Merve YENCE

Tarih :

İmza :

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Analitik Kimya Anabilim Dalında

MERVE YENCE tarafından hazırlanan

“Opioid Analjezikler İçin Optik ve Elektrokimyasal Sensör Geliştirilmesi” adlı tez çalışması
aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 28.05.2024

Prof. Dr. Feyyaz ONUR
Lokman Hekim Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN
Ankara Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Uğur TAMER
Gazi Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Burcu DOĞAN TOPAL
Ankara Üniversitesi
Üye

Doç. Dr. Mehmet Gökhan ÇAĞLAYAN
Ankara Üniversitesi
Raportör

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

İmza

Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Opioid Analjezikler İçin Optik ve Elektrokimyasal Sensör Geliştirilmesi

Doktora tez çalışmasında opioid analjezik sınıfından kodein (KOD), dekstrometorfan (DM), metadon (MET) ve oksikodon (OKS) için optik sensör ve kodein için elektrokimyasal sensör geliştirilmesi amaçlanmıştır. Optik sensör sisteminde indikatör yer değiştirme mekanizması kullanılarak öncelikle reseptör ile boyanın bağlanması sonucu floresans sinyalinde kapanma sonrasında reseptör ile daha güçlü bağlanan analit varlığında boyanın açığa çıkmasıyla sinyalde açılma hedeflenmiştir. Elektrokimyasal sensör sisteminde moleküler baskılı polimer (MIP) kullanılarak, kodein analitinin düşük konantrasyon değerinde tespit edilmesi, gerçek numune örneklerine uygulanması ve analitik validasyon parametrelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Geliştirilen optik sensör sisteminde konakçı-konuk ilişkisi kovalent olmayan bağlar ile kurulmuştur. Konakçı yapı olarak supramoleküler sınıftan kükübitüriller CB[7] ve CB[8] kullanılmıştır. Konuk yapı olarak ise özel olarak dizayn edilmiş ilk defa sentezlenen piridin kumarin boyası (PK), akrinin sarısı (AS) ve turuncusu (AT) boyları kullanılmıştır. İndikatör yer değiştirme mekanizması başarılı bir şekilde uygulanarak dört analit için çapraz reaktif sensör dizisi geliştirilmiştir.

Proton ve karbon NMR ile karakterize edilen PK boyasının UV-VIS ve floresans spektroskopisiyle optik özellikleri belirlenmiştir. PK boyası, CB[7] ve CB[8] titrasyon sonucunda CB'lerin içerisine girerek boya sönümlenmesi elde edilerek floresans sinyal kapanmıştır. 1:1 oranında etkileşen PK-CB[8] sensörü çapraz reaktifitenin amacına uygun olarak dört farklı analite farklı cevaplar vermiştir. DM %33, KOD %40, OKS %33 boya amplifikasyon değerleri verirken iki adet fenil grubuna sahip ve boyutsal olarak büyük olan MET %5 değeri vermiştir. AT ve AS boylarının agregatı olmadığı konsantrasyon değeri Lambert Beer kanunu uygulanarak absorbans ve floresans grafik eğrileri sonucu 0.5 μ M olarak bulunmuştur. AS boyası ve CB[8] arasında iyonik ve hidrofobik etkileşimleriyle boya sönümlenmesi absorbans ve floresans titrasyon sonucunda elde edilmiştir. 1:1 oranında oluşturulan AS-CB[8] sensöründe dört farklı analit tayini yapılmıştır. Daha fazla elektronegatif OKS %46, boyutsal olarak büyük MET %21, DM %92 ve KOD %87 amplifikasyon sonucu vermiştir. AT boyası da istenilen şekilde CB[8] ile absorbans ve floresans titrasyonu sonucunda boya sönümlenmesi elde edilmiştir. Geliştirilen AT-CB[8] sensörü DM için %84, KOD %68, OKS %28 ve MET için %0 boya amplifikasyon sonuçları vermiştir. Sensör elementleri kullanılarak gerçekleştirilen dizi sensör çalışmasında analitler LDA ile başarılı bir şekilde sınıflandırılmıştır.

Geliştirilen elektrokimyasal sensör sisteminde kullanılan polimerik yapı sentez monomeri, temel monomer, çapraz bağlayıcı, foto başlatıcı, gözenek yapıcı malzeme ve şablon molekül kodein kullanılarak foto polimerizasyon yöntemiyle oluşturulmuştur. MIP tabanlı elektrokimyasal sensörün yüzey karakterizasyonu ve morfolojik incelenmesi dönüşümlü voltametri (DV), elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS), taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ve Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ile değerlendirilmiştir. Sensör performansını arttırabilmek için beş farklı parametre optimize edilmiştir. Geliştirilen elektrokimyasal sensörün dinamik doğrusal aralığı 0.1-1.0 pM ve tespit sınırı 0.0150 pM olarak hesaplanmıştır. Sensörün gerçek numunelere uygulanabilirliğini göstermek amacıyla idrar, ticari serum ve tablet formunda geri kazanım çalışmaları yapılmış ve sırasıyla %98.54, %101.42 ve %101.51 sonuçları elde edilmiştir. Kodeine benzer dört farklı molekülün seçicilik katsayısı hesaplanarak, oluşturulan polimerik yapının sadece kodein için seçici olduğu gösterilmiştir. Elektrokimyasal sensörün performansı bazı iyonik maddelerin varlığında test edilmiş ve %99.91-102.99 geri kazanım sonuçları elde edilmiştir. Sonuç olarak, seçici, doğru, girişim direnci gösteren, gerçek numunelere uygulanabilen yüksek analitik performansta elektrokimyasal sensör geliştirilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Dekstrometorfan, Elektrokimyasal Sensör, Kodein, Metadon, Oksikodon, Optik Sensör

SUMMARY

Optic and Electrochemical Sensor Development for Opioid Analgesics

In the doctoral thesis study, it was aimed to develop an optical sensor for codeine (COD), dextromethorphan (DM), methadone (MET), and oxycodone (OXY) from the opioid analgesic class and an electrochemical sensor for codeine. By using the indicator displacement mechanism in the optical sensor system, it is aimed to first turn off the fluorescence signal as a result of the binding of the dye with the receptor and then turn on the signal by releasing the dye in the presence of the analyte that binds more strongly with the receptor. By using molecular imprinted polymer (MIP) in the electrochemical sensor system, it aims to detect codeine analyte at low concentration values, apply it to real samples, and determine analytical validation parameters.

The developed optical sensor system establishes the host-guest relationship through non-covalent interactions. From the supramolecular class cucurbiturils (CB[n]), CB[7] and CB[8] were used as the host structure. As the guest structure, a specially designed pyridine coumarin dye (PC), acridine yellow (AY), and acridine orange (AO) were used. A cross-reactive sensor array for four analytes was developed by successfully applying the indicator displacement mechanism.

After the synthesis of PC dye, it was characterized by proton and carbon NMR, and UV-VIS and fluorescence spectroscopy were used to determine the optical properties of the PC dye. As a result of titration of PC dye with CB[7] and CB[8], dye entered the CBs, resulting in dye quenching and turning off the fluorescence signal. The PC-CB[8] sensor interacting at a 1:1 ratio gave different responses to four different analytes by the purpose of the cross-reactive agent. While DM gave dye amplification values of 33%, KOD 40%, OKS 33%, MET, which has two phenyl groups and is dimensionally larger, gave a value of 5%. The concentration value at which AT and AS dyes did not aggregate was found to be 0.5 μM with the absorbance and fluorescence graphic curves by applying Lambert Beer's law. Dye quenching through ionic and hydrophobic interactions between AS dye and CB[8] was obtained as a result of absorbance and fluorescence titrations. Four analytes were determined on the AS-CB[8] sensor created in a 1:1 ratio. More electronegative OKS gave a 46% amplification result, dimensionally larger MET at 21%, DM at 92%, and KOD at 87%. As desired, dye quenching of AT dye was achieved with absorbance and fluorescence titration with CB[8]. The developed AT-CB[8] sensor gave dye amplification results of 84% for DM, 68% for KOD, 28% for OKS, and 0% for MET. Using sensor elements, analytes were successfully classified with LDA in an array sensor study.

The polymeric structure used in the developed electrochemical sensor system was created by the photopolymerization method using synthesis monomer, basic monomer, cross-linker, photoinitiator, pore-forming material, and template molecule codeine. The MIP-based electrochemical sensor's surface characterization and morphological examination were evaluated by cyclic voltammetry, electrochemical impedance spectroscopy, scanning electron microscopy, and Fourier transform infrared spectroscopy. Five different parameters were optimized to improve sensor performance. The dynamic linear range of the developed electrochemical sensor was calculated as 0.1-1.0 pM, and the detection limit was 0.0150 pM. To demonstrate the applicability of the sensor to real samples, recovery studies were carried out in urine, commercial serum, and tablet form, and results of 98.54%, 101.42%, and 101.51% were obtained, respectively. By calculating the selectivity coefficients of four different molecules, it has been shown that the polymeric structure created is selective only for codeine. The performance of the electrochemical sensor was tested in the presence of some ionic substances, and recovery results of 99.91-102.99% were obtained. As a result, a selective, accurate, interference-resistant electrochemical sensor with high analytical performance that can be applied to real samples has been developed.

Keywords: Codeine, Dextromethorphan, Electrochemical sensor, Methadone, Optic sensor, Oxycodone,

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Özet	iv
Summary	v
İçindekiler	vi
Önsöz	x
Simgeler ve kısaltmalar	xiv
Şekiller	xvi
Çizelgeler	xix
1. GİRİŞ	1
1.1. Giriş ve Amaç	1
1.2. Opioidlerin Tespitine Yönelik Geliştirilen Güncel Analitik Yöntemler	2
1.3. Opioid Analjeziklerin Etkisi ve Önemi	5
1.4. Tez Kapsamında Kullanılan Opioidler ve Tespitine Yönelik Çalışmalar	8
1.4.1. Kodein	8
1.4.2. Metadon	10
1.4.3. Oksikodon	11
1.4.4. Dekstrometorfan	13
1.5. Analitik Kimyada Sensörler	14
1.5.1. Optik Sensörler	17
1.5.1.1. Doğrudan Algılama	18
1.5.1.2. İndikatör Yer Değiştirme Analizi	19
1.5.1.3. Sentetik Reseptör	20
1.5.1.4. Kükürbitüriller ve Optik Sensörlerde Kullanımı	21
1.5.1.5. Tez Kapsamında Kullanılan Floresan Boyalar	24
1.5.1.5.1. Akridin Turuncusu	25
1.5.1.5.2. Akridin Sarısı	26
1.5.1.5.3. Piridin Kumarin	26
1.5.2. Elektrokimyasal Sensörler	27
1.5.2.1. Moleküler Baskılı Polimerler ve Opioid Tayininde Kullanımı	27
1.5.2.2. Moleküler Baskılama Prosesi ve Bileşenleri	29

1.5.2.2.1.	Hedef Molekül ve Monomer	30
1.5.2.2.2.	Çapraz Bağlayıcılar	31
1.5.2.2.3.	Porojenik Çözücü	32
1.5.2.2.4.	Başlatıcı	33
1.5.2.3.	Tez Kapsamında Kullanılan MIP Yöntemi ve Bileşenleri	33
2.	GEREÇ VE YÖNTEM	35
2.1.	Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler	35
2.2.	Deneylerde Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar	36
2.3.	Malzeme Sentezi	36
2.3.1.	Fonksiyonel Monomer (MA-Trp) Sentezi	36
2.3.2.	Floresan Boya PK Sentezi	37
2.4.	Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	38
2.4.1.	Opioid Çözeltilerinin Hazırlanması	38
2.4.2.	Boyaların ve CB Çözeltilerinin Hazırlanması	38
2.4.3.	Optik Ölçüm Çözeltilerinin Hazırlanması	38
2.4.4.	Elektrokimyasal Ölçüm Çözeltilerinin Hazırlanması	39
2.4.5.	Tablet, Serum, İdrar ve Girişim Çözeltilerinin Hazırlanması	39
2.5.	Boyalar ve CB'ler ile Optik Sensörlerinin Hazırlanması	39
2.6.	Elektrokimyasal MIP ve NIP Temelli Sensör Hazırlanması	40
2.7.	Optik Yöntemler	40
2.8.	Elektrokimyasal Yöntemler	41
2.9.	Karakterizasyon Yöntemleri	41
3.	BULGULAR	42
3.1.	Optik Sensör Bulguları	42
3.1.1.	PK Boyasının NMR Bulguları	42
3.1.2.	PK Boyasının Optik Sensörlerde Kullanımı	45
3.1.2.1.	PK Boyasının Farklı Çözücüler İçerisinde Absorbans Ölçümü	46
3.1.2.2.	PK Boyasının 3 Farklı pH Ortamında CB[7] ile Titrasyonu	46
3.1.2.3.	PK Boyasının CB[8] ile Titrasyonu	52
3.1.2.4.	PK-CB[8] sensörünün 4 farklı Opioid Analizi için Kullanılması	53
3.1.3.	AS Boyasının Optik Sensörlerde Kullanımı	56
3.1.3.1.	AS Boyası Absorbans Ölçümü	56

3.1.3.1.	AS Boyası Floresans Ölçümü	57
3.1.3.3.	AS Boyasının CB[8] ile Absorbans Titrasyonu	58
3.1.3.4.	AS Boyasının CB[8] ile Floresans Titrasyonu	59
3.1.3.5.	AS-CB[8] sensörünün 4 farklı Opioid Analizi için Kullanılması	60
3.1.3.6.	AS-CB[8] sensörünün DM ile titrasyon bulguları	62
3.1.4.	AT Boyasının Optik Sensörlerde Kullanımı	65
3.1.4.1.	AT Boyası Absorbans Ölçümü	65
3.1.4.1.	AT Boyası Floresans Ölçümü	66
3.1.4.3.	AT Boyasının CB[8] ile Absorbans Titrasyonu	68
3.1.4.4.	AT Boyasının CB[8] ile Floresans Titrasyonu	68
3.1.4.5.	AT-CB[8] sensörünün 4 farklı Opioid Analizi için Kullanılması	69
3.1.5.	AT ve AS Boyalarının Karşılaştırılması	72
3.1.5.1.	AT ve AS'nin CB[8] ve Analitlerle Titrasyon Karşılaştırılması	72
3.1.6.	AK Boyasının Optik Sensörlerde Kullanımı	74
3.1.6.1.	AK Boyası Absorbans Ölçümü	74
3.1.6.2.	AK Boyası Floresans Ölçümü	76
3.1.6.3.	AK Boyasının CB[8] ile Absorbans Titrasyonu	77
3.1.6.4.	AK Boyasının CB[8] ile Floresans Titrasyonu	78
3.1.7.	Geliştirilen Optik Sensörlerin Amplifikasyon Sonuçları	80
3.1.8.	Çapraz Reaktif Dizi Sensör Sonuçları	80
3.2.	Elektrokimyasal Sensör Bulguları	82
3.2.1.	Kodein için Geliştirilen Elektrokimyasal Sensörün Şematik Gösterimi	82
3.2.2.	Kodein ve Monomer Arasındaki Olası Etkileşimler	83
3.2.3.	Geliştirilen Sensörün ve Polimerik Filmin Karakterizasyonu	84
3.2.3.1.	Polimerik Filmin FTIR ve Yüzey Karakterizasyonu	84
3.2.3.2.	Sensörün Elektrokimyasal Karakterizasyonu	85
3.2.4.	MIP Sensörün Optimizasyon Parametreleri	87
3.2.4.1.	Monomer-Hedef Molekül Oranı	87
3.2.4.2.	Polimerizasyon Çözeltisinin Damlatma Hacmi	88
3.2.4.3.	Foto polimerizasyon Süresi	88
3.2.4.4.	Uzaklaştırma Çözeltisi ve Süresi	89
3.2.4.5.	Yeniden Bağlanma Süresi	90
3.2.5.	Geliştirilen Sensörün Analitik Uygulaması	91
3.2.6.	Geliştirilen Sensörün Gerçek Örneklerle Uygulanması	95

3.2.7.	Seçicilik alışması	95
3.2.8.	İnterferans alışması	96
4.	TARTIşMA	97
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	106
	KAYNAKLAR	110



ÖNSÖZ

Opioid ağrı kesicilerin bağımlılık yapıcı etkileri sebebiyle, tedaviye başladıktan sonra veya tedavi süresince yanlış kullanımı ve suistimali sonucunda istenmeyen durumlarla karşılaşmak olasıdır. Bu gibi durumları önlemek için opioid analjeziklerin kalitatif ve kantitatif tayini oldukça önemlidir. Bu tez kapsamında, kodein, dekstrometorfan, metadon ve oksikodon için optik sensör ve kodein için elektrokimyasal sensör geliştirilmiştir. Optik sensör kısmında çapraz reaktif sensör sistemi supramolekül sınıfından reseptör kükürbütiril CB[8] ve ilk defa özel dizayn edilerek sentezlenen piridin kumarin, akridin sarısı ve akridin turuncusu boya olarak oluşturulmuştur. İndikatör yer değiştirme mekanizması kullanılarak boya amplifikasyon değerleri üzerinden dört farklı analit için analiz yapılmıştır. Moleküler baskılı polimer temelli elektrokimyasal sensör sisteminde özel amino asit temelli MA-Trp monomeri, çapraz bağlayıcı ve gözenek yapıcı malzeme kullanılarak polimerik yapı oluşturulmuştur. Geliştirilen bu elektrokimyasal sensör kodein analiti için seçici, gerçek numunelerde uygulanabilir ve güçlü analitik performans göstererek düşük konantrasyon değerlerinde analiz yapılmıştır.

Doktora sürecimi birlikte keyifle tamamladığım, akademik ve sosyal becerilerimi geliştirdiğim, hayatıma yön veren, aile yakınlığında, çok başarılı olan danışman hocalarıma ne kadar teşekkür etsem az kalır, emeklerinize ve ilginize minnettarım. Öncelikle, doktora ders sürecinde dersine katılmaktan heyecan duyduğum, bilgi birikimini sakın ve anlaşılır ses tonuyla öğrencilerine aktaran, her zaman beyefendiliği ve nazik duruşuyla örnek olan, Tübitak bursuyla 1 yıllığına Amerika'ya gitmemde en büyük destekçim, sabırlı, yardımsever, işini severek yapan danışman hocam Doç. Dr. Mehmet Gökhan Çağlayan'a sonsuz teşekkür ederim. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde doktora başlama vesile olan, her zaman manevi desteğiyle anne sıcaklığını hissettiren, akademik ve idari tecrübelerini en açıklayıcı ve yardımcı olacak şekilde aktaran, çalışkanlığıyla ve kibar davranışlarıyla her daim örnek olan, her zaman bir telefon uzağında hissettiğim çok sevgili hocam Prof. Dr. Sibel A. Özkan'a çok teşekkür ederim. My heartfelt thanks go out to my advisor in the US, Prof. Dr. Pavel Anzenbacher, who has explained everything in detail by drawing structures, figures, and schematic diagrams. During my one year in the USA, I have always worked enthusiastically and determinedly, per his suggestions. I am forever grateful for his patience, unwavering support, and guidance.

Tez çalışmamda ve makale yazımında yardımcı olan hocalarım Prof. Dr. Lokman Uzun, Prof. Dr. Mehmet Emin Çorman, tez izleme komitesinde ve jürisinde bulunan hocalarım Prof. Dr. Feyyaz Uğur, Prof. Dr. Sibel A. Özkan, Prof. Dr. Uğur Tamer ve Prof. Dr. Burcu Doğan Topal hocalarıma teşekkürlerimi borç bilirim.

Doktora süresince birlikte çalıştığım sevgili ekip arkadaşlarım Dr. Ahmet Çetinkaya, Dr. Göksu Özçelikay Akyıldız, Dr. S. İrem Kaya, Dr. Leyla Karadurmuş, Fatma Budak ve bölümümüzdeki bütün arkadaşlarıma birlikte yazmış olduğumuz makalelerimiz, yardımlarınız, anlayışlarınız, destekleriniz ve güzel anılarımız için çok teşekkür ederim.

I sincerely thank Anzenbacher group members Austin Sartori, Rashmita Dulal, Sandra George, Elnaz Safari, and Aco Radujevic for their unconditional help, assistance, funny traditional activities, and many lovely memories. I am glad to have met all of you and to have worked at Bowling Green State University. Love you all!

Analitik Kimya Bölümü öğretim üyeleri, idari personeli ve laboratuvar çalışma arkadaşlarıma yardımları için teşekkür ederim.

Amerika'daki ikinci ailem Sultan Ablam ve Adil Abim sizin sayenizde kendimi evimde gibi hissettim. Her zaman yanımda olduğunuz, sevginizi her daim hissettirdiğiniz ve kendi kızınız gibi gördüğünüz için sonsuz teşekkür ederim. Bir diğer teşekkürüm ise her birinin yeri bende çok ayrı olan Amerika'daki Türk grubumuzdaki teyzelerim, ablalarım ve arkadaşlarıma, Türkiye'de katılamayacağım kadar güzel bayramlar, kına geceleri, mezuniyetler ve doğum günleri kutladık. Sizlerin sayesinde Amerika doktora tez sürecim kolaylıkla ilerledi ve başarılı, mutlu oldum. İyi ki tanıştık ve iyi ki varsınız.

En büyük teşekkürüm ise tabi ki canım aileme... Her zaman arkamda olan sevgisini, desteğini, bana olan inancını ve güvenini gösteren benimle dünyanın diğer ucuna gelen ve her zaman gelmeye hazır fedakar, güzel annem Hatice Yence, babam Zekeriya Yence ve en büyük sırdaşım, kardeşim Sude Yence'ye maddi ve manevi destekleri için ne kadar teşekkür etsem az. Yüksek lisans tezimde olduğu gibi doktora tezimi de size ithaf ediyorum. Her başarımın arkasında her zaman sizler oldunuz, hep birlikte nice güzel, başarılı günlere...

Doktora tez süresince manevi destekleri için Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) programlarına; 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı, 2214-A Yurt Dışı Araştırma Burs Programı, 2250-Lisansüstü Bursları Performans Programı, 1001 Araştırma Programı (Proje No: 123Z557) ve 1004-Mükemmeliyet Merkezi Destek Programına (Proje No: 20AG003) çok teşekkür ederim.





YENCE A\LES\NE ...

SİMGELER VE KISALTMALAR

AA	Askorbik asit
AK	Akridin kırmızısı
AS	Akridin sarısı
AT	Akridin turuncusu
ACN	Asetonitril
AFM	Atomik kuvvet mikroskobu
BH	Bağıl hata
BSS	Bağıl standart sapma
CB	Kükübitüril
CKE	Camsı karbon elektrot
DM	Dekstrometorfan
DMSO	Dimetil sülfoksit
DPV	Diferansiyel puls voltametri
DOP	Dopamin
EIS	Elektrokimyasal impedans spektroskopisi
ETOH	Etanol
FP	Fotopolimerizasyon
FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
HAc	Asetik asit
KOD	Kodein
KS	Kütle spektrometri
<i>m</i>	Eğim
MeOH	Metanol
MET	Metadon
MIP	Moleküler baskılanmış polimer

NaOH	Sodyum hidroksit
NIP	Baskılanmamış polimer
NMR	Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi
OKS	Oksikodon
PAR	Parasetamol
PK	Piridin kumarin
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SS	Standart sapma
TAS	Tayin alt sınırı
TS	Teşhis sınırı
UA	Ürik asit
UPSK	Ultra performans sıvı kromatografisi
UV	Ultraviyole
YPSK	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Yaygın kullanılan opioidler	7
Şekil 1.2. Kimyasal sensörün çalışma prensibi	15
Şekil 1.3. Seçiciliklerine göre kimyasal sensörler	15
Şekil 1.4. Doğrudan algılama şematik gösterim	18
Şekil 1.5. İndikatör yer değiştirme algılaması	19
Şekil 1.6. Tek veya çoklu reseptör analizi	20
Şekil 1.7. Kükürbitürl sentezi	21
Şekil 1.8. CB[n]'lerin X-Ray kristal şekilleri (Lagona vd., 2005)	22
Şekil 1.9. Akridin Turuncusu	25
Şekil 1.10. Akridin Sarısı	26
Şekil 1.11. Piridin Kumarin	27
Şekil 1.12. MIP oluşturma prosesi	30
Şekil 2.1. MA-Trp sentezi	37
Şekil 2.2. 7-(2-bromoetiloksi) kumarin sentezi	37
Şekil 2.3. PK sentezi	38
Şekil 3.1. 7-(2-bromoetiloksi) kumarin bileşiği ¹ H NMR	42
Şekil 3.2. 7-(2-bromoetiloksi) kumarin bileşiği ¹³ C NMR	43
Şekil 3.3. PK bileşiği ¹ H NMR	44
Şekil 3.4. PK bileşiği ¹³ C NMR	45
Şekil 3.5. Geliştirilen optik sensörlerin şematik gösterimi	45
Şekil 3.6. PK bileşiğinin farklı çözücü ortamlarında UV-VIS grafiği	46
Şekil 3.7. 10 µM PK- CB[7] pH 2.5 ortamında floresans titrasyon grafiği	47
Şekil 3.8. 10 µM PK- CB[7] pH 2.5 ortamında floresans titrasyon izotermi	47
Şekil 3.9. 10 µM PK- CB[7] pH 2.5 ortamında izoterm karşılaştırması	48
Şekil 3.10. 10 µM PK- CB[7] pH 4.5 ortamında floresans titrasyon grafiği	49
Şekil 3.11. 10 µM PK- CB[7] pH 4.5 ortamında floresans titrasyon izotermi	49
Şekil 3.12. 10 µM PK- CB[7] pH 4.5 ortamında izoterm karşılaştırması	50
Şekil 3.13. 10 µM PK- CB[7] pH 7.0 ortamında floresans titrasyon grafiği	51
Şekil 3.14. 10 µM PK- CB[7] pH 7.0 ortamında floresans titrasyon izotermi	51
Şekil 3.15. Farklı pH ortamlarında PK- CB[7] titrasyonu bağlanma sabiti karşılaştırılması	52
Şekil 3.16. CB'lerin olası etkileşimleri	52
Şekil 3.17. 0.5 µM PK- CB[8] floresans titrasyon grafiği	53
Şekil 3.18. 10 µM PK- CB[8] floresans titrasyon izotermi	53
Şekil 3.19. 0.5 µM, 1:1 oranında PK-CB8'in DM ile titrasyon grafiği	54
Şekil 3.20. 0.5 µM, 1:1 oranında PK-CB8'in kodein ile titrasyon grafiği	54

Şekil 3.21. 0.5 µM, 1:1 oranında PK-CB8'in metadon ile titrasyon grafiği	55
Şekil 3.22. 0.5 µM, 1:1 oranında PK-CB8'in oksikodon ile titrasyon grafiği	55
Şekil 3.23. AS boyasının absorbans kalibrasyon grafiği	56
Şekil 3.24. AS boyasının konsantrasyona karşı absorbans kalibrasyon eğrisi	57
Şekil 3.25. AS boyasının floresans kalibrasyon grafiği	57
Şekil 3.26. AS boyasının konsantrasyona karşı floresans kalibrasyon eğrisi	58
Şekil 3.27. 0.5 µM AS- CB[8] absorbans titrasyon grafiği	58
Şekil 3.28. 0.5 µM AS- CB[8] floresans titrasyon grafiği	59
Şekil 3.29. 0.5 µM AS- CB[8] floresans titrasyon izotermi	60
Şekil 3.30. 0.5 µM, 1:1 oranında AS-CB8'in DM ile titrasyon grafiği	61
Şekil 3.31. 0.5 µM, 1:1 oranında AS-CB8'in kodein ile titrasyon grafiği	61
Şekil 3.32. 0.5 µM, 1:1 oranında AS-CB8'in metadone ile titrasyon grafiği	62
Şekil 3.33. 0.5 µM, 1:1 oranında AS-CB8'in oksikodon ile titrasyon grafiği	62
Şekil 3.34. 0.5 µM AS- CB[8] floresans titrasyon izotermi	63
Şekil 3.35. 0.5 µM, 1:1 oranında AS-CB8'in DM ile titrasyon izotermi	64
Şekil 3.36. Soldaki kuvvet 0.5 µM AS-0.5 µM CB8 çözeltisi, sağdaki 0.5 µM AS-0.5 µM CB8-1.5 µM DM	65
Şekil 3.37. AT boyasının absorbans kalibrasyon grafiği	66
Şekil 3.38. AT boyasının konsantrasyona karşı absorbans kalibrasyon eğrisi	66
Şekil 3.39. AT boyasının floresans kalibrasyon grafiği	67
Şekil 3.40. AT boyasının konsantrasyona karşı floresans kalibrasyon eğrisi	67
Şekil 3.41. 0.5 µM AT- CB[8] absorbans titrasyon grafiği	68
Şekil 3.42. 0.5 µM AT- CB[8] floresans titrasyon grafiği	69
Şekil 3.43. 0.5 µM AT- CB[8] floresans titrasyon izotermi	69
Şekil 3.44. 0.5 µM, 1:1 oranında AT-CB8'in DM ile titrasyon grafiği	70
Şekil 3.45. 0.5 µM, 1:1 oranında AT-CB8'in kodein ile titrasyon grafiği	71
Şekil 3.46. 0.5 µM, 1:1 oranında AT-CB8'in metadone ile titrasyon grafiği	71
Şekil 3.47. 0.5 µM, 1:1 oranında AT-CB8'in oksikodon ile titrasyon grafiği	72
Şekil 3.48. AT ve AS'nın CB8 ile titrasyon karşılaştırılması	73
Şekil 3.49. AT-CB[8], AS-CB[8] sensörlerinin DM analiti için karşılaştırılması	73
Şekil 3.50. AT-CB[8], AS-CB[8] sensörlerinin kodein analiti için karşılaştırılması	74
Şekil 3.51. AK boyasının absorbans kalibrasyon grafiği	75
Şekil 3.52. AK boyasının konsantrasyona karşı absorbans kalibrasyon eğrisi	75
Şekil 3.53. AK boyasının floresans kalibrasyon grafiği	76
Şekil 3.54. AK boyasının konsantrasyona karşı floresans kalibrasyon eğrisi	77
Şekil 3.55. 0.5 µM AK- CB[8] absorbans titrasyon grafiği	78
Şekil 3.56. 0.5 µM AK- CB[8] floresans titrasyon grafiği	79
Şekil 3.57. 0.5 µM AK- CB[8] floresans titrasyon izotermi	79
Şekil 3.58. Kanonik skor sonuçları	81

Şekil 3.59. LDA sınıflandırma grafiği	82
Şekil 3.60. Geliştirilen elektrokimyasal sensörün şematik gösterimi	83
Şekil 3.61. Hedef molekül ve monomer arasındaki olası etkileşimler	83
Şekil 3.62. A) HEMA B) MIP C) NIP polimerik filmin FTIR spektrumları	84
Şekil 3.63. A) NIP B) MIP polimerik filminin SEM görüntüleri	85
Şekil 3.64. MA-Trp@MIP/GCE sensör basamaklarının CV ile incelenmesi	85
Şekil 3.65. MA-Trp@MIP/GCE sensör basamaklarının EIS ile incelenmesi	86
Şekil 3.66. MA-Trp@NIP/GCE sensör basamaklarının CV ile incelenmesi	86
Şekil 3.67. MA-Trp@NIP/NIP sensör basamaklarının EIS ile incelenmesi	87
Şekil 3.68. Farklı monomer oranlarının akım grafiği	87
Şekil 3.69. Damlatma hacminin akım grafiği	88
Şekil 3.70. Polimerizasyon süresi akım grafiği	89
Şekil 3.71. Uzaklaştırma çözeltileri akım grafiği	89
Şekil 3.72. Uzaklaştırma süresi akım grafiği	90
Şekil 3.73. Yeniden bağlanma süresi akım grafiği	90
Şekil 3.74. Kodein'in standart çözelti içerisinde DPV voltamogramı	91
Şekil 3.75. Kodein'in standart çözelti içerisinde kalibrasyon grafiği	92
Şekil 3.76. Kodein'in ticari serum içerisinde DPV voltamogramı	92
Şekil 3.77. Kodein'in ticari serum içerisinde kalibrasyon grafiği	93
Şekil 3.78. Kodein'in idrar çözeltisi içerisinde DPV voltamogramı	93
Şekil 3.79. Kodein'in idrar çözeltisi içerisinde kalibrasyon grafiği	94
Şekil 3.80. Kodein tayininde farklı maddelerin interferans etkisi	96

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Opioidlerin mekanizması ve terapötik kullanımı	5
Çizelge 1.2. Kodein tespiti için yapılan bazı çalışmalar	9
Çizelge 1.3. Metadon tespiti için yapılan bazı çalışmalar	10
Çizelge 1.4. Oksikodon tespiti için yapılan bazı çalışmalar	12
Çizelge 1.5. Dekstrometorfan tespiti için yapılan bazı çalışmalar	13
Çizelge 1.6. CB[n]'lerin fiziksel özellikleri	22
Çizelge 1.7. MIP'lerin antikör ve sentetik reseptörler ile karşılaştırılması	28
Çizelge 1.8. En sık kullanılan çeşitli fonksiyonel grup içeren monomerler	31
Çizelge 1.9. En sık kullanılan çapraz bağlayıcılar	32
Çizelge 2.1. Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler	35
Çizelge 2.2. Deneysel çalışmalarda kullanılan cihaz ve diğer ekipmanlar	36
Çizelge 3.1. 10 μ M PK- CB[7] floresans titrasyon deneme sonuçları	48
Çizelge 3.2. 10 μ M PK- CB[7] pH 4.5 ortamında floresans titrasyon deneme sonuçları	50
Çizelge 3.3. 10 μ M PK- CB[7] pH 7.0 ortamında floresans titrasyon deneme sonuçları	51
Çizelge 3.4. Geliştirilen optik sensörlerin boya amplifikasyon sonuçları	80
Çizelge 3.5. LDA sonuçları	80
Çizelge 3.6. MA-Trp@MIP/GCE sensörlerinin KOD için kalibrasyon eğrisine ait regresyon verileri ve validasyon parametreleri	94
Çizelge 3.7. Tablet ve biyolojik numunelerde geri kazanım deneylerinin sonuçları	95
Çizelge 3.8. Geliştirilen sensörün seçicilik sonuçları	96

1. GİRİŞ

1.1. Giriş ve Amaç

Genellikle opioidler olarak adlandırılan opioid analjezikler, orta ile şiddetli dereceli ağrı, öksürük ve ishali tedavi etmede uzun yıllardır kullanılan bir ilaç sınıfıdır. Dünya sağlık örgütü tarafından 1986'dan günümüze ağrı kesici olarak kullanılması gerekli kabul edilmektedir (Jayawardana vd., 2021). Vücuttan beyine iletilen ağrı hissi, opioid analjeziklerin merkezi sinir sisteminde bulunan opioid reseptörlerine bağlanmasıyla bloke olur, böylece mutluluk ve zindelik hissi oluşur. En fazla kullanılan opioidler oksikodon, hidrokodon, morfin, metadon, fentanil, tramadol ve kodeindir (Yu, 2014).

Opioidlerin akut, şiddetli ve kronik ağrılarda kullanılması gibi birçok avantajları olmasına rağmen opioid bağımlılığı küresel bir problem haline gelmiştir. Opioid bağımlılığı, dünyanın en büyük sosyal ve ekonomik problemlerinden biridir. Kötüye kullanım, bağımlılık ve bilinç kaybı etkisiyle, trafik kazalarında ve suç oranlarında artış olduğu belirtilmiştir (ji Kwon & Han, 2019). Düzenli reçeteli olarak ve yasa dışı yollardan temin edilmesiyle, bu ilaçların üretimi ve kullanımı her geçen gün artmıştır (Florence vd., 2016). Toplumun güvenliğini ve sağlığını olumsuz etkilemesi, gereksiz kullanıma dayalı fazla ilaç üretimine bağlı ekonomik problemlerden dolayı toplumsal bilinç oluşturulmalıdır.

İlaçların kötüye kullanımını değerlendirmek, toplumdaki potansiyel suistimalini ve hasta numunelerindeki opioid konsantrasyonunu belirlemek amacıyla çeşitli analitik metotlar geliştirilmektedir. İlaç analizi için en çok kullanılan geleneksel yöntemler, kromatografik ve spektrometrik yöntemlerdir. Morfin, kodein, fentanil ve fentanil türevleri UV-VIS spektroskopisi, kütle spektroskopisi, floresans spektroskopisi gibi analitik yöntemlerle çok düşük konsantrasyonlarda tespit edilmiştir (Ares-Fuentes vd., 2022; Cao vd., 2019; Eckart vd., 2015; Kim vd., 2014; Lotfi vd., 2016). Kromatografik yöntemler her ne kadar seçicilik, doğruluk ve tekrar edilebilirlik gibi parametrelerde yüksek performans gösterse de genellikle, deneyimli personele ihtiyaç duyan, yüksek miktarda çözücü gerektiren, daha karmaşık yöntemler ve pahalı ekipmanlar gerektirmektedir. Optik ve elektrokimyasal sensörler ise hızlı ve kolay analiz, taşınabilirlik, uygun fiyatlı ve pahalı deney düzeneği gerektirmeyen analitik yöntemlerdir. Elektrokimyasal sensörlerde seçiciliği arttırmak moleküler baskılı polimerler

(MIP) kullanılmaktadır. Optik sensörlerde ise çapraz reaktivite kullanılarak birden fazla analitin analizi mümkün hale gelmektedir. İndikatör boya yer değiştirme mekanizması, çapraz reaktivite optik sensörlerde kullanılan, renk değişimine bağlı göz ile görülebilen hızlı sonuçlar veren bir yöntemdir.

Bu tez kapsamında, adli tıp, klinik ve toksikoloji alanlarında önemli bağımlılık, bilinçsiz kullanım ve yüksek dozda kullanım sonucu ölümlere yol açabilen dört farklı opioid için sensör geliştirilmiştir. Kodein, dekstrometorfan, metadon ve oksikodon için optik sensör ve kodein için elektrokimyasal sensör geliştirilmesi amaçlanmıştır. Optik sensör sisteminde konakçı-konuk ilişkisi (reseptör-boya), kükürbütiril ve üç farklı boya kullanılarak floresans boya yer değiştirme mekanizmasıyla kurulmuştur. Bu boyalardan piridin kumarin bildiğimiz kadarıyla literatürde bulunmamaktadır ve tez kapsamında ilk kez sentezlenmiş, karakterize edilmiş ve optik sensör sisteminde kullanılmıştır. Çapraz reaktif optik sensör sistemi her bir analite farklı cevaplar vererek istatistiksel yayılım (varyans) sağlamıştır. Kodein analiti için de bildiğimiz kadarıyla ilk defa moleküler baskılama polimer yöntemiyle elektrokimyasal sensör geliştirilmesi amaçlanmıştır. Oluşturulan polimerik yapıda sentez ürünü amino asit temelli MA-Trp monomeri, polimerik başlatıcılar ve bağlayıcılar kullanarak stabil, güçlü ve kovalent olmayan etkileşimlerle bağlanabilen kompleks yapı oluşturulmuştur. Spektroskopik ve elektrokimyasal yöntemlerle karakterize edilmiş, optimizasyon parametreleri belirlenmiş, analitik performansı ve validasyon parametreleriyle seçici, gerçek numunelere uygulanabilen düşük konsantrasyonda tespit yapabilen elektrokimyasal sensör geliştirilmiştir. Geliştirilen elektrokimyasal ve optik sensörlerde literatürde bulunmayan yöntem ve malzemeler kullanılarak duyarlı ve hızlı analit tespiti sağlanmıştır.

1.2. Opioidlerin Tespitine Yönelik Geliştirilen Güncel Analitik Yöntemler

İlaç maddelerinin kantitatif ve kalitatif analizinin yapılması için günümüzde birçok analitik cihaz ve yöntemler geliştirilmektedir ve geliştirilen yöntemlerin validasyon parametreleri belirlenmektedir. İlaç analizinde en fazla kullanılan analitik metotlar, kromatografik, spektroskopik, elektroforetik, titrimetrik, ve elektrokimyasal yöntemlerdir (Siddiqui vd., 2017). Opioid analjeziklerin tespiti için genellikle yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), UV-Vis spektrofotometre, floresans spektroskopisi ve elektrokimyasal yöntemler kullanılmaktadır (Asadi vd., 2022; Paul vd., 2024; Rappleye vd., 2023; Yao vd., 2024). Kumaş fazı sorptif ekstraksiyonlu gaz-kütle kromatografisiyle kullanılarak yapılan bir araştırmada, fentanil ve türevlerini ng/mL konsantrasyon değerinde

bir hassasiyet ile tespit etmek mümkün olmuştur (Ares-Fuentes vd., 2022). UV-Vis spektrofotometre kullanılarak, kodein tayini insan idrarında düşük konsantrasyonlarda bile tespit edilmiştir (Lotfi vd., 2016). Rekabetçi floresans immünoanaliz tekniği kullanılarak insan idrar örneklerinde morfin tespiti yapılmış, floresans boya ile etiketlenmiş antikolar kullanılarak zaman alıcı numune hazırlama yöntemlerinin önüne geçilmiştir (Cao vd., 2019).

İdrar ve kan örneklerinden yapılan analizlerin yanı sıra saç örneklerinde opioid ilaç tespiti yapılmıştır (Bazargan vd., 2023). Yapılan bu çalışmada, dört farklı iki boyutlu (2D) polioksometalat temelli malzeme sentezlenmiş ve tek kristalli X-ışını kırınımıyla karakterize edilen maddelerde bulunan Keggin anyonları koordinasyonu sayesinde opioid ilaçlarının elektrostatik etkileşimlerle bağlanabileceği gösterilmiştir. Bu malzemelerin sorbent özelliği sayesinde HPLC ve mikro-katı faz ekstraksiyonu (D- μ SPE) kullanılarak, morfin, metadon ve petidin ekstraksiyonu ve kantitatif tayini yapılmıştır. Gerçek saç örneklerinde yapılan analizlerle geri kazanım değerleri 92.1-96.6 % bulunmuştur. 5 dakika gibi kısa ekstraksiyon süresi ve az miktarda kullanılan çözücü sayesinde hızlı, güvenilir ve kolay bir analitik yöntemdir. Fakat, bu malzemelerin sentezi uzun zaman ve pahalı laboratuvar ekipmanları gerektirmektedir.

Teknolojinin ve multidisipliner kimyanın gelişmesiyle birlikte malzeme senteziyle kombine edilmiş yenilikçi analitik metotlar ortaya çıkmaktadır. Yakın zamanda yayınlanan bir çalışmada, polivinil alkol (PVA)/poliakrilik asit (PAA)/MOF NiCoZn-LDH@grafen oksit (GO) elektrospun nanofiber sentezlenmiş ve ilk defa yeni bir sorbent olarak HPLC-UV cihazında kantitatif analiz için kullanılmıştır (Kharazmi vd., 2024). Dizayn edilen nanofiber malzemesinde MOF NiCoZn-LDH@GO'nun sağladığı gözenekli yapı ve PVA/PAA polimerinin içerdiği çok çeşitli fonksiyonel gruplarının sinerjik etkisiyle adsorbanının ekstraksiyon verimliliğinde bir artışa neden olmuştur. Geliştirilen nanofiber yapısıyla, analitlerin kovalent olmayan etkileşimleri sonucunda idrar ve plazma numunelerinde 7 farklı opioid ve analjezik ilaçların eş zamanlı analizi ve ekstraksiyonu yapılmıştır. Geliştirilen bu yöntemin en büyük dezavantajları elektrospun cihazının kullanılmasıyla ortaya çıkabilen elektrik çarpması ve ekstraksiyon gerektiren uzun ön işlem aşamalarıdır.

Thermo Fisher şirketi tarafından geliştirilen bileşik keşfi (compound discoverer) yazılımı bileşik tanımlamayı, karşılaştırılmalı analizleri ve veri kümelerinin analizi için kullanılan kütle spektrometresi tabanlı bir tekniktir (Scientific, 2024). Genellikle metabolomik, proteomik ve lipidomik uygulamalarında kullanılan bu yazılım günümüzde

bilinen bir bileşiğin bilinmeyen analoglarında kullanılmaya başlamıştır (Montone et al., 2020). 2024 yılında yayınlanan bir araştırmada, 12 fentanil temelli bilinmeyen analoglarının bileşik keşfi yazılım desteğiyle otomatik tespiti ve tanımlanması yapılmıştır ve çevresel toprak matris ekstresi içerisinde 1 ng/mL konsantrasyonda tespit edilmiştir (Drug et al., 2024). Sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi kullanılarak florlama, metilasyon ve asetilasyon gibi kimyasal modifikasyonları içeren 12 bilinmeyen fentanil bileşiklerinin molekül ağırlıkları, pik alanları ve alıkonma süreleri hesaplanarak otomatik tespit yapılmıştır. Kimyasal değişikliklere uğrayan moleküllerin tespiti için hızlı hesaplama sağlayan bu yazılımın bazı olumsuz yönleri vardır. Bunlar, tam yapısal açıklamanın elde edilememesi, birkaç yanlış pozitif tespiti ve ürün iyon mekanizmasının tam olarak açıklanamamasıdır.

Raman spektroskopisi, opioidlerin tespiti için kullanılan diğer bir analitik metottur (Lian vd., 2023; Öberg vd., 2024; Shende vd., 2019; Wilcox vd., 2023). Fentanil ve bileşiklerinin küçük miktarlardaki ölümcül etkisinden dolayı, numunelerdeki çok küçük miktarların tespit edilebilmesi daha da önemli hala gelmiştir. 5 farklı fentanil bileşiklerinin analizi için Raman kesitleri ve bant belirleme yöntemiyle yapılan çalışmada, spektral modların tanımlanmasına yardımcı olmak için yoğunluk fonksiyonel teorisi hesaplamaları (DFT) kullanılarak dedeksiyon limitleri bulunmuştur (Wilcox vd., 2023). Çeşitli toz halindeki malzemelerle kesilmiş fentanillerle ilgili bir dizi çalışmanın sonuçları da bu kesit ölçümleri ve hesaplamalar kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu ölçümler, diğer malzemelerle karıştırıldığı durumlar da dahil olmak üzere, fentanil ve fentanil bileşiklerinin tespiti için sahada çalışabilen Raman kimyasal sensörlerinin değerlendirilmesi açısından değerlidir. Yüzey zenginleştirilmiş Raman spektroskopisi (SERS), tespit sınırlarını düşürmek ve interferans maddeleri ortamında daha iyi seçicilik sağlamak için kullanılmaktadır. Fakat, SERS çalışmaları karışımlarda azınlık bileşenleri olarak fentanilleri tespit etme konusunda umut vaat ederken farklı fentanil analogları arasında ayırım yapmanın zor olabileceğini göstermektedir.

Kolorimetrik analiz, basit görsel sonuçlara dayanan ve komplike cihaz gerektirmeyen bir yöntemdir. Opioidler çeşitli kolorimetrik reaktiflere farklı renklerde cevap verir ve böylece hızlı bir ayırım yapmak mümkündür. Birleşmiş Milletler Uluslararası İlaç Kontrol Programı, kodein tespiti için Marquis, Mecke, nitrik asit ve ferrik sülfat testleri çeşitli kolorimetrik analizler önermektedir (United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), 1994). Örneğin, Mandelin reaktifi kodein için yeşilden maviye, eroin için maviden griye dönerken, morfin için açık gri rengi gözlemlenmektedir (O'Neal vd., 2000). Froehde reaktifi, kodein için açık yeşil, morfin için mor renginden griye dönerken, eroin için renk değişimi

göstermemektedir. Marquis reaktifi, kodein, morfin ve eroin için mor rengi verirken, Mecke reaktifi bu 3 analit için maviden yeşile dönmektedir (Pratiwi vd., 2021). Bu yöntemler çıplak gözle görüntülenebildiğinden yerinde analiz için oldukça kullanışlıdır ve pratikte güvenlik görevlileri tarafından kullanılmaktadır. Ancak bu testler fonksiyonel gruplarla reaksiyona dayandığı için yanlış pozitif sonuçlar görülmesi yaygındır.

1.3. Opioid Analjeziklerin Etkisi ve Önemi

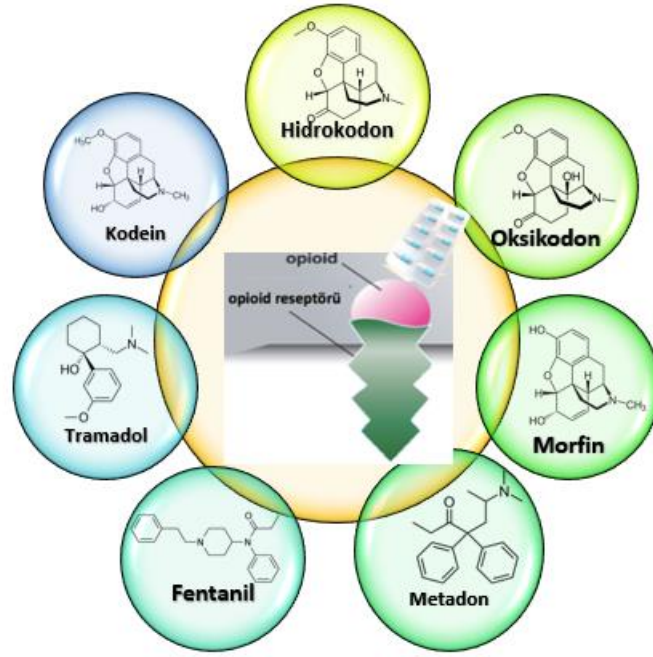
Opioidler, haşhaş bitkisinden (*Papaver somniferum*) ekstrakte edilen bileşiklerin yanı sıra beyindeki mu (μ), delta (Δ) ve kappa (κ) opioid reseptörleri ile etkileşime girebilen benzer özelliklere sahip yarı sentetik ve sentetik bileşiklerden oluşur (Azevedo vd., 2021; Laycock & Bantel, 2019). Çok sayıda farmasötik preparatın bileşimindeki çeşitli opioid ilaçların mekanizması ve terapötik kullanımları çizelge 1.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. Opioidlerin mekanizması ve terapötik kullanımı

	Opioidler	Etki Mekanizması	Terapötik Kullanımı	Ref.
Doğal	Morfin	Mu (μ) opioid reseptör agonisti	Şiddetli ağrı tedavisinde analjezik etki, akut akciğer ödemi tedavisi, ishal tedavisi	(Laycock & Bantel, 2019)
	Kodein	(μ) opioid reseptör agonisti	Hafif ila orta şiddette ağrı yönetimi, ishal tedavisi, öksürüğün hafifletilmesinde analjezik etki	(Azevedo vd., 2021)
Yarı-sentetik	Hidromorfon	(μ) opioid reseptör agonisti	Orta ila şiddetli ağrı tedavisinde analjezik etki, antitussif etki	(Azevedo vd., 2021)
	Hidrokodeon	(μ) opioid reseptör agonisti	Orta ila şiddetli ağrı tedavisinde analjezik etki, antitussif etki	(Azevedo vd., 2021)
	Oksikodon	(μ) opioid reseptör agonisti	Orta ila şiddetli ağrı tedavisinde analjezik etki	(Azevedo vd., 2021)
	Oksimorfon	(μ) opioid reseptör agonisti	Orta ve şiddetli ağrı tedavisinde, akut pulmoner ödem tedavisinde analjezik etki	(Whalen vd., 2015)
Sentetik	Fentanil	(μ) opioid reseptör agonisti	Anestezi, epidural analjezi, orta ila şiddetli ağrı tedavisinde (akut	(Kim vd., 2014;

			ve postoperatif ağrı) analjezik etki.	Whalen vd., 2015)
	Karfentanil	(μ) opioid reseptör agonisti	Veterinerlikte kullanım için ağrı yönetimi ve sakinleştirici madde	(Abbate vd., 2021)
	Meperidin	(μ) opioid ve kappa (κ) reseptör agonisti	Akut ağrı yönetimi, anestezi, epidural analjezi	(Katzung & Trevor, 2015)
	Metadon	(μ) opioid reseptör agonisti	Opioid bağımlılarının kontrollü olarak geri çekilmesi	(Katzung & Trevor, 2015)
	Tramadol	(μ) opioid reseptör agonisti	Orta ila şiddetli ağrı tedavisinde analjezik etki	(Whalen vd., 2015)
	Tapentadol	(μ) opioid reseptör agonisti	Orta ila şiddetli ağrı tedavisinde analjezik etki	(Laycock & Bantel, 2019; Whalen vd., 2015)

Şekil 1.1.'de en yaygın kullanılan opioidler ve kimyasal yapıları gösterilmiştir (Yu, 2014). Morfin, hidrokodon, metadon ve tramadol gibi ilaçları içeren opioidler sıklıkla akut ağrısı ve şiddetli ağrıları hafifletmek için kullanılır, ayrıca kodein hafif ila orta dereceli ağrı ve kronik kanser ağrısını hafifletmek için kullanılır (Mynttinen vd., 2019; Pratiwi vd., 2021). Opioid bağımlılığının tedavisinde metadon ve buprenorfin gibi opioid ilaçlar kullanılmaktadır (Yence vd., 2022). Fentanil, morfinden 50-100 kat daha etkili, ucuz sentez prosedürüne sahip ve 2 ila 3 miligramı bile solunum sıkıntısına hatta ölüme neden olabilir (Glasscott vd., 2020). Fentanilin yapısında yapılan modifikasyonlarla çok çeşitli sentezler yapılmaktadır ve memeliler üzerinde sakinleştirici özellikleri test edilmektedir. Analjezik özellikleri sebebiyle kullanılan fentanil ve fentanil temelli ilaçlar günümüzde kendi başlarına veya eroin gibi diğer yasa dışı ilaçlarla karıştırılarak kötüye kullanılan uyuşturucular haline gelmiştir (Wilcox vd., 2023). Eroinin etkisini arttırmak amacıyla bilinçsizce karıştırılarak kullanılan fentanil, karışım içerisinde yüksek konsantrasyonlarda bulunabilir ve aşırı etkili potansiyeli sayesinde ölümcül etkilerle sonuçlanmaktadır.



Şekil 1.1. Yaygın kullanılan opioidler

2021 yılında dünya çapında yaklaşık 296 milyon kişi en az bir kez uyuşturucu kullanmış ve bunların arasında 60 milyon kişi opioid kullanmıştır (WHO, 2023). Her geçen gün artan opioid kullanımıyla, 255 milyondan fazla reçete yazılmış ve 100 kişi başına 81.3 oranında reçeteli opioid kullanılmıştır ve bu oran bazı ülkelerde 9 kat daha fazladır (Dowell vd., 2016). Reçeteyle ulaşımın sağlanması ve sentetik opioidlere kolay erişim sayesinde dünyada opioid krizi başlamıştır ve opioid fazla dozdan dolayı ölüm sayısı artmıştır. 2018 yılında ABD'de aşırı dozda uyuşturucu nedeniyle 67.000'den fazla kişi ölmüş bunlardan 46.000 kişi opioide bağlı aşırı dozdan dolayı ölmüştür ve %70'i fentanil kaynaklı ölümlerdir (Dagar vd., 2022; Verrinder vd., 2021). 2020 yılında sentetik opioidlerden ölenlerin sayısı 2019'a göre %55 son beş yılda ise neredeyse %600 artmıştır (Wilcox vd., 2023). Covid-19 salgını sırasında bile sentetik opioidlerden kaynaklı aşırı dozda ölen insan sayısında hızlı bir artış olmuştur (WHO, 2023). Opioidler kullanım sonrasında mutluluk ve rahatlama etkisi sağladığı için tıbbi olmayan nedenlerle alınabilir. Opioidlerin bilinçsizce kullanımı da oldukça yaygındır, kronik ağrı sebebiyle reçeteli kullananların bir kısmı kötüye kullanmaktadır ve kullanım bozukluğu gelişmektedir. Aşırı dozda kullanım ve amacının dışında kullanılan opioidler toplumda ekonomik ve sosyal etkilere yol açmaktadır. Hastalık kontrol ve önleme merkezlerine göre, Amerika'da reçeteyle satılan opioid kötüye kullanımının toplam ekonomik yükü yılda 78.5 milyar dolardır ve büyük bir kısmı bağımlılık tedavisi için kullanılmaktadır (Florence vd., 2016). Dünya Sağlık Örgütü Uyuşturucu Bağımlılığı Uzman Komitesi'nin

tavsiyesi uyarınca fentanil ve fentanil modifikasyonlu ilaçlar uluslararası kontrol altına alınmış ve kötüye kullanımını en aza indirme çabası başlatılmıştır.

1.4. Tez Kapsamında Kullanılan Opioidler ve Tespitine Yönelik Çalışmalar

Ağrı tüm dünya genelinde önemli bir sağlık sorunudur ve cinsiyet, yaş, ekonomik durum ve coğrafya fark etmeksizin herkesi etkilemektedir. İstatistiksel araştırma sonuçları, her beş yetişkinden birinin ağrı çektiğini ve her on yetişkinden birine ise her yıl kronik ağrı tanısı konulduğunu gösteriyor. Ağrının başlıca nedenleri kanser, romatoid artrit, osteoartrit, duygusal sıkıntı, ameliyatlar ve yaralanmalardır (Yence vd., 2022). Özellikle, kanser ağrısı hastalık kaynaklı veya tedavi sırasında görülebilen komplikasyon sonucu olabilir ve hastaların fonksiyonel durumunu ve yaşam kalitesini önemli ölçüde etkilemektedir (NIH, 2023). Opioidler uzun yıllardan itibaren ağrı kesici olarak kullanılmaktadır. Beyinde bulunan reseptörlere bağlanan opioidler, analjezik ve sedatif etkilere sahiptir. Tez kapsamında elektrokimyasal sensör kısmında kodein, optik kısmında ise kodein, metadon, oksikodon ve dekstrometorfan opioid ilaçları üzerine çalışmalar yapılmıştır. Kodein, metadon ve oksikodon kanser hastalarında kullanılmaktadır (Moksnes vd., 2011; Pratiwi vd., 2021). Dekstrometorfan ise genellikle soğuk algınlığı, grip veya diğer rahatsızlıkların neden olduğu öksürüğü hafifletmek için kullanılır.

1.4.1. Kodein

Yasadışı uyuşturucular kökenlerine göre üç sınıfa ayrılır. Bunlar, doğal (tamamen bitkilerden elde edilenler), yarı sentetik olanlar (doğal bileşiklerin kimyasal türevleri) ve sentetik olanlar (kimyasal olarak sentezlenenler). Doğal uyuşturucular sınıfına giren maddeler kokain, morfin, esrar ve kodeindir (K. Kim vd., 2023). Kodein (KOD), şimdiye kadar en eski farmasötik maddelerden biri olan afyondan doğrudan elde edilebilir ve Fransız kimyager Pierre-Jean Robiquet ilk kez 1832'de izole etmiştir (Yence vd., 2023). Ayrıca, morfinin metilasyonu ile tıbbi kullanım için de elde edilebilir. Vücutta 10% miktarda kodein metabolize edilerek aktif metaboliti olan morfine dönüşebilir (K. Kim vd., 2023). Henüz, kodein'in etki mekanizması bulunamamıştır fakat morfin gibi beyindeki opioid reseptörlerine bağlandığı düşünülmektedir (Bhandari vd., 2011). Kodein, sakinleştirici etkisi sayesinde hafif ila orta şiddette ağrının hafifletilmesi ve tüberküloz ve sürekli öksürüğe bağlı uykusuzluk durumlarında kullanılır. Ağrının daha kısa sürede giderilmesi için asetaminofen veya aspirin ile kombinasyon halinde de kullanılabilir (Pratiwi vd., 2021). Kodein kullanımının bazı olumsuz sonuçları vardır. Opioidlerin psikoaktif özelliğinden dolayı, bağımlılık yapabilir. Kodein

kullanımın fiziksel ve psikolojik bağımlılık yaratabilme özelliğinden dolayı halk sağlığı endişesi ortaya çıkmaktadır. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada uzun süreli kodein kullanımının kadınlarda yumurtalık steroidogenezi ve folikülogenez üzerindeki olumsuz etkilerinden dolayı cinsel fonksiyonu etkilediği ortaya çıkmıştır (Akhigbe vd., 2022). Kodein maddesi için yapılmış çalışmalar çizelge 1.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.2. Kodein tespiti için yapılan bazı çalışmalar

Yöntem	Doğrusallık Aralık	Teşhis Sınırı	Uygulama	Geri Kazanım (%)	Ref
DPV	18.0-460.0 μ M	0.0057 μ M	İdrar Plazma	99.8-101.0 100.0-102.4	(Mohammadi vd., 2021)
DPV	10 pM-100 nM	3.0 pM	-	-	(Huang vd., 2013)
SWV	0.05-9.0 μ M 9.0-30.0 μ M	0.015 μ M	İdrar Oral solüsyon	95.0-102.0 97.9-101.5	(Y. Li vd., 2013)
Amperometri	4.9-45.4 μ M	4.9 μ M	İdrar Tablet	-	(Asturias-Arribas vd., 2014)
DPV	0.06-10.0 μ M	0.01 μ M	İdrar Plazma	104.6 98	(Hasanpour vd., 2018)
DPV	0.1-60 μ M	0.08 μ M	Tablet	96.2-102.6	(Švorc vd., 2013)
SWV	0.299-10.8 μ M	54.6 nM	İdrar Plazma	87.8-100.8 93.3-99.7	(Simioni vd., 2017)
SWV	0.5-38 μ M	0.0095 μ M	İdrar	98.0	(Wong vd., 2021)
SWV	0.03-12 μ M	0.011 μ M	İdrar Plazma	98.1-100.6 97.7-102	(Afkhami vd., 2014)
DPV	0.2-20 μ M	0.06 μ M	Plazma	94.0-104.0	(Mashadizadeh vd., 2016)
DPV	0.06-38 μ M	0.02 μ M	İdrar Plazma	98.0-102.85 99.0-102.35	(Afkhami vd., 2016)
DPV	0.1-25.0 μ M	0.02 μ M	İdrar Plazma	104.0-107.0 96.0-103.0	(Ensafi vd., 2015)
UV-VIS	-	-	Tablet	-	(Diaconu vd., 2010)
UV-VIS	-	18 ng/mL	Su	97.2-97.9	(Gharbavi vd., 2014)

HPLC	-	5 ng/mL	Plazma	82.7-108	(Weingarten vd., 1995)
UV	-	0.4 ng/mL	İdrar	-	(Lotfi vd., 2016)
HPLC	-	5 ng/mL	Plazma	82.7-108	(Weingarten vd., 1995)

1.4.2. Metadon

Metadon (MET), N-metil-D-aspartat reseptörlerini bloke eden, kanser ağrısının hafifletilmesinde ve opioid direncinin gelişiminde kullanılan bir opioid analjeziktir (Ouchi vd., 2024). Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından 1947'de analjezik ve antitussif kullanımı için onaylanmıştır. Sonrasında ise opioid bağımlılığının tedavisinde kullanılabileceği keşfedilmiştir (Çakıcı vd., 2019). Metadon uyuşturucu bağımlılığını genellikle eroïn veya morfin gibi kısa süreli etkili ilaçları tedavi etmek için kullanılır (Vignali vd., 2015). Metadon'un diğer ilaçlara özellikle morfine göre daha az bağımlılık yapıcı bir özelliği vardır, çünkü metadon'un ömrü morfine göre daha uzundur ve lipofilitesi nedeniyle karaciğer ve dokularda çabuk dağılmaz. Uzun terminal ömrü, potansiyel ilaç etkileşimleri ve bazı risklerden dolayı, MET dozunu ayarlamak zorlayıcı olabilir ve kanser hastalarında opioid değişimini ayarlamak, ağrı üzerinde bir tedavi stratejisidir (Moksnes vd., 2011). 5 mg parenteral eroïn dozu yaklaşık olarak 20 mg oral metadona eşdeğerdir (Anderson, 2000). Merkezi sinir sistemini etkilemesi, analjezik ve antitussif özelliğinden dolayı, solunum, hormonlarda değişiklik ve bağırsak üzerinde bazı etkileri vardır. Bu etkilerinden dolayı fiziksel ve psikolojik bağımlılığa neden olurlar. MET, çok kullanımına bağlı olarak aşırı dozdan ölüme sebep olabilir. Bu nedenle bazı ülkelerde doktorların reçeteleri incelenmektedir ve aynı anda birden fazla reçete yazılmasını engellemek için çalışmalar yapılmaktadır (Shafaat vd., 2023). Türkiye'de metadon kullanımına izin verilirken KKTC'de kullanım izni yoktur (Çakıcı vd., 2019). Kan ve idrar tahlilinde MET konsantrasyonunu belirlemek önemlidir ve bunun için geliştirilmiş analitik metotlar Çizelge 1.3.'te gösterilmiştir.

Çizelge 1.3. Metadon tespiti için yapılan bazı çalışmalar

Yöntem	Doğrusallık Aralık	Tehşis Sınırı	Uygulama	Geri Kazanım (%)	Ref
DPV	0.1-225 µM	0.03 µM	İdrar	99.3-103.6	(Rezaei vd., 2020)
DPV	1.0–100.0 µM	0.18 µM	Plazma	98.0-103.0	(Baghayeri vd., 2021)

SWV	0.1-500.0 µM	0.005 µM	İdrar Tükürük	98.2-103.0 97.4-102.5	(Afkhami, Soltani- Felehgari, vd., 2014)
DPV	0.1-15 µM	87 nM	Plazma İdrar	96.1-106.8 95.7-102.4	(Alipour vd., 2015)
DPV	0.45-90.0 µM	0.35 µM	İdrar Tükürük Tablet	99.3-100.4 97.1-98.0 98.7-99.1	(Amiri- Aref vd., 2013)
DPV	40-1000 µM	0.019 µM	Plazma	96.5-98.8	(Ma & Tian, 2023)
DPV	0.1-225 µM	0.03 µM	İdrar Plazma	99.3-103.6 96.6-103.4	(Rezaei vd., 2020)
DPV	1.0-100 µM	0.18 µM	Plazma	98.0-103.6	(Baghayeri vd., 2022)
UV-VIS	1-25 µM	3.60 µM	-	-	(Farahani vd., 2022)
SVW	0.1-4 µM	0.029 µM	İdrar	105.6	(Habibi vd., 2022)
Amperometri	0-120 µM	22 nM	İdrar	98.9-99.9	(Song vd., 2022)
Kütle Spektroskopisi	-	-	-	-	(Moore vd., 2001)
DPV	0.1-250 µM	8.3 nM	İdrar	98.8-100.8	(Akbari vd., 2020)
HPLC	-	2.0 µg/mL	-	101.5	(Álvaro- Alonso vd., 2022)

1.4.3. Oksikodon

Oksikodon (OKS) yarı sentetik, analjezik olarak yaygın kullanılan güçlü opioid sınıfından bir ilaçtır (Khosropour vd., 2021; Mynttinen vd., 2020). 1917'den bu yana klinik çalışmalarda kullanılan OKS özellikle ameliyat sonrasında oluşan ağrı ve salınlımlı kullanımı ise kanserle ilişkili ağrıların tedavisinde kullanılır (Razlansari vd., 2022). Aspirin veya asetaminofen gibi maddelerle kombinasyonu ağrının hafifletilmesine yardımcı olarak ilaç piyasasında yerini almıştır (Charkravarthula & Mugweru, 2023). Oksikodon hem indirgeyici hem de yükseltgeyici metabolitlere sahiptir, bunlar noroksikodon, oksimorfon ve noroksimorfondur. Vücuda alındıktan sonra çeşitli karaciğerde bulunan enzimler sayesinde farklı konsantrasyonlarda yükseltgeyici metabolitlerden noroksikodon ve oksimorfon'a dönüşür ve kana karışır. Kanda daha yüksek konsantrasyonda bulunan noroksikodon'un μ -opioid reseptör üzerinde etkisi yoktur bu sebepten ağrı üzerinde bir etkisi olmazken diğer

metabolit oksimorfon'un reseptör üzerinde etkisi daha fazladır ve kendi başına da ağrı kesici olarak kullanılabilir. Bir sonraki oksidasyon ürünü olan noroksimorfon kan-beyin bariyerini çok fazla geçemediği için, ağrı kesici etkisi bulunmamaktadır. Yani, oksikodon'un metabolitlerinden ziyade kendi başına farmakolojik etkisi bulunmaktadır (Mynttinen vd., 2020). Oksikodon, en fazla reçete edilen narkotik ilaçlardan birisi olmuştur ve buna bağlı olarak bağımlılık, aşırı doz ve ölüm gibi ciddi yan etkileri ortaya çıkmıştır. 2011'den 2016'a kadar 5526 kişi oksikodon'dan dolayı hayatını kaybederken, 2017 yılında 70.000'den fazla aşırı doz ilaç ölümlerinden %68'i oksikodon kaynaklıdır (Mynttinen vd., 2020; Zhang vd., 2021). Ameliyat sonrası kullanılan oksikodon miktarı kanda genellikle 0.3-100 nM olarak tespit edilirken aşırı doz kullanımı sonrasında 10 µM'a kadar çıkabilmektedir (Mynttinen vd., 2020). Bu sebepten, hastaların kanında veya idrarında oksikodon konsantrasyonunu izlemek amacıyla analitik yöntemler geliştirilmelidir, bunlardan bazıları Çizelge 1.4.'te gösterilmiştir.

Çizelge 1.4. Oksikodon tespiti için yapılan bazı çalışmalar

Yöntem	Doğrusallık Aralık	Tehşis Sınırı	Uygulama	Geri Kazanım (%)	Ref
SWV	0.4-5 nM	1.8 nM	-	-	(Charkravarthula & Mugweru, 2023)
DPV	0.01-45 µM	2 nM	Plazma	95.0-106.0	(Khosropour vd., 2021)
HPLC-UV	2-100 ng mL ⁻¹	2 ng mL ⁻¹	-	-	(Cheremina vd., 2005)
HPLC-MS/MS	300-5000 pg mL ⁻¹	30 pg mL ⁻¹	Plazma	77.3±11.8 76.5±8.3	(Gaudette vd., 2016)
HPLC-MS/MS	5-1000 ng mL ⁻¹	5 ng mL ⁻¹	Plazma	96.1-108.5	(Narayanasamy vd., 2019)
DPV	0.5-10 µM	85 nM	-	-	(Mynttinen vd., 2020)
DPV	0.06-38 µM	50 nM	İdrar Plazma	94.0-102.9 97.6-102.4	(Afkhami vd., 2016)
Kolorimetrik	1-20 µM	1µM	-	-	(Mohseni vd., 2017)
Raman Spektroskopisi	90 ng mL ⁻¹ -900 ng mL ⁻¹	90 ng mL ⁻¹	-	-	(Zhang vd., 2021)
HPLC-UV	1-2000 ng/mL	2.67 ng/mL	İdrar	92.5-103.2	(Ansari & Masoum, 2021)

Kütle Spektroskopisi	0–100 ng/mL	1.56 ng/mL	-	-	(Minhas vd., 2020)
ELISA-kütle spektroskopisi	0 to 1000 ng/g	50 ng/g	-	-	(Le vd., 2005)

1.4.4. Dekstrometorfan

Dekstrometorfan (DM), levorfanolün dekstro-izomeri, kodein analogu, narkotik olmayan antitussif morfin türevli bir ilaçtır (Amiri vd., 2014; El-Naby, 2008; El-Naby & Kamel, 2015). Hafif boğaz ve bronş tahrişinin neden olduğu öksürüğü ve solunum bozukluğunu tedavi eden bu ilaç reçetesiz satılabilir (Amiri vd., 2014). Soğuk algınlığı ve öksürük için kullanılan yaklaşık 125 üründe bulunmaktadır (Ganjali vd., 2010). 2013 yılında yapılan bir çalışmada, opioid bağımlılığını ve yoksunluk süresini azaltmak için klonidin ile kombine edilmesi sonucunda semptomların ve yoksunluk belirtisinin azaldığı tespit edilmiştir (Malek et al., 2013). Terapötik dozunda kullanıldığında istemsiz öksürme dürtüsünü azaltır ve bağımlılık etkisi oluşturmaz. Onaylanan ortalama yetişkin dozu günde 3 ila 4 kez 15-30 mg'dır (Rezaei vd., 2016). Fakat bu doz aşılsa, ketamin ve fensiklidin kullanımında olduğu gibi dissosiyatif halüsinasyonlar görülebilir dolayısıyla bu etkiye sahip olmak isteyen kişiler tarafından kötüye kullanılabilir (Amiri vd., 2014). Son yıllarda ergenler ve genç yetişkinler arasında kullanımı artmıştır ve bu sebepten “fakir kişilerin fensiklidin’i” olarak bilinir (El-Naby, 2008). Keyif verici madde olarak bilinen bu ilaç, alternatiflere ve yasa dışı uyuşturuculara kıyasla ucuz olduğundan dolayı tercih edilmektedir. Yüksek dozda kullanımında, idrar testlerinde fensiklidin ile karıştırılarak yanlış test sonucuna sebep olabilir (El-Naby & Kamel, 2015). Bu nedenle, testten doğru cevap alınması ve konsantrasyon belirlenmesi için güvenilir analitik testlerin geliştirilmesi çok önemlidir. Bu yöntemlerden bazıları Çizelge 1.5’te gösterilmiştir.

Çizelge 1.5. Dekstrometorfan tespiti için yapılan bazı çalışmalar

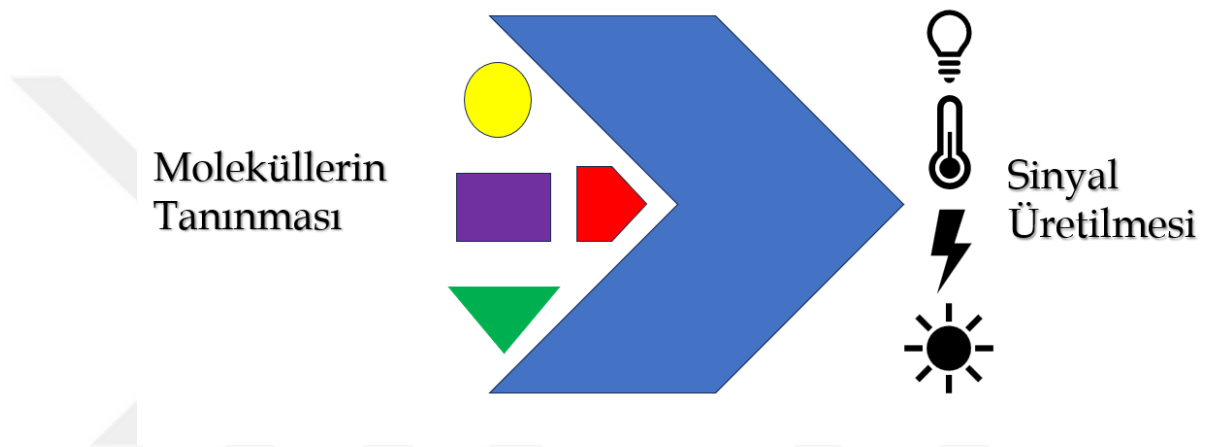
Yöntem	Doğrusallık Aralık	Teşhis Sınırı	Uygulama	Geri Kazanım (%)	Ref
DPV	8.0–800.0 µM	2.89 µM	Serum Tablet	109.4 114.9	(Amiri vd., 2014)
DPV	250-3300 µM	8.81 µM	Şurup Tablet	99.2-106.7 99.0-101.9	(Heli vd., 2010)

MIP/ metakrilik asit	5.6×10^{-6} -1.0×10^{-2} M	1.9×10^{-6} M	Tablet İdrar	96.8-98.5 94.2-98.8	(El-Naby & Kamel, 2015)
DPV	2-600 μ M	0.19 μ M	Plazma İdrar	99.8-101.7 97.5-105	(Rezaei vd., 2016)
Potansiyometri	10^{-6} - 10^{-2} M	1×10^{-6} M	İdrar	102.7-105.2	(Ganjali vd., 2010)
Potansiyometri	10^{-7} - 10^{-2} M	7.0×10^{-8} M	Tablet	97.2-99.1	(Khaled vd., 2011)
SWV	0.062 to 242 μ M	9.10 nM	Tablet İdrar Plazma	99.3-99.5 99.8 $\pm$ 0.27 99.7 $\pm$ 0.12	(Rajpurohit & Srivastava, 2019)
DPV	5-1500 ng/mL	1.5 ng/mL	Plazma İdrar	64-97	(Fakhari vd., 2014)
HPLC-UV	0.2-5.0 μ g/mL	50 ng mL ⁻¹	İdrar	84.8-104.8	(Ebeshi vd., 2014)
Kılcal gaz kromatografisi	0.37-7.38 μ M	0.30 μ M	İdrar	88.1-103.9	(WU vd., 2003)
Kapiler Elektroforez	1-400 ng/mL	0.5-1 ng/mL	Plazma	97-101	(Kristensen, 1998)

1.5. Analitik Kimyada Sensörler

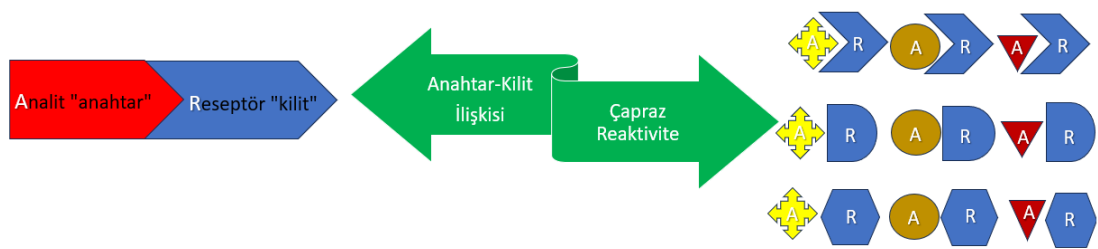
Analitik Kimya, yöntem, araç gereç ve teknik cihaz geliştiren ve uygulayan maddelerin kantitatif ve kalitatif analizini yapan kimya bilimidir (M. Valcárcel&Luque de Castro, 1994). Analitik kimyacılar, birçok multidisipliner alanlardan mühendis, doktor ve biyologlar ile çalışarak kimyasal problemlerin çözümü için, analiz, numune alma, inceleme, süreç araştırma ve geliştirme gibi sorumlulukları yerine getirmeye çalışırlar. Günümüz Analitik Kimya'nın temel trendlerinde yeni analiz enstrümantasyon geliştirilmesi, yenilikçi yöntem, analiz ve ayırma teknikleri metotları üretilmesi bulunmaktadır. Ayrıca elde edilen çoklu verilerin kemometrik yöntemlerle analitlerin sınıflandırılması, tanımlanması ve bilinmeyen maddelerin tayini kolaylaştırılmaktadır. Teknolojinin gelişmesiyle analizlerin daha hızlı, güvenilir ve yerinde analize imkân tanıyan otomasyon ve minyatürleştirme temelli analitik cihazlara ihtiyaç duyulmaktadır. Kimyasal sensörler, bu ihtiyaçları karşılamakta, her geçen gün yenilikçi malzemelerle gelişen ve çeşitli analizlerin tespitine olanak sağlamaktadır. Kimyasal sensör, bir maddenin kimyasal bilgilerini, niteliksel ve niceliksel olarak analiz eden, kimyasal sinyali analitik sinyale dönüştürebilen cihazlardır (Faridbod vd., 2018; Mandoj vd.,

2018). Kimyasal sensörler algılayıcı malzeme ve dönüştürücü olarak iki kısımdan oluşur. Şekil 1.2’de gösterildiği gibi algılayıcı malzeme hedef analit ile etkileşime girer ve bunun sonucunda kütle, elektrik ve sıcaklık gibi maddesel değişiklikler ortaya çıkar. Dönüştürücü bu değişiklikleri algılayıp anlamlı bir elektronik sinyale dönüştürür (Mandoj et al., 2018). Bazı durumlarda, sinyal arttırıcı olarak sinyal işlemcisi kullanılabilir. Maddeler çıkış sinyallerindeki değişen manyetik, mekanik, elektrokimyasal, optik ve termal özelliklerine göre sınıflandırılabilir. Kimyasal sensörler, analitlerle direkt etkileşime girerek kısa zamanda cevap üretmesiyle çok çeşitli analizlerde kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları, çevresel atıklar, hastalıklar ve hatta hücrelerdeki organizmalardır (Rostamzad, 2022).



Şekil 1.2. Kimyasal sensörün çalışma prensibi

Şekil 1.3.’te gösterildiği gibi kimyasal sensörler seçiciliklerine göre anahtar-kilit ilişkisi ve çapraz reaktive olarak iki gruba ayrılabilir.



Şekil 1.3. Seçiciliklerine göre kimyasal sensörler

Anahtar-kilit ilişkisi, enzimlerin substratların yüzeyinde bulunan aktif bölgelerine bağlanmasından dolayı ortaya çıkmış kendilerine özgü bağları tanımlamaktadır. Anahtarın sadece belirli kilidi açmasından dolayı seçici özelliği sensörlerde de kullanılmaktadır. Bu ilişki düşünülerek, elektrokimyasal biyosensörler, enzim bağlı immünosorbent tahlili (ELISA), floresans sensörler ve SERS gibi analitik yöntemler kullanılarak spesifik analit tayini yapılmaktadır. Anahtar-kilit prensibine dayanarak antikor, nükleik asit ve faj temelli

yöntemlerle bakterilerin tayini yapılmaktadır. Antikorların spesifik antijen bağlama bölgelerine sahip olması, nükleik asitlerin aptamerleri ve fajların konakçı bakterilere bağlanması anahtar görevi görerek seçici bir ilişki sağlamaktadır (Liu vd., 2023). Aptasensörler yeni nesil bağlayıcı unsurlar olduğu için son zamanlarda yenilikçi çalışmalar yapılmaktadır. Aptamer kelimesi Latince *aptus* “uymak (to fit)” ve Yunanca *meros* “parçacık (particle)” kelimesinden türemiştir ve parçacıklara uyma anlamıyla anahtar-kilit ilişki modelini tanımlamak için kullanılmıştır. Aptamerler yüksek afinite ve seçicilikle çok çeşitli hedef analitlere protein, metaller, küçük iyonlar ve virüslere bağlanabilir (Aljohani vd., 2022). Biyo-elektrokimyasal sensörler, DNA, enzim ve antikor gibi biyolojik malzemeleri reseptör olarak kullanan cihazlardır. Enzim temelli biyosensörler ise en eski bilinen biyosensörlerden ve anahtar-kilit mekanizmasına göre enzim reseptörlerinin hedef analite bağlanmasıyla çalışır. Bu sensörlerin yüksek seçicilik, duyarlılık ve kararlılık gibi yararları olsa da enzimlerin aktivitesini kaybetmesi ve immobilize etmek zordur (Shanbhag vd., 2023). Sadece bir sensör bir analit sınırlandırılması, özel sentez ve dizayn gerektirmesi, bilinmeyen analitler için yeterli bilgi sunmaması ve çok bileşenli analitler için kolayca uygulanamaması gibi bazı dezavantajları vardır.

Çapraz reaktif sensörlerin ise seçiciliği daha düşüktür ve çeşitli analitlere farklı oranlarda cevap verir. Seçicilikleri düşük olmasına rağmen, sensör çalışmalarında çapraz reaktif sensörlerin kullanımı oldukça yaygınlaşmıştır. Bu sensörler “kimyasal burun” veya “kimyasal dil” olarak da adlandırılmıştır. Memelilerin yarı-seçici olan koku alma veya tat alma sensörleri, kokulara veya tat alınacak olan maddelere farklı oranlarda cevap vererek bir “cevap kalıbı” oluştururlar (Dryer & Berghard, 1999). Çok sayıda sensör elementinden gelen ve parmak izi şeklinde de adlandırılan bu karakteristik cevap kalıpları beyinde algılanır ve hafızada saklanır (Collins & Anslyn, 2007). Böylece beyinde kokular ve tatların oluşturduğu cevap kalıpları ile, o kokuların ve tatların ait olduğu maddeler arasında bir ilişki kurulmuş olur. Memelilerin koku ve tat alma mekanizmasını taklit eden çapraz reaktif sensör dizileri, bir reseptörün seçiciliğine dayanmaktansa, birden çok reseptörün toplam cevabına bakarak analiz sağlamaktadır (Collins & Anslyn, 2007). Çapraz reaktif sensör dizisi birkaç temel sensör elemanından oluşan entegre bir sistemdir ve her sensör, insan dilindeki reseptör hücreleri gibi birçok analite çoklu cevap verir. Ardından, çeşitli duyarlı sinyaller toplanır ve her analitin sonuçlarını yansıtan parmak izi haritasına erişmek için işlenir (Chen et al., 2020). Bu tip sensörler farklı tip analitlerin veya karışımların analizi için o analitlere seçici sensörlere ihtiyaç duymadan analize imkân verebilmesi gibi bir avantaja sahiptirler. Ayrıca daha kolay sentez, bilinmeyen analitler için bilgi sunması ve çok bileşenli analitler için kolayca uygulanması gibi

avantajları olsa da çok düşük konsantrasyonlarda analiz yapamaması, daha fazla veri ile zaman alan analiz süresi ve çok sayıda sensör kullanılması gibi dezavantajları vardır.

1.5.1. Optik Sensörler

Işığın analitle etkileşime girmesi sonucu optik özelliklerin değişmesiyle üretilen optik sinyalin elektrik sinyaline dönüşmesini sağlayan sensörlerdir (Sevilla & Narayanaswamy, 2003; Wencel vd., 2014). Genellikle ölçülen optik özellikler floresans, absorpsiyon, sönmülenme süresi ve ışık saçılımı ve polarizasyonudur (Wencel vd., 2014). Optik sensörler, fiziksel ve kimyasal özelliklerin belirlenmesi, bağlanma kinetiğinin bulunması ve moleküller yapıların aydınlatılmasında kullanılabilir (Luchansky & Bailey, 2012). Ayrıca, biyomedikal, otomotiv gibi birçok endüstriyel uygulamalarda kullanılmaktadır (Aleksic, 2019). Kolay otomasyon ve minyatürleştirme özelliği sayesinde, elektronik cihazlarla entegre edilebilir ve çip üzerinde laboratuvar sistemleri kurmak için kullanılabilir (Pizzoferrato, 2023). Kimyasal ve biyolojik uygulamalarda tercih edilen sensörler Raman spektroskopisi, floresans ve SERS gibi çeşitli spektroskopik yöntemlerden yararlanmıştır (Pan vd., 2013).

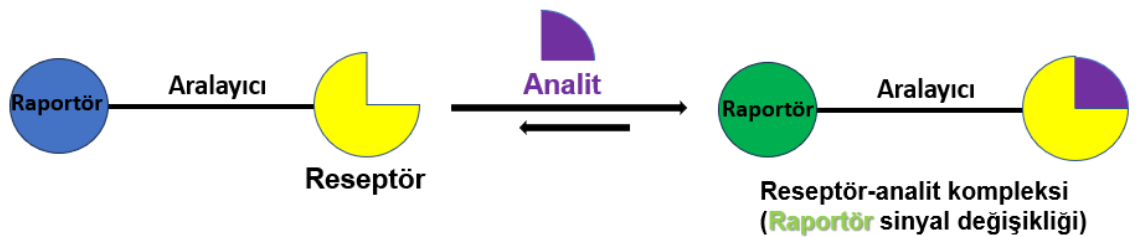
Malzemelerin fotokimyasal özelliklerinden yararlanılarak optik sensörlerde kullanılmak üzere yenilikçi malzemeler geliştirilmektedir. Altın veya gümüş nanopartiküllerin yüzey plazmon rezonansının uyarılmasıyla optik sensörlerde kullanılan yeni bir strateji ortaya çıkmıştır. Güncel bir çalışmada gümüş sitrat kaplı nanopartiküllerle morfinin çıplak gözle kolorimetrik tayini yapılmıştır (Rohani Bastami vd., 2022). Düşük ve yüksek güçlü ultrasonik ışınlama ile nanopartikül sentezi yapılmış, nanopartiküllerin 5 dakikadan az süreyle toplanmasıyla göz ile görülebilen renk değişikliği ortaya çıkmıştır. Morfin konsantrasyonu arttıkça açık sarıdan kahverengiye dönen renk değişimi elde edilmiştir. Düşük ultrasonik ışıma ile morfin tayin sınırı 0.055 µg/mL olarak bulunurken yüksek ışıma ile 0.100 µg/mL bulunmuştur. Bu basit ve yeşil kimya kuralları göz önüne alınarak sentezlenen malzemeyle, hızlı algılayan, göz ile tespit edilebilen, düşük maliyetli ve seçici bir sensör geliştirilmiştir. Metal-organik çerçeve (MOF), geniş ve ayarlanabilir gözenekleri sebebiyle geliştirilen diğer bir yenilikçi malzemedir ve NH₂-MIL-101 (Fe) ise toksik olmayan bu malzemelerden biridir. 2023 yılında yapılan bir çalışmada, NH₂-MIL-101 (Fe)'yi çerçeveleyen amino tetiklenmesiyle büyüyen AuNP uydusu olarak isimlendirilen SERS substratı geliştirilmiştir (X. Li vd., 2023). Sentezlenen bu malzeme Raman sinyalini artırırken, gözenekli özellikleri sayesinde fentanil adsorpsiyonu sağlamaktadır. Bu çalışma, MOF kullanımıyla yenilik katmakla birlikte fentanil'in karmaşık matriks ortamlarında bile tayinini sağlamaktadır. İlk defa opioid analitleri için su ve idrarda analiz yapan floresans sensörler 2017 yılında Anzenbacher grubu tarafından

geliştirilmiştir (Shcherbakova vd., 2017). Modifiye edilmiş asiklik kükürbiturillerin (aCB'ler) içerisindeki hidrofobik boşluğa eroin, oksikodon ve morfin ve bunların metabolitlerinin bağlanmasıyla floresans cevaplarında değişiklik olmuş ve 3 sensörlü dizi sensör ile ilaçların tespiti yapılmıştır.

Optik sensör tabanlı giyilebilir cihazlar sağlık teknolojisi alanında da kullanılmaya başlamıştır. Kan basıncı, oksijen doygunluğu, sıcaklık, uyku kalitesi ve kalp atışı gibi parametreler belirlenebilmektedir (S. Mehta & Sharma, 2023). Bu cihazların kullanılmasıyla, özellikle yaşlı insanlar ve doktorlar arasında köprü görevi alarak veri paylaşımını kolaylaştırmaktadır. Elde edilen çoklu veriler, yeni cihaz geliştirmek, hastalıkların farklı belirtilerinin ortaya çıkarılması ve hızlı müdahale edilmesi gibi avantajları vardır. Yerinde uygulamaya izin veren çipli sensör tasarımlarıyla optik sensörler her geçen gün gelişmektedir. Ayrıca, optik sinyal üretebilmek için çeşitli floresans etiketler geliştirilmektedir. Bunlar, kuantum noktalar, floresans proteinler, organik sentezlenen çok çeşitli fonksiyonel gruba sahip boya ve florofor gruplarıdır (Pan vd., 2013). Uzun süreli kullanıma olanak sağlayan, karmaşık kimyasal ve biyolojik ortamlarda bile hassas ve yüksek seçiciliğe sahip optik sensör geliştirmek hedeflenmektedir. Moleküler algılamada genel olarak iki tür yaklaşım vardır. Bunlar, doğrudan algılama (direct sensing) ve indikatör yer değiştirme algılaması (indicator displacement assay).

1.5.1.1. Doğrudan Algılama

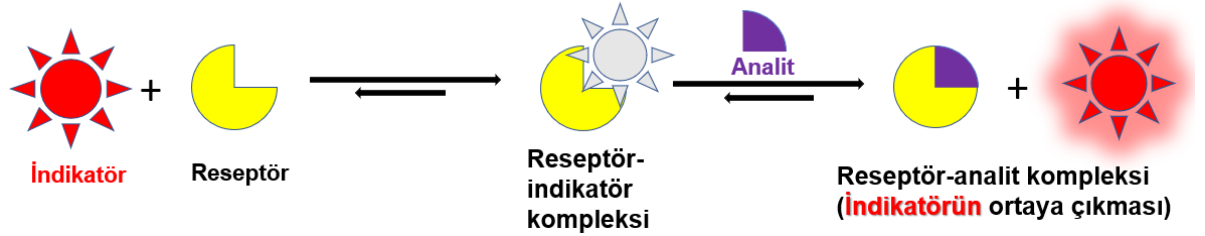
Doğrudan algılama yaklaşımında, analit reseptöre doğrudan bağlanır ve bu durum sinyal değişikliğine sebep olur. Bu sistem, reseptör-aralayıcı-raportör şeklinde 3 kısımdan oluşur (Şekil 1.4.). Reseptör, raportör ile aralayıcı sayesinde kovalent olarak bağlanmıştır ve analit ile reseptör bağlandığında sinyal değişikliği ortaya çıkar. Doğrudan algılamanın kökeni “anahtar-kilit” ilişkisine dayanmaktadır. Enzimlerin aktif kısımları reseptöre, substratlar ise analite benzetilerek seçici bağlanma sağlanabilmektedir. Fakat, sentetik reseptörler kullanılarak bu seçiciliği sağlamak çok daha zordur (You vd., 2015).



Şekil 1.4. Doğrudan algılama şematik gösterim

1.5.1.2. İndikatör Yer Değiştirme Analizi

İndikatör yer değiştirme analizi (IDA), sentetik reseptörü bir optik sensöre dönüştürmek için kullanılan popüler bir yöntemdir (Duan vd., 2023). Şekil 1.5.'te gösterildiği üzere ilk olarak, indikatör reseptöre geri dönüşümlü olarak bağlanır ve ardından rekabetçi analit, reseptöre bağlanarak indikatör salınır ve optik sinyalde değişiklik olması beklenir. Bu sistemde temel prensip, indikatör ile reseptör arasındaki afinitenin, analit ve reseptör arasındaki afinite ile karşılaştırılabilir olmasıdır (Nguyen & Anslyn, 2006). Eğer indikatör floresans özellik gösterirse floresans indikatör yer değiştirmesi olarak adlandırılır. İndikatör, reseptöre (konak) moleküller arası bağlar hidrojen bağı, π - π istiflenmesi ve etkileşimleri, elektrostatik etkileşimler, anyon- π etkileşimler, hidrofobik etkileşimler, koordinat bağlanması ve solvent sistemine bağlı etkileşimlerle bağlanabilir (Rather & Ali, 2021).

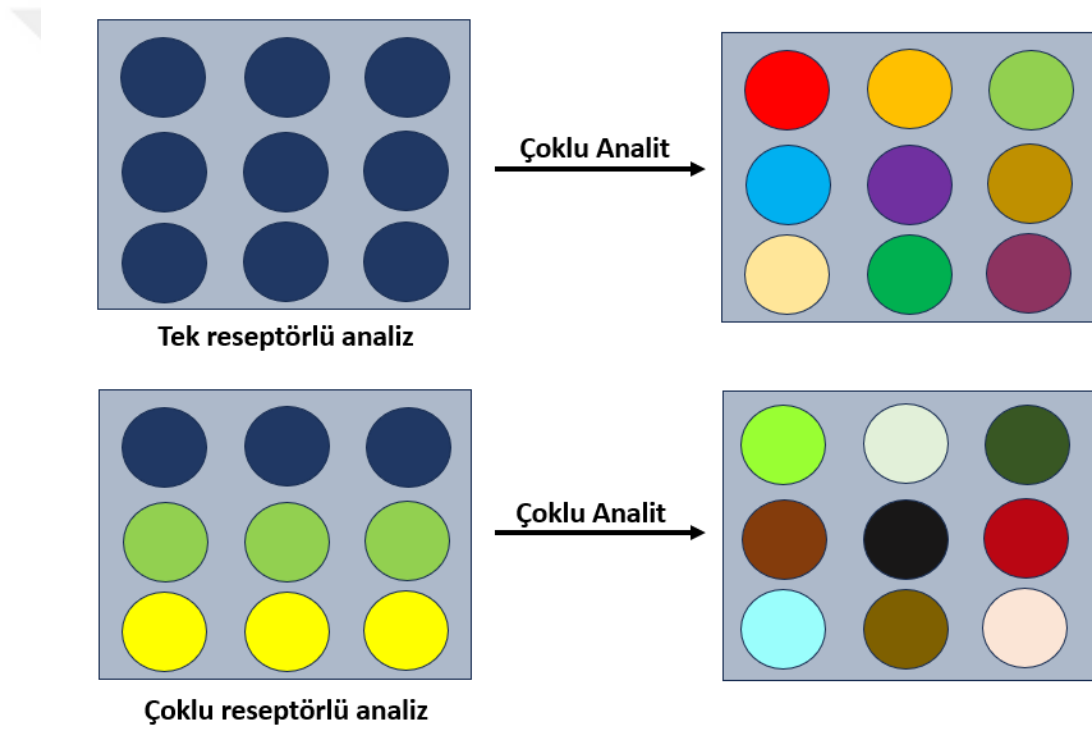


Şekil 1.5. İndikatör yer değiştirme algılaması

Bu yöntemin geleneksel ve eski bir yaklaşım olan direk bağlanma yöntemine göre bazı avantajları vardır. Reseptör ve indikatör arasında kovalent bağı olmadığı için, birkaç farklı indikatörler reseptöre bağlanabilir. Geliştirilen sensörler hem organik hem de sulu ortamda iyi çalışır ve farklı reseptörlere ve analizlere uyarlanır (Nguyen & Anslyn, 2006). Optik sinyal üretimi, ışıkla indüklenen elektron transferi (PET), floresans rezonans enerji transferi (FRET), elektronik enerji transferi (EET), iyonik değişiklikler, pH değişikliği gibi mekanizmalarla gerçekleşebilir (Nguyen & Anslyn, 2006). İndikatör yer değişikliği ise indikatör ile reseptörün bağlanma şekline (metal kompleksleşme, indikatörün flüoresans özellik göstermesine (flüoresans), indikatörün renk değişikliği göstermesine (kolorimetrik), reaksiyon temelli ve molekül içi bağlanmalarına göre isimlendirilebilir. IDA yöntemi, kiral moleküller, karbonhidratlar, diol ve fosfat bazlı malzemeler, nükleik asitler, aminoasit, peptit ve protein analizi için kullanılabilir (Sedgwick vd., 2021).

İndikatör yer değiştirme mekanizması çevresel ve biyolojik analitlerin tespitinin yanı sıra, algılayıcı dizilim (sensor array) ile karışım içerisindeki çeşitli analitlerin tespitine ve

bilinmeyen analitlerin bulunmasına yardımcı olur (Rather & Ali, 2021). Oluşturulan reseptör dizisinin analite verdiği diferansiyel algılamaya “dizi algılama” denir (You vd., 2015). Şekil 1.6’da gösterildiği gibi tek bir reseptör kullanılarak veya çoklu reseptör kullanılarak analiz yapılabilir. Memelilerin dil ve burun sensörlerine benzetilerek yapılan bu algılamada, oluşturulan dizideki her bir reseptör birden fazla analiti algılayabilir fakat her birine farklı oranlarda cevap verebilir. Elde edilen analite özgü karakteristik parmak iziyle çoklu analitler veya kompleks karışımlar içerisinde analizi kolaylaştırır. Seçicilik açısından yetersiz olsa bile diferansiyel algılama sayesinde analitlerin tayini ve kompleks karışımların ayırımına olanak sağlar. Dizi algılaması, direkt sensörlerden ziyade indikatör yer değiştirme algılaması için daha uygundur. Çünkü, IDA ile birden fazla reseptör kullanılarak dizi oluşturmak çok daha kolaydır (You vd., 2015).



Şekil 1.6. Tek veya çoklu reseptör analizi

1.5.1.3. Sentetik Reseptör

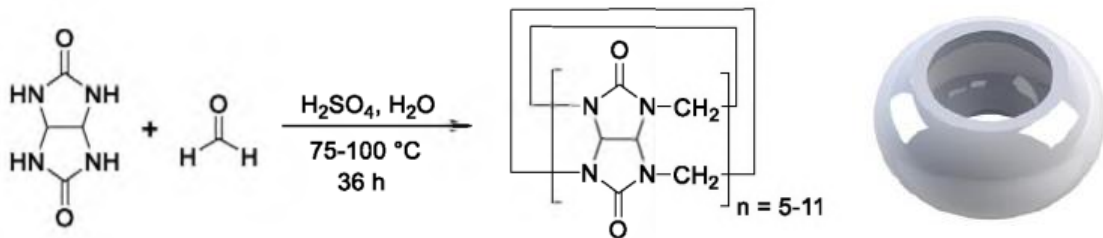
Optik sensörlerde, analitin bağlandığı kısım reseptördür. Enzim-substrat, antikor-antijen ilişkisi düşünülerek tek bir analit için bir reseptör dizayn edilebilirken, moleküller arası bağlar, moleküllerin boyutu, elektron alışverişi ve ortamın pH'ına göre de çoklu reseptör dizaynı da yapılabilir. Reseptör dizayn edilirken analitin ve raportörün fiziksel ve kimyasal özellikleri düşünülmelidir. Geleneksel eski bir yaklaşım olarak kullanılan biyolojik reseptörler

(enzim, nükleik asit, antikör ve protein reseptörlerin) yanı sıra biyomimetik tanıma elementleri (MIP, peptitler, nanozimler, peptit nükleik asitleri (PNA'lar), kilitli nükleik asitler (LNA'lar)) kullanılmaktadır (Moreno-Bondi & Benito-Peña, 2021). Organik moleküller, aptamerler, nanopartiküller, inorganik moleküller, sentetik oligomer, dendrimerler ve polimerik materyaller sentetik reseptör olarak farmakolojik uygulamalarda, ilaç tayininde, biyoloji ve kimya alanında önemli olan birçok anyon ve katyon tespiti için kullanılabilir (Mishra vd., 2023; Peck & Smith, 2015; Sadelain, 2016; Warriner & Namvar, 2011).

1.5.1.4. Kükürbitüriller ve Optik Sensörlerde Kullanımı

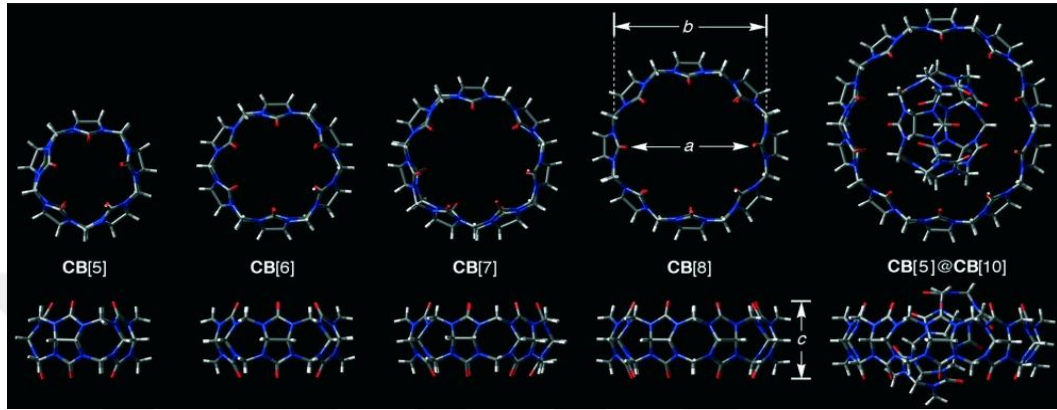
1987 Nobel kimya ödülü, “yapıya özgü etkileşimi yüksek seçicilik gösteren moleküller geliştirmeleri ve kullanmalarından dolayı” çalışmalarından dolayı J.-M. Lehn, D. J. Cram ve C. J. Pedersen’a verilmiştir. Bu ödül supramoleküler kimyanın önemini vurgulamaktadır ve o yıldan itibaren çok çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Supramoleküler kimya, kovalent olmayan etkileşimlerle yeni kimyasal yapıların oluşumu ve yapı taşları olarak isimlendirilen konukçu-konak molekülleri arası etkileşimleri inceler (You vd., 2015). Konukçu (reseptör), konuk (analit) olarak adlandırılabilir ve genel olarak hidrojen bağı, hidrofobik etkileşimler, π - π istiflenmesi ve etkileşimleri ve Van der Waals kuvvet etkileşimleri ile bağlanır. Konukçu ve konak arasındaki elektronik tamamlayıcılık iyi bir seçicilik için temel unsurlardan biridir. Konukçular bu özellikten dolayı katyon, anyon ve nötr konuk bağlayıcı olarak sınıflandırılabilir. Taç eterler, heterokronlar, heterokriptanlar, kaliksarenler, kement eterler ve kükürbitüriller konukçu olarak kullanılan organik moleküllerdir.

Kükürbitüriller CB[n], ilk kez 1905 yılında Robert Behrend tarafından glikolürlü ve formaldehit karışımının asitle katalize edilmesinin sonucunda elde edilen kabak şekilline benzeyen makrosikliklerdir (Lagona vd., 2005) (Şekil 1.7.).



Şekil 1.7. Kükürbitüril sentezi

Daha sonrasında geliştirilen sentez ve izole etme metotlarıyla reaksiyon sonucunda oluşan ürünler CB[5], CB[6], CB[7], CB[8] ve bazı oligomerler saf bir şekilde elde edilmiştir (Masson vd., 2012). Reaksiyon sonucunda oluşan ürünler glikoluril birim sayısına göre adlandırılır ve her birinin fiziksel özellikleri farklıdır. Şekil 1.8. ve Çizelge 1.6’da CB[n]’lerin X-Ray kristal şekilleri ve her birinin şekilsel özellikleri gösterilmiştir.



Şekil 1.8. CB[n]’lerin X-Ray kristal şekilleri (Lagona vd., 2005)

Kükürbitüriller, en olarak genişlemelerine rağmen yükseklikleri değişmez. Her bir glikoluril sayısı arttıkça, molekül ağırlığı, iç boşluk çapı ve hacmi ve portal çapı artar. Kükürbitürillerin en büyük dezavantajı suda çözünürlüklerinin düşük olmasıdır. Tek sayıda glikoluril grubuna sahip CB[5] ve CB[7]’nin suda çözünürlüğü (~20-30 mM) daha fazla iken çift sayıda olanların CB[6] (0.018 mM) ve CB[8]’in (< 0.010 mM) suda çözünürlüğü daha azdır (Buschmann vd., 2001; Lee vd., 2003).

Çizelge 1.6. CB[n]’lerin fiziksel özellikleri

CB[n]	Molekül Ağırlığı(g/mol)	Portal Çapı (Å) (b)	Boşluk Çapı (Å) (a)	Yükseklik (Å) (c)	Boşluk Hacmi (Å)
CB[5]	830	2.4	4.4	9.1	82
CB[6]	996	3.9	5.8	9.1	164
CB[7]	1163	5.4	7.3	9.1	279
CB[8]	1329	6.9	8.8	9.1	479
CB[10]	1661	9.5-10.6	11.3-12.4	9.1	870

CB’lerin uç kısımlarında hidrofilik karbonil grubu ve içerisinde hidrofobik boşluğu vardır. Dipolar ve elektronegatif olan karbonil grubuna katyonlar iyon-dipol etkileşimleriyle bağlanırken, glikoluril birimlerinin çevrenmesiyle oluşan makrosiklik yapının iç kısmı

erişilemez ve yalnızca hidrofobik moleküller etkileşime girer (Barrow vd., 2015). CB'ler iyonik ve hidrofobik etkileşimlere sahip olduğu için, çeşitli konak moleküllerine ev sahipliği yapabilirler. Bu konak analitlerden bazıları, adamantanlar, bisiklooktanlar, naftalen, viyolojen, stilben, karboran, ilaçlar (Benzimidazol, Albendazol, Carbendazim, Lansoprazol, Oksaliplatin), metabolitler, amino asitler ve dipeptitlerdir (L. Cao vd., 2013; Koner vd., 2011; Lagona vd., 2005; C.-F. Li vd., 2010; Saleh vd., 2008; Zhao vd., 2008). CB'lerin iç hacimlerinin değişiklik göstermesi, analitlerin büyüklüğüne göre seçici olmaları ve çok farklı fonksiyonel gruplu ve boyuttaki analitlerle etkileşime girmesi sebebiyle son yıllarda ilaç dağıtımı, molekül algılama ve sensör sistemleri, yapay moleküler makine sistemi geliştirme ve moleküler anahtar gibi çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır (Aryal vd., 2018; Hoyas Pérez & Lewis, 2020; Tuncel & Katterle, 2008; Walker vd., 2011).

CB temelli konukçu-konak kompleksleri floresans prob olarak biyoloji, çevre bilimleri ve biyomedikal uygulamalarda kullanılmaktadır (Aryal et al., 2019). 2018 yılında yapılan bir çalışmada, suda çözünen, iki tane katyonik perilen boyası tasarlanmış ve sentezlenmiş, CB[8] ile 10^6 gibi güçlü bağlanma sabitiyle kompleks oluşturmuş ve bağımlılık yapıcı ilaçların idrarda tahlilinde prob olarak kullanılmıştır (Aryal vd., 2018). Sentezlenen boyaların su içerisinde agregasyona uğramalarıyla floresans yoğunlukları düşmektedir fakat CB[8] ile kompleks oluşturduğunda floresans yoğunluğu 10 katına çıkmakta, 150 nm'lik Stokes kayması ve 600-800 nm'de kırmızı NIR emisyonu gözlemlenmiştir. CB[8] ile katyonik perilen boyası arasında güçlü bir elektrostatik etkileşim ve hidrofobik etkileşimler vardır. Oluşturulan bu kompleks, yer değiştirme mekanizmasıyla fensiklidin, kokain, metadon ve fenazopiridin'in idrarda analizi için kullanılmıştır ve 4 farklı ilaca farklı oranda bağlanmıştır.

Bir diğer optik sensör uygulaması ise, CB[7] ve berberin hidroklorür (BBH) kullanılarak oluşturulan kompleks, metamfetamin (METH)'in sulu ve idrar çözeltisinde tayin etmek için kullanılmıştır (DU et al., 2023). BBH'nin sulu çözeltisi zayıf floresans etkisine sahipken, CB[7] ile kompleks oluşturduğunda molekül hareketlerinin sınırlandırılmasından dolayı fotoluminesans yoğunluğu artmıştır. Fakat kompleks ortamına METH eklendiği zaman, CB[7] ve METH güçlü bir bağ oluşturur ve BBH tekrar zayıf floresans etkisine geri döner. BBH'nin flüoresans etkisinin azalmasıyla, METH'in sulu çözeltisinde tespit limiti 30.7 nM, idrar çözeltisinde ise 65.2 nM olarak bulunmuştur.

Yeni yapılan bir çalışmada ise indikatör yer değiştirme mekanizmasıyla palmatin (PAL) ve CB[8], kompleks oluşturarak büyük hayvanlarda ağrı kesici olarak kullanılan

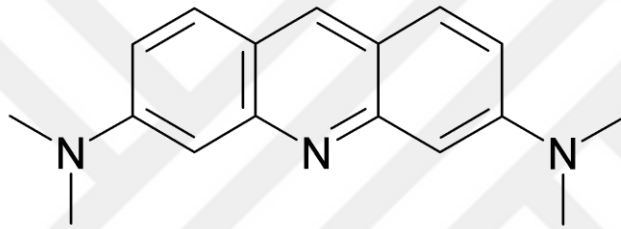
ketamin'in biyolojik ortamlarda tespiti yapılmıştır (Yan vd., 2022). CB[8]'in içerisine 2 tane emisyon özelliği göstermeyen PAL molekülünün dimerleşerek yerleşmesiyle, agregasyon kaynaklı emisyon özelliği göstererek fotoluminesansı artar. Kompleks yapının üzerine ketamin eklenmesiyle, PAL ile CB[8]'in yapısının bozulmasına ve ketamin'in CB[8] ile bağlanarak, serbest PAL salınımına yol açarak floresansın düşmesine neden olur. Floresans titrasyonu ile ketamin tayin limiti 5.0 ng/mL ve doğrusal aralığı 16.8-500 ng/mL bulunmuştur. Geliştirilen sensör, diğer bağımlılık yapıcı opioidlerden kokain, eroin, fentanil ve metamfetamin'e karşı cevap göstermeyerek seçici olduğunu ispatlamıştır.

1.5.1.5. Tez Kapsamında Kullanılan Floresan Boyalar

Geliştirilen indikatör yer değiştirme mekanizmalı optik sensör sistemlerinde kullanılan boyalar en önemli parametrelerden biridir. Bu sensörlerde, floresans boya analitlere verdiği cevaplara göre turn on (açılma) veya turn off (kapanma) olarak isimlendirilebilir. Açılma sisteminde, öncelikle konukçu ile boya etkileşimi sonucu boyanın emisyon özelliği sönümlenir, sonrasında ortama yarışmacı analit eklendiğinde konukçu ile analit etkileşime girer ve boya serbest kalarak emisyon yapar böylece açılma elde edilir. Kapanma sisteminde tam tersi olarak, boyanın emisyon özelliği azalır. Geliştirilen sensörlerde kullanılacak boya, kuantum verimlerinin yüksek, mümkün olduğunca kısalması bölgeye yakın emisyon değerine sahip, hidrofilik, biyouyumlu, çevre dostu ve kapsamlı konjugasyona sahip olmaları beklenmektedir (Yan vd., 2022). İstenilen fotokimyasal özelliklere sahip boya dizayn etmek yenilikçi ve zor bir süreçtir. Günümüzde supramoleküler kimyada organik sentetik boyaları prob olarak optik sensörlerde kullanmak oldukça yaygınlaşmıştır. Kullanılan bu boyalardan bazıları, BODIPY, FURA, azo boyalar, karbazoller, rodaminler ve tiyofen boyalarıdır (Ziarani vd., 2018). Her bir boyanın kendine özgü fotokimyasal özellikleri olduğundan; ışıkla indüklenen elektron transferi (PET), molekül içi yük transferi (ICT), Förster rezonans enerji transferi (FRET), toplanma kaynaklı emisyon (AIE) ve kümelenmenin tetiklediği emisyon (CTE) vardır (Aryal vd., 2019; Yan vd., 2022). Son zamanlarda, literatürde bulunmayan yenilikçi organik sentez boya, kuantum noktalar, inorganik ve organometalik lantanit kompleksli boyalar popülerlik kazanmıştır (You vd., 2015). Bu tez kapsamında akrinin turuncusu, akrinin sarısı ticari ürünleri, sentez ürünü piridin kumarin boyası, floresans prob olarak kullanılmıştır.

1.5.1.5.1. Akridin Turuncusu

Akridin Turuncusu (AT), diğer bir ismiyle 3,6-Akridinediamin Şekil 1.9.'da gösterilen nükleik asitlerin ayırt edilmesi için kullanılan bir boyadır. Hücrelerde bu boyanın kullanılmasıyla DNA yeşil floresans verirken, RNA kırmızı renkli floresans verir ve ayırımı kolay ve hızlı şekilde yapılabilir (BRADLEY, 1965). Yapılan bir çalışmada ise, kafeinin akridin turuncusunun DNA enterkalasyonunu engellediği ortaya çıkmıştır (Lyles & Cameron, 2002). AT, çözücü sistemlerinin fotokimyasal özelliklerini anlamak için floresans prob ve kompleks biyolojik yapıların aydınlatılması için biyolojik prob olarak kullanılmıştır (Shaikh vd., 2008). Hücre boyama özelliğinin yanı sıra fotodinamik terapide uygulaması vardır (Schmidt vd., 1981).

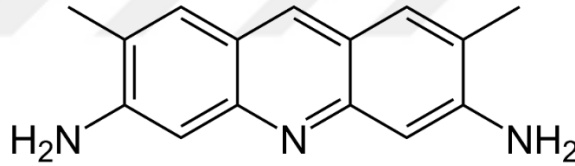


Şekil 1.9. Akridin Turuncusu

AT ve CB'ler kullanılarak konukçu-konak ilişkisi temelli kompleks yapılar oluşturulmuştur. 2009 yılında yapılan bir çalışmada CB[7], CB[8] ve akridin turuncusu ile oluşturulan bu kompleks yapı hücre zarını geçebildiği ve ilaç taşıma sistemlerinde kullanılabileceğini göstermiştir (Montes-Navajas vd., 2009). Floresans titrasyonu sonucunda AT ve CB[7] 1:1 oranında bağlanma sabiti (K_a) $8.7 \pm 0.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ve AT ve CB[8] 2:1 oranında K_a $5.2 \pm 0.4 \times 10^{13} \text{ M}^{-2}$ bulunmuştur. Konuk moleküllerin prototropik dengesinin konukçu molekül ile oluşturduğu kompleks yapıya göre değişiklik gösterdiği ve bu özelliğin tıp, biyoloji ve kimya uygulamalarında kullanılabileceği bulunmuştur (Shaikh et al., 2008). AT'nin nötr ve katyonik formundan dolayı CB[7] ile oluşturduğu kompleks yapıda pK_a kayması olduğu bulunmuştur. İki farklı konukçu molekül CB[7] ve β -siklodekstrin (β -CD) ile AT boyası kompleks oluşturmakta, CB[7] ile pK_a 2.6 birim artarak katyonik AT bağlanırken, β -CD ile pK_a 0.7 birim azalarak nötr AT bağlanmıştır. Bir diğer CB[7] ve AT boyası ile oluşturulan sensör, çevresel atık olan organofosfat esterleri tarafından baskılanan enzim aktivitesi belirlemiştir (Wang vd., 2014). AT boyası üzerine CB[7] eklendikçe floresans özelliği artmaktadır, ortama kadaverin ilavesiyle komplekste yer değiştirme olmuş ve floresans özelliği azalarak enzim inhibisyonu belirlenmiştir.

1.5.1.5.2. Akridin Sarısı

Akridin sarısı (AS) IUPAC ismiyle, 2,7-Dimetilakridin-3,6-diamin Şekil 1.10.'da gösterilen yeşil-mavi renkte floresans veren bir boyadır. Akridin sarısının naylon kumaşlar üzerinde foto-indüklenen antimikrobiyal özellikleri incelenmiş virüs ve bakterileri etkisiz hale getirdiği bulunmuştur (Alihosseini & Sun, 2011). DNA ile etkileşime girdiği bulunmuş ve fotodinamik tedavi edici ilaç çalışmalarında kullanılmıştır (Fritsch vd., 1998; Long vd., 2007). 2011 yılında yapılan bir çalışmada CB[7] ve AS konukçu-konak etkileşimleri spektroskopik ve kolorimetrik çalışmalarla incelenmiştir (Chakraborty & Basu, 2011). Bu çalışmayla oluşturulan komplekste iyon-dipol etkileşimleri ve hidrojen bağ oluşturma özellikleri incelenmiştir. Konukçu-konak etkileşiminin termodinamiğini anlamak için izotermal titrasyon kalorimetrisi kullanılmıştır. Proton NMR çalışmasıyla CB[7]-AS 1:2 oranında bağlandığı bulunmuştur. Floresans titrasyon sonucunda AS üzerine CB[7] eklendikçe floresans yoğunluğu artmıştır. Bu durum, AS molekül içi hareketleri kısıtlanarak ışımsız bozunmayı (non-radiative decay) yavaşlatır ve floresans yoğunluğunu artırır. Floresans anizotropi deneyleri sonucunda ise AS ve CB7 kompleks oluşturmasıyla, çevre tarafından AS'ye uygulanan hareket kısıtlamasının etkisi ortaya çıkmaktadır.



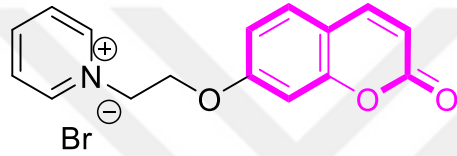
Şekil 1.10. Akridin Sarısı

1.5.1.5.3. Piridin Kumarin

Kumarin, çoğunlukla koku bileşeni olarak deterjan, sabun ve parfümlerde kullanılan benzo-a-piron bileşiğidir (Carlton, 2005). Kumarinlerin antimikrobiyal, antiviral, antidiyabetik ve antioksidan gibi biyolojik özellikleri vardır ve lenfödem tedavisinde ve venöz dolaşımın iyileştirilmesine yönelik kullanılırlar (Carlton, 2005; Poumale vd., 2013). Kumarin boyaları ve alkilamino grulu kumarinlerin çözücü polaritesine bağlı kuantum verimleri, Stoke kayması ve uyarılmış halinin dipol moment değişikliği gibi çeşitli optik özellikleri vardır (Barooah vd., 2012). Bu özelliklerinin konukçu-konak kompleks yapılarında kullanılmasıyla molekül içi yük transferleriyle boyanın emisyon özelliğinde değişiklikler meydana gelir. Kumarin ve çeşitli fonksiyonel grulu kumarinlerin CB'ler ile oluşturduğu

kompleks yapıları, teorik kimya, floresans, NMR ve kütle spektroskopisi ile incelenmiştir (Aliaga vd., 2015; Barooah vd., 2012; Park vd., 2013; R. Wang vd., 2009).

Bu tez çalışmasında, literatürde bulunmayan, CB'ler ile kompleks yapı oluşturabilecek, kumarin temelli floresan boya piridin kumarin (PK) sentezlenmiş ve prob olarak kullanılmıştır. Şekil 1.11'de gösterilen PK sentezi iki aşamadan oluşmaktadır (Bae vd., 2017; Q.-W. Zhang vd., 2016). İlk önce hidroksikumarin bileşiği brominasyonu ve sonrasında bu bileşiğe süstitüsyon reaksiyonu ile piridin eklenmesidir. Başarılı şekilde sentezlenen PK, proton ve karbon NMR ile karakterize edilmiş, optik özellikleri incelenmiş ve CB[7] ve CB[8] ile kompleks yapı oluşturarak sensor olarak 4 farklı opioid ilaçların analizi için kullanılmıştır.



Şekil 1.11. Piridin Kumarin

1.5.2. Elektrokimyasal Sensörler

Elektrokimyasal sensörler, analit ile reseptör arasındaki elektrokimyasal reaksiyondan açığa çıkan cevabı elektrik sinyali olarak üretirler (Lin vd., 2023). Elektrokimyasal sensörlerin düşük maliyet, basitlik, hızlı yanıt verme performansı, taşınabilirlik, yüksek kesinlik ve seçicilik gibi avantajları vardır (Chugh vd., 2022; Yence vd., 2022). Bu avantajları sayesinde, tarımda, ilaç analizlerinde, toksik gaz analizlerinde, viral ve tropik hastalık tanısında, gıda analizlerinde ve çevresel atıkların izlemesinde kullanılabilir (Baranwal vd., 2022; Chugh vd., 2022; B. R. Mehta & Reddy, 2015; Pathakoti vd., 2018). Elektrokimyasal sensörlerde seçicilik, tekrar edilebilirlik ve hassasiyeti artırmak için nanomalzeme kullanımının önemli bir yeri vardır. Günümüzde, geniş yüzey alanı sağlayarak elektrot yüzey hassasiyetini arttıran nanopartiküller, metal-organik çerçeveler (MOF), grafen, nanofiberler ve iletken polimerler kullanılmaktadır (Baranwal vd., 2022).

1.5.2.1 Moleküler Baskılı Polimerler ve Opioid Tayininde Kullanımı

Moleküler baskılama teknolojisi, doğal sistemleri taklit edebilen anahtar-kilit ilişkisi temelinde antikor-antijen sistemlerine benzer sentetik yaklaşımdır (BelBruno, 2019; Vasapollo vd., 2011). Doğal sistemlerle karşılaştırıldığında sentetik malzemeler özel sıcaklık

ve saklama koşulları gerektirmez ve antikora göre daha ucuzdur (BelBruno, 2019). Antikor ve sentetik reseptörlere göre avantajları Çizelge 1.7.'de gösterilmiştir (Shimizu & Stephenson, 2010).

Çizelge 1.7. MIP'lerin antikor ve sentetik reseptörler ile karşılaştırılması

Özellikler	Antikor	Sentetik Moleküler Reseptör	MIPs
Hazırlanma süresi	3-6 ay	1-6 ay	1-7 gün
Ortalama bağlanma afinitesi	10^6 - 10^9	10^3 - 10^6	10^2 - 10^3
Ucuz maliyet	×	×	✓
Termal ve kimyasal stabilite	×	✓	✓

Ayrıca, kataliz, ilaç dağıtımı, saflaştırma ve ayırma, patojen, ilaç, patlayıcı, pestisit tespitinde ve kimyasal sensör olarak kullanılmaktadır (BelBruno, 2019; Vasapollo vd., 2011). Özellikle elektrokimyasal sensörlerde MIP kullanımıyla spesifik analit tanıma özelliğiyle seçicilik, hassasiyet, yüksek bağlanma kapasitesi ve çeşitli analit tespitinde kullanılabilirlik sağlamaktadır (Yence vd., 2023).

MIP ile kombine edilmiş karbon, gümüş, altın ve manyetik özellikli nanomalzemelerle ilaç tayini yapılabilmektedir. Yaygın kullanılan opioidlerden biri olan hızlı salınlı tramadol'un tayini için MIP sensör geliştirilmiştir (Diouf vd., 2021). Geliştirilen MIP sensörde altın elektrot yüzeyinde elektrokimyasal birikim yöntemiyle gümüş nanopartiküller ile kaplanmış bir poli-anilin katmanı elde edilmiştir. Sonrasında, fonksiyonel monomer olarak 2-aminotiyofenol ve hedef molekül tramadol varlığında polimerizasyon ile elektrokimyasal MIP sensör oluşturulmuş ve elektrokimyasal tekniklerle karakterize edilmiştir. 0.01–100 µg/mL doğrusal aralığında tayin sınırı 9.42 µg/mL olarak bulunmuştur. Parasetamol ve sitrik asit varlığında seçiciliği, tükürük ve idrarda uygulama alanları gösterilmiştir. Kemometrik yöntemlerle de gruplandırma ve ayırım yapılmıştır.

Yapılan bir diğer çalışmada ise farklı nanomalzemeler ve nano tabakalar ile tramadol'un tayini MIP elektrokimyasal sensör ile yapılmıştır (Bagheri vd., 2018). Karbon pasta nanokompozit malzemesi, gümüş nanopartiküller ile dekore edilmiş grafen, iyonik sıvı bis(triflorometilsülfonyl)imid ([BMP]Tf₂N) ve tramadol baskılı polimerik malzemedan

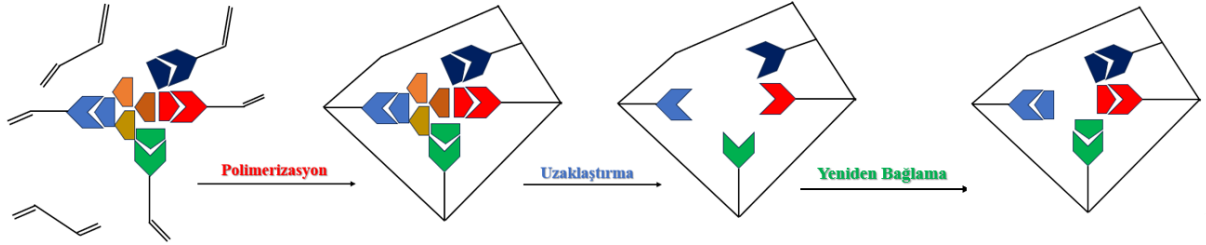
oluşmaktadır. Nanokompozit malzeme sentezi öncelikle grafen oksit sentezinin nano grafitlerden elde edilmesiyle başlar ve gümüş nanopartiküller ile dekore edilir, sonrasında tramadol baskılı polimer başlatıcı (AIBN) ve çapraz bağlayıcı (EDGMA) ile sentezlenir. Havan içerisinde grafit tozu, [BMP]Tf₂N, ve gümüş-nanografitin karıştırılmasıyla oluşan malzeme, karbon pasta elektrot malzemesi olarak kullanılmıştır. Bu malzemeler farklı oranlarda karıştırılarak elektrotlar hazırlanmış ve en iyi potansiyometrik cevap veren karışım oranı bulunmuştur. 3.50×10^{-9} - 1.00×10^{-2} M doğrusal aralığında tayin sınırı 2.04×10^{-9} M olarak bulunmuştur. Kullanım süresi, tekrar kullanılabilirlik, seçicilik ve stabilite gibi analitik performanslar incelenmiş ve tablet ve idrarda uygulaması yapılmıştır.

Geliştirilen MIP sensörlerin iletkenlik özelliğini artırmak için karbon malzemeler kullanılmaktadır. Fakat kullanılan bu malzemeler yan reaksiyonlara girerek, baskılamayı azaltabilir. Bu sebepten nano karbon malzemelerin yüzeyinde elektro polimerizasyon yapılabilir, Segatelli araştırma grubu çok duvarlı karbon malzemenin (MWCNT) üzerinde moleküler olarak baskılı poli(akrilik asit) oluşturulmasıyla MIP-MWCNT voltametrik sensörü tramadol tayini için kullanmıştır (Ricardo Teixeira Tarley vd., 2020). MIP sentezi, akrilik asit (monomer), başlatıcı (AIBN) ve çapraz bağlayıcı (EDGMA)'nın sonikasyonu ve 60 °C de 1 gün bekletilmesiyle yapılmıştır. MWCNT ile farklı oranlarda karıştırılarak akım değerleri ölçülmüş ve 1:1 oranı en iyi değer olarak belirlenmiştir. 1:1 karışımdaki MIP-MWCNT karışımı elektrot yüzeyine damlatılmış ve geliştirilen sensör ile tramadol'un 1.4 µmol/L tayin sınırı elde edilmiştir. Geliştirilen bu metotta yöntemin doğruluğu HPLC-DAD ile hedef molekülün uzaklaştırılması ve geri kazanım analizleri karşılaştırılarak kontrol edilmiştir. Gün içi, günler arası analizler, seçicilik, interferans etkisi, farmakolojik örneklerde uygulaması yapılarak analitik performansı incelenmiştir.

1.5.2.2. Moleküler Baskılama Prosesi ve Bileşenleri

MIP oluşturma prosesi, analit (şablon, hedef molekül) ile monomer arasında kovalent veya kovalent olmayan bağlarla etkileşime girerek polimerik kompleks oluşturmasıyla başlar. Çeşitli polimerizasyon teknikleriyle polimerik ağ oluşturulduktan sonra hedef molekül polimerik kompleks yapıdan uzaklaştırılır ve analite özgü boyut ve şekilde boşluk oluşturulur. Bu boşluklu yapı analit içeren numuneye maruz bırakıldığında polimerik ağ analiti tanıyarak seçici olarak bağlanır. Kısaca polimerizasyon, uzaklaştırma ve yeniden bağlanma olarak 3 aşamadan oluşan proses Şekil 1.12'de gösterilmiştir (BelBruno, 2019; Vasapollo vd., 2011). Bu oluşturma prosesinde en önemli aşama polimerizasyon sırasında oluşan moleküller arası etkileşime bağlıdır. Polimerik komplekste etkileşimler ne kadar kuvvetliyse o kadar seçici

moleküler tanıma elde edilir. Polimerik kompleksi oluşturan bileşenler, hedef molekül ve monomer, çapraz bağlayıcı, başlatıcı, porojenik çözücüdür (Turiel & Esteban, 2020).



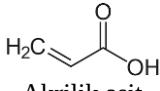
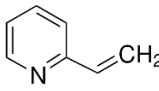
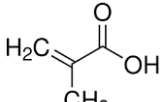
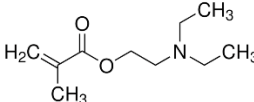
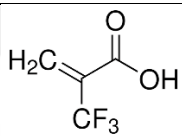
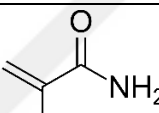
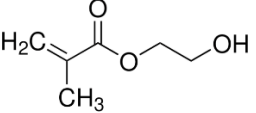
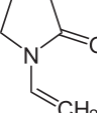
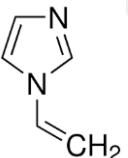
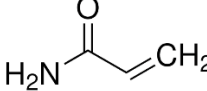
Şekil 1.12. MIP oluşturma prosesi

1.5.2.2.1. Hedef Molekül ve Monomer

Hedef molekül tayini yapılmak istenilen analittir, şablon olarak da adlandırılabilir. Monomer seçimi hedef molekülün fonksiyonel gruplarına göre yapılmalıdır. Polimerizasyon öncesi hedef molekül ve monomer arasında MIP’lerde en sık kullanılan kovalent olmayan etkileşimlerle hidrojen bağı, Van der Waals etkileşimleri ve iyonik etkileşimlerde bulunur. Bu etkileşimler ve fonksiyonel gruplar düşünülerek hedef molekül için spesifik boşluklar oluşturmak amacıyla monomer seçimi yapılmalıdır. En çok kullanılan ve farklı fonksiyonel gruplar içeren monomerler Çizelge 1.8’de gösterilmiştir. Çeşitli fonksiyonel grup içeren monomerler: heteroaromatik bazlar (vinilpiridin, vinilimidazol), amidler (metakrilamid, akrilamid), karboksilik asitler (akrilik asit, metakrilik asit, 2-(triflorometil)akrilik asit) ve sülfonik asitlerdir (2-akrilamido-2-metilpropan sülfonik asit) (Vasapollo vd., 2011). Farklı fonksiyonel grupların asidik veya bazik, hidrojen bağ donör veya alıcı olma özellikleri vardır. Hidrojen alıcı özellikli piridine ve karboksilik asit grupları, hidrojen verebilecek asidik gruplarla etkileşime girebilir. Örneğin, asidik gruplar içeren hedef moleküller, bazik özellik gösteren monomerler (4-vinilpiridin, dietilaminoetilmetakrilat) ile etkileşime girerken, bazik özellik gösteren hedef moleküller asidik monomerler (metakrilik asit, akrilik asit) ile etkileşir (Turiel & Esteban, 2020). Metakrilik asit, hidrojen bağ donör ve alıcı özelliği göstermesi sebebiyle yaygın kullanılırken, metakrilamid de donör ve alıcı olması sebebiyle karboksilik asitler ve amidler için seçici bağlanma yapabilir (Vasapollo vd., 2011). Çeşitli yeni fonksiyonel grupları içeren monomerler ve bağlanmayı güçlendirecek bağlar metal koordinasyonlu gibi ve hesaplamalı kimya yöntemiyle doğru mesafeye bağlanacak monomerler geliştirilmektedir. Ayrıca, hedef molekül ve monomer oranı optimize edilmesi

gereken en önemli parametrelerden biridir. Genellikle, monomer oranı hedef molekül oranından fazla olmalıdır bu sayede stabilite sağlanarak istenilen baskılama etkisine ulaşılabilir (Turiel & Esteban, 2020).

Çizelge 1.8. En sık kullanılan çeşitli fonksiyonel grup içeren monomerler

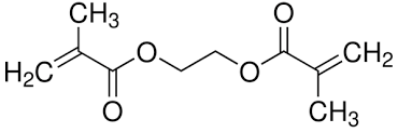
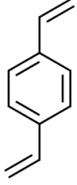
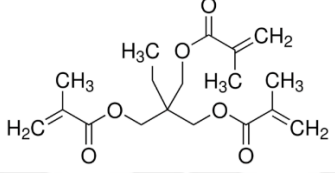
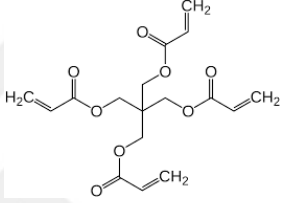
 Akrilik asit	 2-vinilpiridin
 Metakrilik asit	 2-(Dietilamino)etil metakrilat
 2-(triflorometil)akrilik asit	 Metakrilamid
 Hidroksietil metakrilat	 N-Vinilpirolidon
 1-Vinilimidazol	 Akrilamid

1.5.2.2.2. Çapraz Bağlayıcılar

Çapraz bağlayıcılar, polimerizasyon sırasında hedef molekül-monomer kompleks stabilitesini sağlamak, polimerik ağın morfolojisini kontrol etmede ve polimer gözenekliliğini arttırmak için kullanılır (BelBruno, 2019; Turiel & Esteban, 2020). Polimerik yapıda bağlanma bölgelerini stabilize ederek ve molekül yapısını koruyarak mekanik sağlamlık sağlar (Vasapollo vd., 2011). Çizelge 1.9’da gösterildiği üzere en sık kullanılan çapraz bağlayıcılar etilen glikol dimetakrilat (EGDMA), Divinilbenzen (DVB) ve Trimetilolpropan trimetakrilat (TRIM)’dir. EGDMA, mekanik ve termal stabilite, iyi ıslama birlik ve hızlı kütle transferi sağladığı için en fazla kullanılan çapraz bağlayıcılardandır. DVB ve TRIM benzer özellik göstererek çeşitli uygulamalarda kullanılmıştır (Turiel & Esteban, 2020). Fakat, TRIM

EGDMA'ya göre daha fazla sertlik, yapı düzeni ve etkili bağlanma bölgeleri sağlayabilir (Vasapollo vd., 2011). Polimerik yapının bağlanma özelliğini artırarak, spesifik olmayan bağlanmaları önler ve analitin spesifik bir şekilde polimerik yapı tarafından tanınmasını sağlar.

Çizelge 1.9. En sık kullanılan çapraz bağlayıcılar

 Etilen glikol dimetakrilat (EGDMA)	 Divinilbenzen (DVB)
 Trimetilolpropan trimetakrilat (TRIM)	 Pentaeritritol tetraakrilat

1.5.2.2.3. Porojenik Çözücü

Çözücülerin polarite özellikleri ve polimerizasyonda kullanılan hacimleri moleküler baskılamada önemli bir faktördür. Çözücü polimerik yapının oluşturulmasında kullanılan tüm bileşenleri bir araya getirir, gözenekli yapıların ve spesifik alanın oluşturulmasından sorumludur (Turiel & Esteban, 2020; Vasapollo vd., 2011). Porojenik çözücü olarak adlandırılmasında polimerik yapının boşluklarını genişletmesi ve akış sağlaması için büyük gözenek oluşturulmasından gelmektedir (Vasapollo vd., 2011). Polimerik yapı kovalent olmayan etkileşimlerle oluşturulduğu için, çözücünden gelen herhangi bir hidrojen bağı veya iyonik etkileşimden etkilenip yapısı bozulabilir. Polar veya protik çözücüler su, metanol ve asetonitril gibi hidrojen bağı yapma özelliğine sahip olduğu için çok fazla tercih edilmez. Genellikle düşük polariteye sahip toluen veya kloroform gibi çözücüler tercih edilir (Vasapollo et al., 2011). Doğru çözücü seçimiyle, polimerik yapıdaki etkileşimler bozulmaz, geniş gözenek ve yüzey alanı sağlanır. Böylece, gözenekli yapıya analitin difüzyonu hızlı olarak seçici bağlanmayı kolaylaştırır.

1.5.2.2.4. Başlatıcı

Polimer sentezi için çeşitli yöntemler bulunmaktadır, bunlardan bazıları serbest radikal polimerizasyonu, serbest radikal kopolimerizasyonu ve çapraz bağlı polimerlerdir. Endüstride birçok plastik üretiminde en sık kullanılan yöntem serbest radikal polimerizasyonudur. Serbest radikal polimerizasyonu üç farklı basamaktan oluşur: başlatma, yayılma ve sonlandırma (Cormack & Elorza, 2004). Çok hızlı gerçekleşen serbest radikal kopolimerizasyonu başlatıcı etkisiyle fotokimyasal veya termal yöntemlerle başlayabilir. Azobis izobütironitril (AIBN) ve azobis dimetil valeronitril (ADVN) en sık kullanılan başlatıcılardandır. Bu başlatıcılar serbest radikal polimerizasyonunda radikal kaynağı olarak rol alırlar. Bir başlatıcının radikallere dönüşme hızı ve şekli, kimyasal yapısına bağlı olarak ısı, ışık ve kimyasal/elektrokimyasal yollarla başlatılabilir. Örneğin, AIBN fotoliz (UV) veya termoliz yoluyla karbon merkezli radikaller üreterek vinil monomerlerin büyümesini başlatabilir (Cormack & Elorza, 2004). Polimer sentezinde kullanılan başlatıcılar, polimerizasyon süresini hızlandırarak sabit, dayanıklı polimerik ağ kurmada yardımcı olurlar. Polimer sentezinde kullanılan bileşenlerin özelliklerine örneğin sıcaklık veya ışık hassasiyetine göre başlatıcılar seçilmelidir.

1.5.2.3. Tez Kapsamında Kullanılan MIP Yöntemi ve Bileşenleri

Polimerizasyon kontrolünü sağlamak, olası yan ürünlerini engellemek ve stabil polimerik ağ oluşturabilmek için kullanılan MIP bileşenleri ve polimer sentez yöntemi önemlidir. MIP'ler çoğunlukla fotokimyasal, termal, elektrokimyasal veya redoksle başlatılan radikal zincir reaksiyonu ile sentezlenebilir. Elektrokimyasal yöntemler, elektron alışverişini sağlayabilecek monomerler anilin, pirol ve dopamin gibi kullanılarak elektrot yüzeyinde polimerik filmin biriktirilmesiyle oluşur. Redoks, fotokimyasal ve termal yöntemlerde radikaller oluşturarak polimerizasyon başlatılır, her birinin kendine özgü kullanılan başlatıcıları ve ortam koşulları sayesinde polimerik film oluşturulur (Paruli vd., 2021).

Tez kapsamında ve sıklıkla kullanılan yöntemlerden birisi fotokimyasal polimerizasyondur. Bu yöntem öncelikle foto başlatıcıların ayrışması, radikal oluşması, monomerlerin bir araya gelmesi ve polimerik zincirin oluşturulmasıyla tamamlanır (Brighenti vd., 2021). Radikal foto başlatıcılar genellikle aromatik karbonil bileşenler asetofenon türevleri, benzoin türevleri, benzilketallerdir. Azobisizobütironitril (AIBN) termal başlatıcı olarak kullanılabildiği gibi foto başlatıcı olarak da kullanılabilir. Bu başlatıcılar, uyarılmış

tekli durumlarından sistemler arası geçişe izin vererek bağ ayrılmasıyla radikal oluşturarak monomerlerin polimerizasyonunu tetikler (Paruli et al., 2021). Tez içeriğinde kullanılan foto başlatıcı karbonil grubu bileşenlerinden 2-hidroksi-2-metilpropiofenon, benzoil ve 2-hidroksil-2-propil iki serbest radikalın oluşumu, sonrasında benzoil radikali ve monomer arasındaki reaksiyon ve çapraz bağlı polimerik ağı oluşturmaya yardımcı olur (Al nuumani vd., 2018).

Çapraz bağlayıcılarla oluşturulan polimerik ağ, gözenek oluşturu malzemeler kullanılarak hedef molekülün baskılı polimerik yapıda tanınmasına kolaylık sağlar. Tez çalışmasında, gözenek yapıcı malzeme olan çinko oksit (ZnO) nanopartikülleri, N-metakriloil-L-triptofan metil ester (MA-Trp) monomeri, etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) ve hidroksietil metakrilat (HEMA) varlığında kopolimerizasyon elde edilmiştir. ZnO nanopartikülleri, polimerizasyon süresince kontrollü baskılama sağlayarak asitle aşındırma işlemi sonrasında gözenekli yapılar sağlayarak ve tanıma bölgeleri sağlar (Yence vd., 2023). MA-Trp monomeri ile HEMA veya EGDMA kullanılarak polimer elde edilen ve çeşitli analitlerin tayininde kullanılan birçok çalışma bulunmaktadır (Demir vd., 2020; Osman vd., 2013; Perçin et vd., 2013). Amino asit bazlı MA-Trp monomeri hidrojen bağı yapma özelliğine sahiptir ve HEMA veya EGDMA'nın alken (çifte bağ) sayesinde polimerleştirilebilir. Camsı karbon elektrot (CKE) yüzeyinde MA-Trp monomeri ile hazırlanan sensör kısaca MA-Trp@MIP/CKE olarak adlandırılmıştır. Tez çalışmasında kullanılan bu MIP bileşenleri ve foto polimerizasyon yöntemiyle yüksek sıcaklık uygulamadan sadece ışık kontrolüyle stabil, güçlü bağlarla gözenekli polimerik ağ oluşturulmuştur.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tez deneylerinde kullanılan Çizelge 2.1.'de gösterilen kimyasal maddeler saflaştırma işlemi uygulanmadan analitik saflıkta kullanılmıştır.

Çizelge 2.1. Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal madde	Saflık Derecesi (%)	Firma
Kodein sülfat		Türkiye Toprak Ürünleri Ofisi
Metadon hidroklorür	>98	Sigma-Aldrich
Oksikodon hidroklorür		Sigma-Aldrich
Dekstrometorfan hidrobromür		Sigma-Aldrich
Akridin Turuncusu hemi(çinko klorür) tuzu	85	Sigma-Aldrich
Akridin Sarısı G	90	Sigma-Aldrich
Asetonitril	≥99.9	Merck
Etanol	≥99.9	Merck
Metanol	≥99.9	Merck
Asetik asit	≥99	Sigma-Aldrich
Soydum hidroksit	>97	Sigma-Aldrich
Hidroklorik asit	%37	Merck
Çinko oksit (ZnO)	80	Merck
Potasyum ferrisiyanür ($K_4[Fe(CN)_6]$)	≥99.0	Merck
Potasyum ferrisiyanür ($K_3[Fe(CN)_6]$)	≥98.5	Merck
Magnezyum klorür	≥98.0	Sigma-Aldrich
Sodyum sülfat	≥99.0	Merck
Dopamin		Alfa-Aesar
2-hidroksi-2-metilpropiofenon	≥97.0	Sigma-Aldrich
Askorbik asit		Sigma-Aldrich
Dimetil sülfoksit	≥99	Merck
2-hidroksietil metakrilat	≥99	Sigma-Aldrich
Etilen glikol dimetakrilat	≥98	Sigma-Aldrich
Potasyum klorür	≥99	Merck
Ürik asit	≥99	Sigma-Aldrich
Parasetamol	≥97	Sigma-Aldrich
Asetik asit	≥99.7	Merck
$CDCl_3$ NMR çözücü	≥99.8	Merck
DMSO NMR çözücü	≥99.8	Merck
D_2O NMR çözücü	≥99.8	Merck
7-hidroksilkumarin	99	Merck
Potasyum karbonat	≥99	Merck
Magnezyum sülfat		Merck
Piridine	≥99.8	Merck
CB[7], CB[8]	100	Sigma-Aldrich

2.2. Deneylerde Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar

Tez deneylerinde kullanılan cihazlar ve ekipmanları Çizelge 2.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Deneyisel çalışmalarda kullanılan cihaz ve diğer ekipmanlar

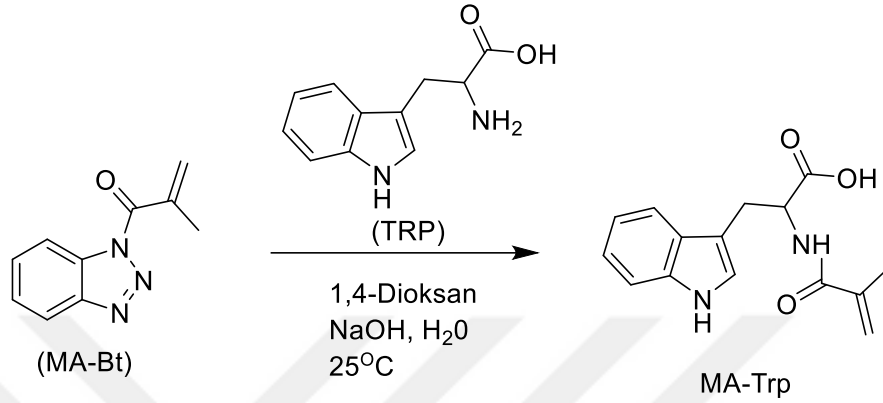
Cihaz	Marka – Model
Hassas terazi	Ohaus Instruments (Shangai, China)
Ultra saf su cihazı	PURELAB Option-Q (ELGA LabWater, Birleşik Krallık)
pH metre	Mettler-Toledo pH/ion S220 pH meter (Switzerland).
Termal çalkalayıcı	Thermo-Shaker (Biosan TS-100)
Farklı hacimlerde kapaklı cam balon jojeler	ISOLAB Laborgeräte GmbH (Eschau, Almanya)
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)
Tek foton sayma spektrofotometresi	Edinburg Analytical Instrument (FL/FS 920)
10 mm yol uzunluğuna sahip kare kuvars küvetler	
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 mikro pipetler ve uygun pipet uçları	Eppendorf AG (Almanya)/ ISOLAB Laborgeräte GmbH (Eschau, Almanya)
Çift ışıklı UV-görünür spektrofotometre	Hitachi U-3010 (Tokyo, Japonya)
Potansiyostat – Galvanostat sistemi	Metrohm Autolab PGSTAT 128N
Elektrot hücre standı	BASi® - C3
Çalışma elektrodu (CKE, 3 mm çap)	BASi® - MF 2012
Karşılaştırma elektrodu (Ag/AgCl)	BASi® - MF 2052
Yardımcı elektrot (Pt tel, 7,5 cm)	BASi® - MW 1032
Parlatma – cilalama seti	BASi® - MF 2060
Cam hücre	BASi® - MR 1208
NMR Cihazı	Brüker Spektrometre (500 MHz)
TLC plakaları	Merck

2.3. Malzeme Sentezi

2.3.1. Fonksiyonel Monomer (MA-Trp) Sentezi

MIP temelli elektrokimyasal sensör kısmında kullanılan amino asit bazlı fonksiyonel monomer (MA-Trp), Hür ve arkadaşları tarafından kullanılan metot ile sentezlenmiştir (Hur vd., 2007). Şekil 2.1.'de gösterilen sentezde ilk olarak L-Triptofan (Trp) (5.52 mmol), sulu bir NaOH (1.0 M) çözeltisi içerisinde çözüldü. 25 mL 1,4 dioksan içerisindeki metakriloil

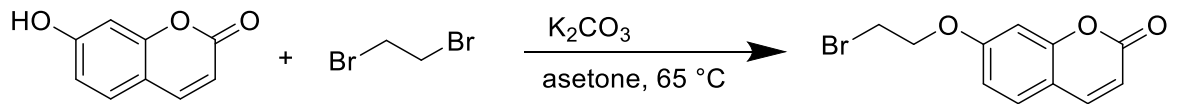
benzotriazol (MA-Bt), L-triptofan çözeltisi ortamına yavaş yavaş ilave edildi. Reaksiyon bitiminde çözücü 1,4-dioksan ortamdandan vakumla buharlaştırıldı. Reaksiyon çözeltisinden MA-Bt'in uzaklaştırılması için üç kez etil asetatla ekstraksiyon yapıldıktan sonra etil asetat buharlaştırılıp MA-Trp monomeri saf şekilde elde edilmiştir.



Şekil 2.1. MA-Trp sentezi

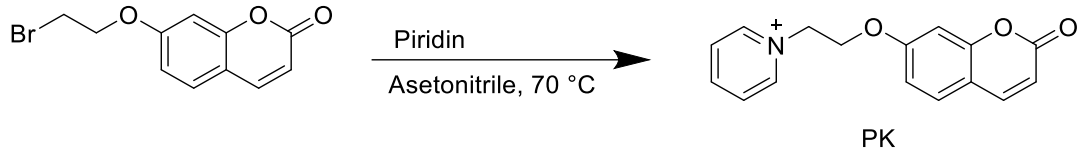
2.3.2. Floresan Boya PK Sentezi

Floresan piridin kumarin (PK) boyası sentezi iki aşamadan oluşmaktadır. İlk önce hidroksi kumarin bileşiği brominasyonu sonucu 7-(2-bromoetiloksi) kumarin sentezlenmiştir. Şekil 2.2'de gösterilen reaksiyonda, potasyum karbonat (859 mg, 6.17 mmol), 1,2-dibromoetan (2.5 mL, 30.84 mmol) ve 7-hidroksilkumarin (500 mg, 3.08 mmol) 15 mL aseton içerisinde çözüldü. 1 gün boyunca geri akışta tutulan reaksiyon sonucunda, potasyum karbonat süzüldükten sonra çözücü vakum ortamında uzaklaştırıldı. Diklorometan ve su ile 3 kere ekstraksiyon sonucunda, organik kısım magnezyum sülfat ile kurutularak çözücü vakum altında uzaklaştırıldı ve 7-(2-bromoetiloksi) kumarin (670 mg, %81 verim) elde edildi (Bae vd., 2017).



Şekil 2.2. 7-(2-bromoetiloksi) kumarin sentezi

İkinci aşama ise sentezlenen 7-(2-bromoetiloksi) kumarin bileşiğinden Br ayrılarak yerine piridin grubunun eklenmesidir (Şekil 2.3.). 7-(2-bromoetiloksi) kumarin (100 mg, 0.37 mmol) ve piridin (0.3 mL, 3.7 mmol) 5 mL asetonitril içerisinde çözüldü (Q.-W. Zhang vd., 2016). 70 °C, 12 saat boyunca geri akış ile argon altında karıştırıldı. Oda sıcaklığına soğutulan reaksiyon karışımı süzülerek beyaz katı PK bileşiği toplandı (206 mg, %53 verim).



Şekil 2.3. PK sentezi

2.4. Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

2.4.1. Opioid Çözeltilerinin Hazırlanması

Tez kapsamında kullanılan dört opioid maddesi kodein, metadon, oksikodon ve deksstrometorfanın 400 µM stok çözeltisi hazırlandı. Metadon ve oksikodon suda çözünürken, deksstrometorfan ve kodein metanolde çözüldü. Hazırlanan çözeltiler 4 °C buzdolabında saklandı. Oda sıcaklığına getirildikten sonra kullanıldı.

2.4.2. Boyaların ve CB Çözeltilerinin Hazırlanması

Ticari olarak alınan akridin sarısı, akridin turuncusu ve akridin kırmızısı 1 mM stok çözeltisi suda çözünerek hazırlandı. Sentezlenen PK ise 1 mM stok çözeltisi dimetil sülfoksit içerisinde hazırlandı. CB[7] 1 mM stok çözeltisi, CB[8] 20 µM stok çözeltisi suda çözüldükten sonra ısı tabancasıyla ısıtıldı ve sonikasyon uygulandı.

2.4.3. Optik Ölçüm Çözeltilerinin Hazırlanması

Optik sensörlerde floresans ve UV-VIS spektrometre kullanıldı. Floresans ölçümleri 2 mL çözeltide, UV-VIS ölçümleri ise 3 mL çözeltide alındı. PK kullanılan ölçümlerde % 2 metanol-su karışımı, akridin turuncusu ve sarısında % 100 sulu çözeltide UV ve floresans titrasyonları yapıldı.

2.4.4. Elektrokimyasal Ölçüm Çözeltilerinin Hazırlanması

Elektrokimyasal sensörler ölçüm çözeltisinde redoks probu olan 5.0 mM potasyum ferrisiyanür/ferrosiyanür ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$) çözeltisi kullanıldı. 10 mM potasyum ferrisiyanür ve potasyum ferrosiyanür maddeleri alınarak 0.1 M potasyum klorür içinde çözündü.

2.4.5. Tablet, Serum, İdrar ve Girişim Çözeltilerinin Hazırlanması

Tablet çözeltisi hazırlanması için apranax plus tableti kullanıldı, beş tablet tartılarak ortalama ağırlık hesaplandı, toz haline getirilerek 1 mM kodein çözeltisi metanolde hazırlandı. Sonikasyon ve filtreleme işlemleri sonrasında 5000 rpm 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süzöntü kısmından belli bir miktar alınarak metanolde seyreltildi ve ara stok çözeltileri hazırlandı. Saf ilaç etken maddeleri bilinen konsantrasyondaki ara stok çözeltilerine eklenerek geri kazanım çalışması yapılmıştır.

-20 °C dondurucuda saklanan ticari serum örneği oda sıcaklığına getirilerek çözöldü. Serum numune örneği toplamda 10 mL olacak şekilde, 1.0 mL 10 mM ilaç etken maddesi, 3.6 mL serum örneği ve 5.4 mL asetonitril içerisinde karıştırıldı, sonike edildi ve 5000 rpm 20 dakika santrifüj edildi. İdrar numune örneği serum çözeltisi gibi hazırlandı. Serum ve idrarda geri kazanım çalışmaları için bilinen konsantrasyonlarda saf ilaç etken maddeleri çözeltilere eklenerek yapıldı.

Kanda bulunan iyonik ve biyolojik maddelerin girişim etkilerini görmek amacıyla potasyum nitrat (KNO_3), sodyum sülfat (Na_2SO_4), magnezyum klorür (MgCl_2), dopamin (DOP), askorbik asit (AA) ve ürik asit (UA) 10 mM'lık stok çözeltileri ultra saf su kullanılarak hazırlandı.

2.5. Boyalar ve CB'ler ile Optik Sensörlerinin Hazırlanması

AY, AT ve PK ile CB[7] ve CB[8] kullanılarak optik sensörler oluşturuldu ve 4 farklı opioid analizi için kullanıldı. Bu analizlerde 1:1 konsantrasyon oranında boyalar ve CB'ler kullanıldı. 0.5 μM AY üzerine 0.5 μM CB[8] eklenerek, üzerlerine 4 farklı opioid çözeltisi farklı konsantrasyonlarda titrasyon doygunluk noktasına ulaşana kadar eklendi. Aynı işlem AT ve PK için de uygulandı. Dizi sensör çalışmasında, 0.5 μM AY, 0.5 μM AO, 1 μM CB[8] ve 5 μM analitler kullanıldı.

2.6. Elektrokimyasal MIP ve NIP Temelli Sensör Hazırlanması

MA-Trp@MIP/CKE olarak adlandırılan elektrokimyasal sensör hazırlanması öncelikle elektrot yüzeyinin metanol ve saf su çözeltisi (1:1, h/h) içerisinde 15 dakika sonikasyonu, alümina bulamacıyla cilalanması, suyla durulanması ve kurutulması sonrasında kullanıldı. Gözenekli polimerik film öncelikle 1:1 oranında KOD:ZnO çözeltisi 10 mL metanol içerisinde karıştırıldı, karışımdan 10 µL alındı ve 30 µL MA-Trp ile sonike edilerek karıştırıldı. HEMA: EGDMA (5:1 v/v, 100 µL) eklendi ve bir stok çözelti oluşturmak için 10 dakika karıştırıldı. Stok çözeltiden 10 µL alındı ve 1 µL 2-hidroksi-2-metil propiofenon ile karıştırılarak 1 dakika süreyle vortekslendi. Bu karışımdan 0.5 µL alınarak elektrot yüzeyine damlatıldı ve UV lambası (365 nm, 100 W) altında 5 dakika bekletilerek foto polimerizasyon işlemi uygulandı. ZnO partiküllerini uzaklaştırmak için 0.1 M HCl çözeltisiyle aşındırma işlemleri gerçekleştirildi. Etanol ve su ile yıkama sonrasında reaksiyona girmemiş monomerler ortamdan uzaklaştırıldı. Bu işlemler sonunda MIP bazlı elektrotlar oluşturuldu. Polimerik kompleks yapıda boşlukları oluşturmak için elektrot, 20 dakika boyunca çalkalayıcıdaki (650 rpm, 25 °C) 10 M asetik asit çözeltisine daldırıldı ve uzaklaştırma işlemi yapıldı. Hedef molekül kodein'in yeniden bağlanması için elektrot, bir çalkalayıcıda (650 rpm, 25 °C) 20 dakika boyunca bilinen KOD konsantrasyonunda inkübe edildi. NIP sensörü oluşturmak için MIP için uygulanan prosedürün aynısı KOD eklenmeden uygulandı.

2.7. Optik Yöntemler

Geliştirilen optik sensörlerde kullanılan UV-VIS spektroskopisinde 200-800 nm arasında orta hızda tarama yapıldı. Her bir boya için UV-VIS titrasyon sonucunda elde edilen izosbestik noktalar kullanılarak floresans titrasyonları yapıldı. Floresan spektroskopisinde PK boyası için 319 nm uyarma dalga boyu slit aralığı 0.1 nm, 406 nm emisyon dalga boyu slit aralığı 2.0 nm 350-600 nm aralığında 2 nm stepli ölçüm alındı. AS boyası için 440 nm uyarma dalga boyu slit aralığı 0.02 nm, 445 nm emisyon dalga boyu slit aralığı 0.02 nm 450-700 nm aralığında 2 nm stepli ölçüm alındı. AT boyası için 490 nm uyarma dalga boyu slit aralığı 0.02 nm, 495 nm emisyon dalga boyu slit aralığı 0.02 nm 480-730 nm aralığında 2 nm stepli ölçüm alındı. Dizi sensör çalışmasında 96'lık mikropiçin her analit için her sensörde 8 kuyucuk kullanıldı. LDA çalışması için AS boyası için 470-570 nm arası, AT boyası için 520-640 nm arası seçilerek sınıflandırma yapıldı.

2.8. Elektrokimyasal Yöntemler

Geliştirilen elektrokimyasal MIP sensörün karakterizasyonu ve analitik performansının değerlendirilmesi için dönüşümlü voltametri (DV), diferansiyel puls voltametri (DPV) ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) teknikleri kullanıldı. Bu tekniklerde 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ çözeltisi kullanılmıştır. DV yönteminde -0.2 V ile 0.6 V aralığında kalibrasyon grafikleri çizildi.

2.9. Karakterizasyon Yöntemleri

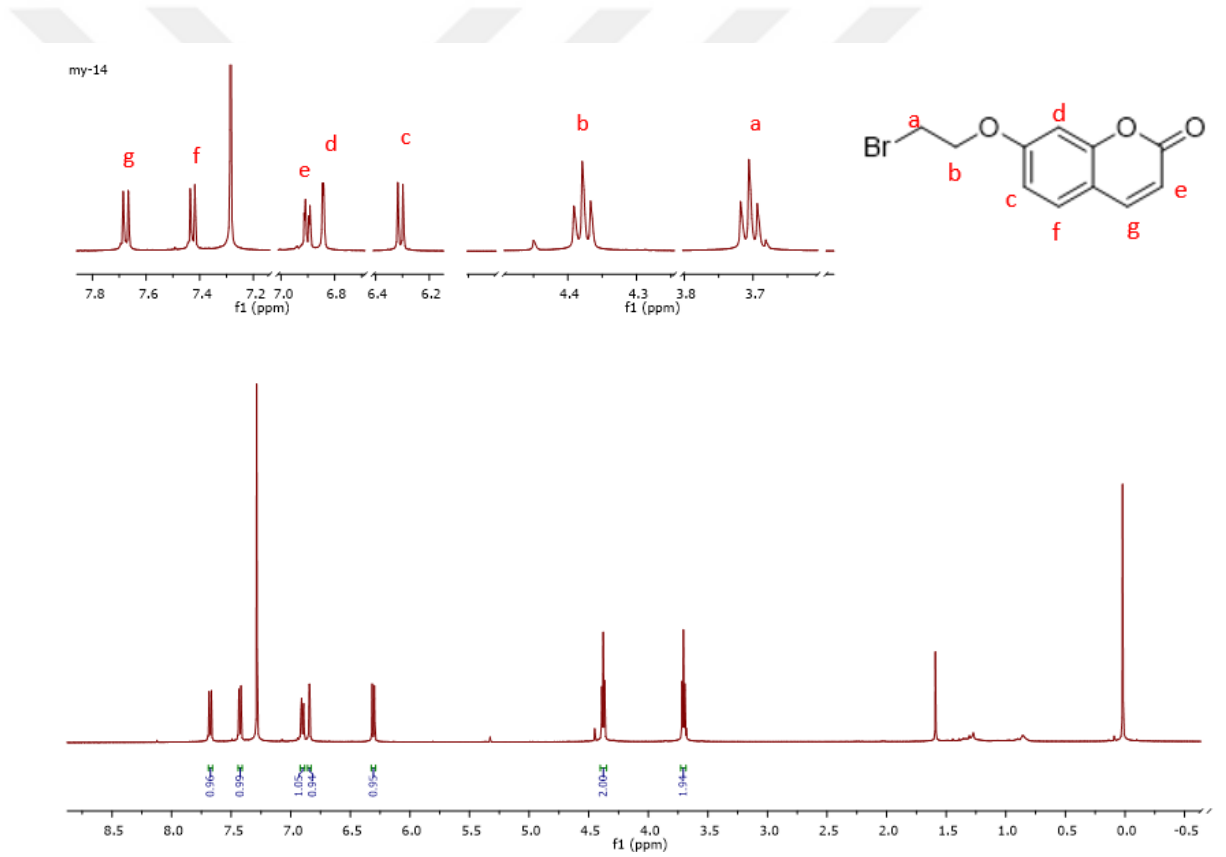
Elektrokimyasal karakterizasyon yöntemlerin (EIS, DV) yanı sıra yüzey morfolojisini incelemek amacıyla taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ve polimerik filmin fonksiyonel gruplarını detaylandırmak için Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) kullanıldı. Sentezlenen boya PK proton ve karbon analizi için ise NMR spektroskopisi kullanıldı.

3. BULGULAR

3.1. Optik Sensör Bulguları

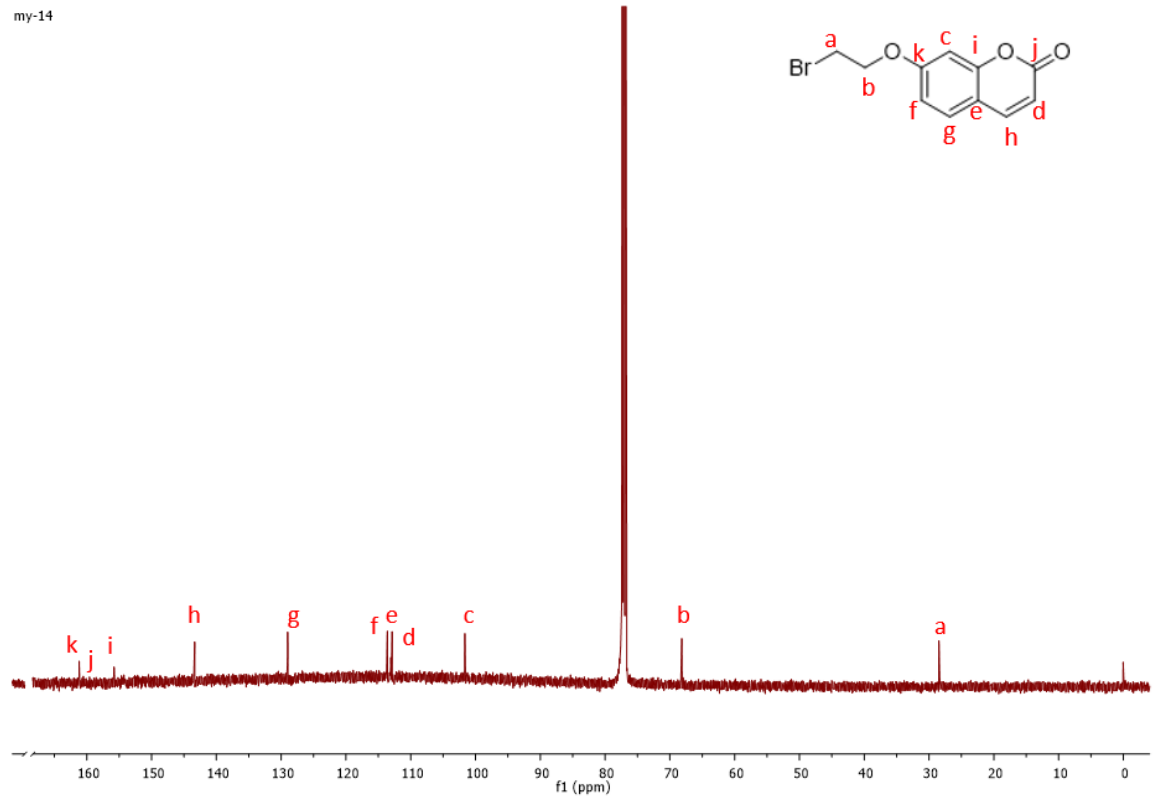
3.1.1. PK Boyasının NMR Bulguları

PK boyasının ara basamağı olan 7-(2-bromoetiloksi) kumarin bileşiğinin Proton (^1H) NMR Şekil 3.1 ve karbon (^{13}C) NMR Şekil 3.2’de gösterilmiştir. PK boyası ^1H NMR Şekil 3.3 ve ^{13}C NMR Şekil 3.4’te gösterilmiştir.

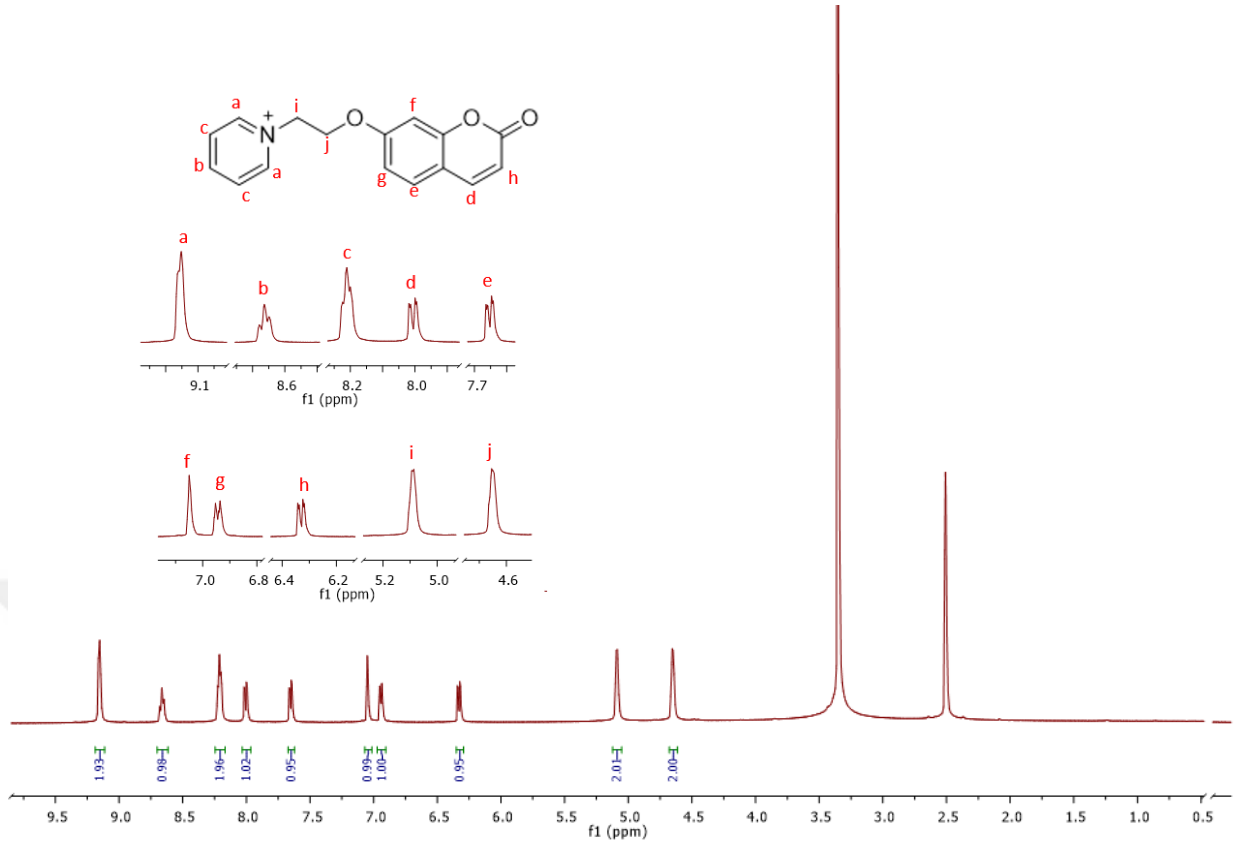


Şekil 3.1. 7-(2-bromoetiloksi) kumarin bileşiği ^1H NMR

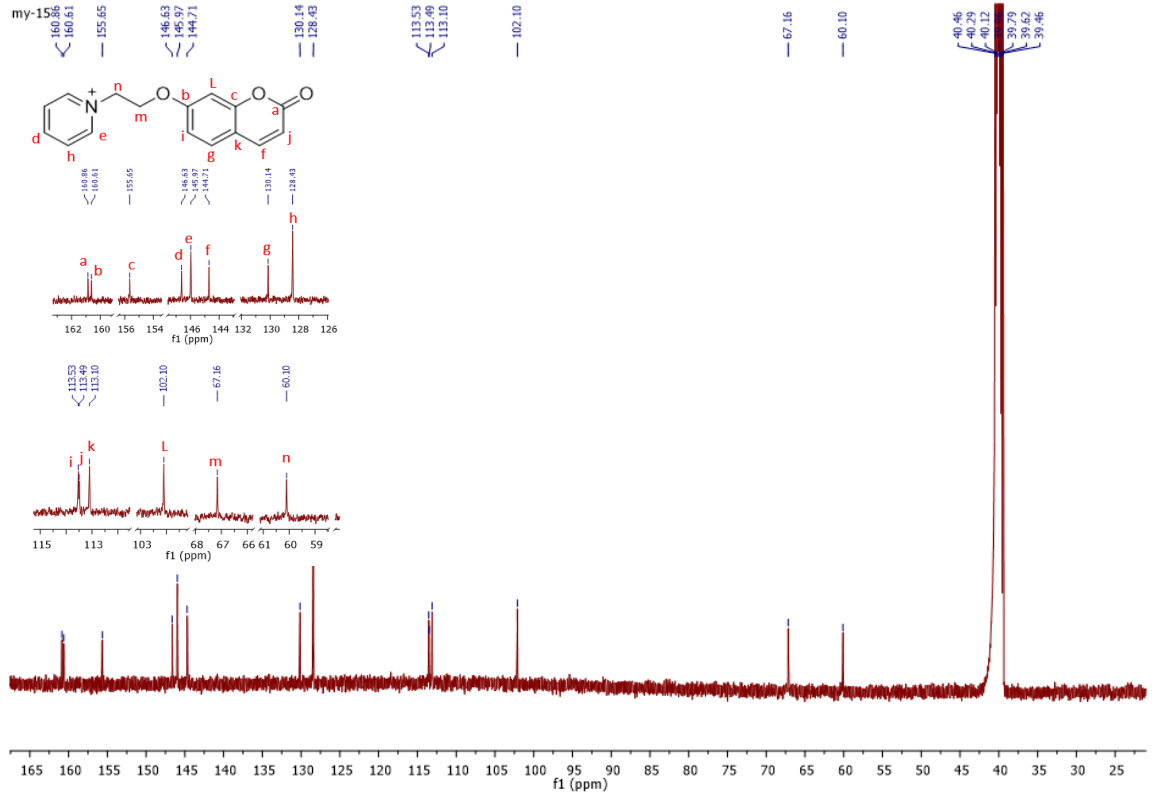
my-14



Şekil 3.2. 7-(2-bromoetiloksi) kumarin bileşiği ^{13}C NMR



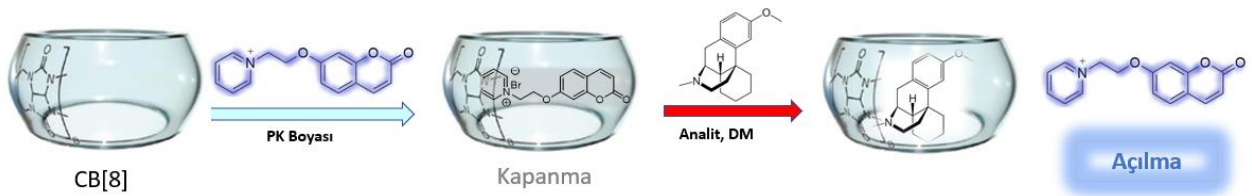
Şekil 3.3. PK bileşiği ^1H NMR



Şekil 3.4. PK bileşiği ¹³C NMR

3.1.2. PK Boyasının Optik Sensörlerde Kullanımı

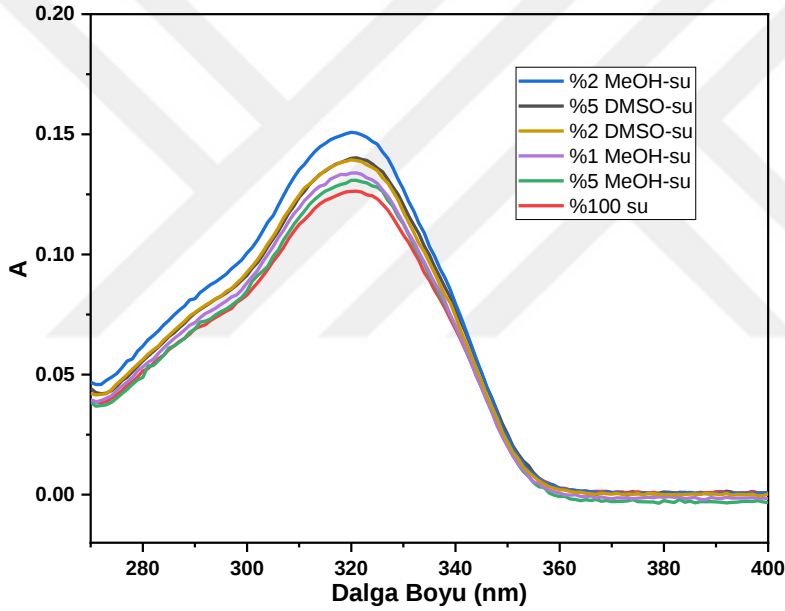
İndikatör yer değiştirme mekanizmasıyla öncelikli olarak CB'lerin içerisine boyaların girmesi (kapanma, boyanın sönümlenmesi) sonrasında daha güçlü bağlanacak olan analitlerin varlığında boya ile analitin yer değiştirerek boyaların salınması (açılma, boyanın açığa çıkması) beklenmektedir. Geliştirilen optik sensörlerde PK, AS ve AT boyaları kullanılarak bu mekanizma çalışmış ve şematik gösterimi Şekil 3.5'te gösterilmiştir.



Şekil 3.5. Geliştirilen optik sensörlerin şematik gösterimi

3.1.2.1. PK Boyasının Farklı Çözücüler İçerisinde Absorbans Ölçümü

Piridin kumarin boyası, bildiğimiz kadarıyla literatürde bulunmayan ilk defa tez kapsamında sentezlenen bir maddedir. Bu sebepten, optik özellikleri uyarılma noktası, farklı çözücü ortamı ve pH değerlerinde absorbans değerleri incelenmiştir. PK boyasının 6 farklı çözücü ortamında absorbans değerleri ölçülmüştür. Bunlar %2 MeOH-su, %5 DMSO-su, %2 DMSO-su, %1 MeOH-su, %5 MeOH-su ve %100 su ortamıdır. Şekil 3.6'da gösterildiği gibi 6 farklı çözücünün absorbans yoğunluğu arasında çok büyük bir farklılık yoktur. Birbirine yakın bu sonuçlar arasında en yüksek absorbans yoğunluk değeri %2 MeOH-su ortamına aittir ve maksimum absorbansı 326 nm olarak bulunmuştur. PK boyasına ait tüm titrasyon deneylerinde 326 nm uyarma dalga boyu ve %2 MeOH-su ortamı kullanılmıştır.

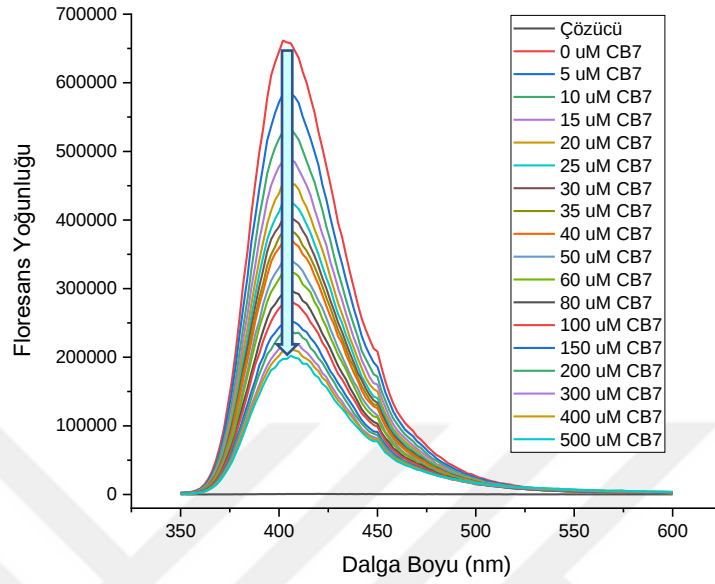


Şekil 3.6. PK bileşiğinin farklı çözücü ortamlarında UV-VIS grafiği

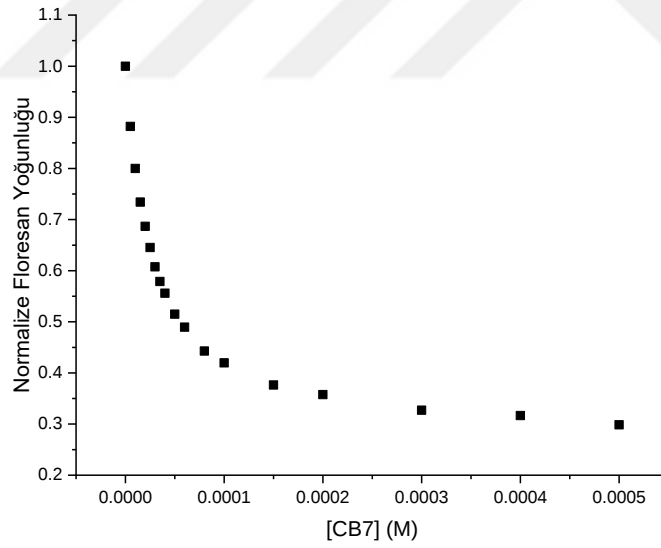
3.1.2.2. PK Boyasının 3 Farklı pH Ortamında CB[7] ile Titrasyonu

10 μ M PK boyası ile CB[7] floresans titrasyonu 3 farklı pH 2.5, 4.5 ve 7 ortamında yapılmıştır. Asidik ve nötr ortamda yapılan titrasyonlar sonucunda bağlanma sabitleri (K_a) bulunup karşılaştırılmıştır. Her bir titrasyon en az iki kez tekrarlanıp ortalama K_a değeri bulunmuştur. PK boyası ile CB[7] floresans titrasyon grafiği pH 2.5 ortamında Şekil 3.7.'de, titrasyon izotermi Şekil 3.8'de gösterilmiştir. İki defa tekrarlanan titrasyon izoterm karşılaştırması Şekil 3.9.'da bağlanma sabitleri ve ortalamaları ise Çizelge 3.1.'de

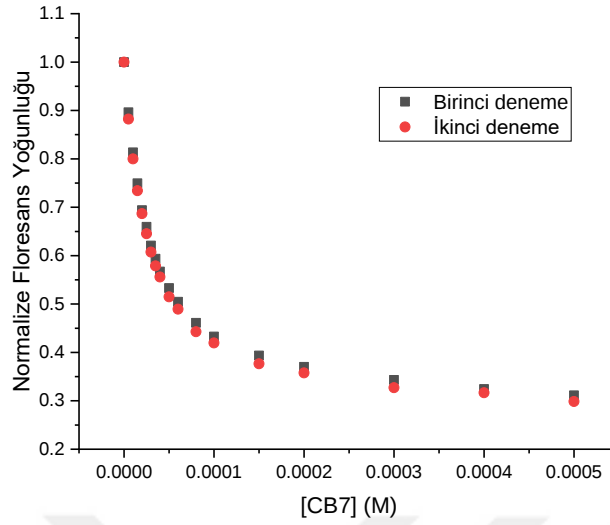
gösterilmiştir. Ph 2.5 ortamında 10 μ M PK- CB[7] iki tekrarlı floresans titrasyon sonucunda ortalama bağlanma sabiti 4.78×10^4 olarak bulunmuştur.



Şekil 3.7. 10 μ M PK- CB[7] pH 2.5 ortamında floresans titrasyon grafiği



Şekil 3.8. 10 μ M PK- CB[7] pH 2.5 ortamında floresans titrasyon izotermi

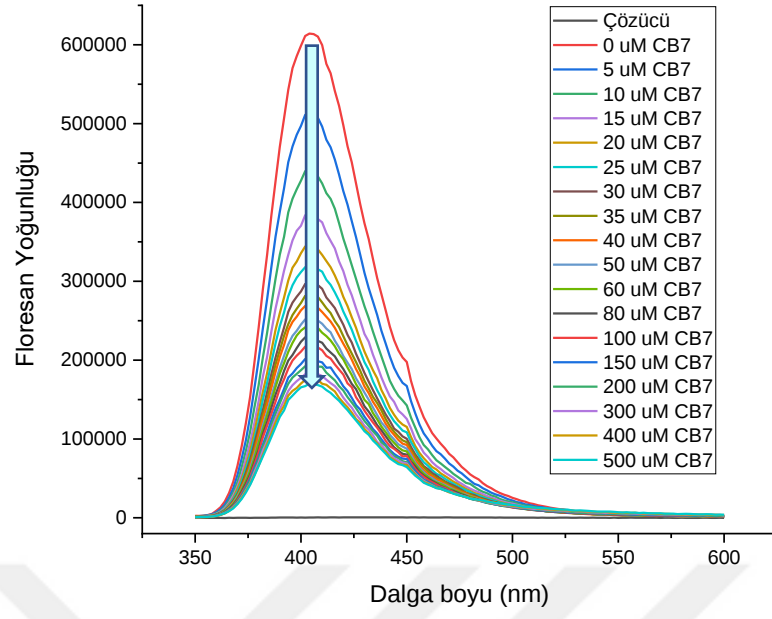


Şekil 3.9. 10 μ M PK- CB[7] pH 2.5 ortamında izoterm karşılaştırması

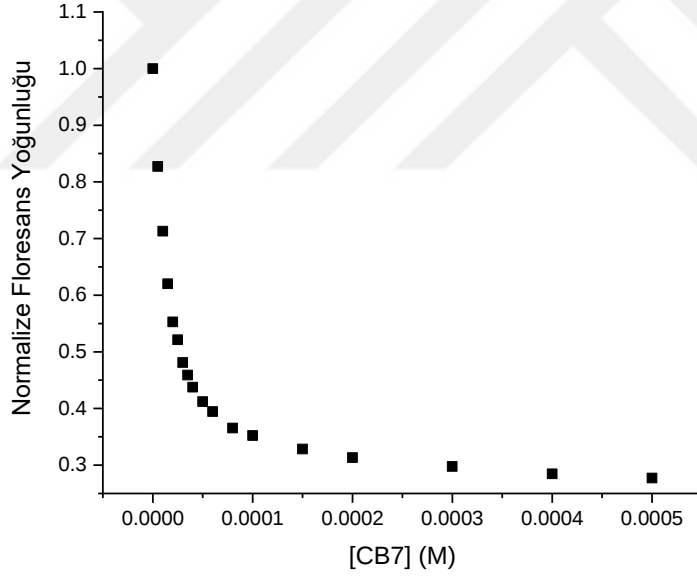
Çizelge 3.1. 10 μ M PK- CB[7] floresans titrasyon deneme sonuçları

	Ka	Hata
İlk Deneme	4.64×10^4	% ± 2.49
İkinci Deneme	4.92×10^4	% ± 2.85
Ortalama	4.78×10^4	% ± 2.67

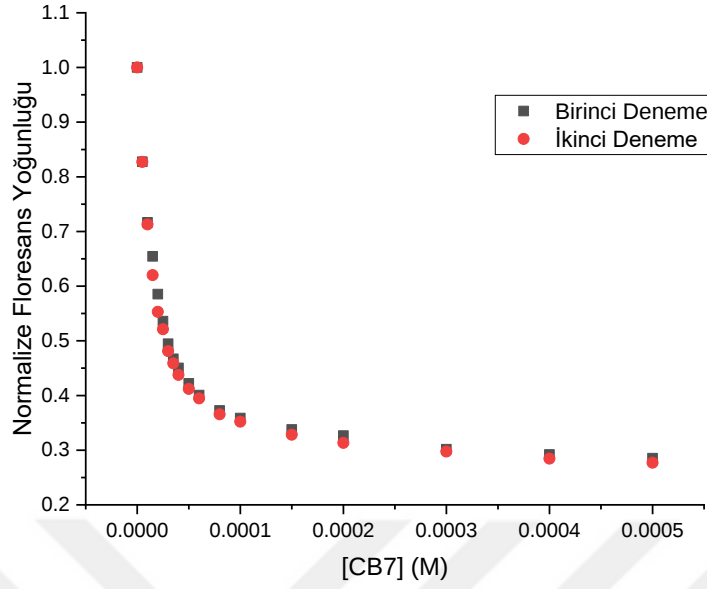
10 μ M PK boyası ile CB[7] ile floresans titrasyon grafiği pH 4.5 ortamında Şekil 3.10.'da, titrasyon izotermi Şekil 3.11'de gösterilmiştir. İki defa tekrarlanan titrasyon izoterm karşılaştırması Şekil 3.12.'de bağlanma sabitleri ve ortalamaları ise Çizelge 3.2.'de gösterilmiştir. Ph 4.5 ortamında 10 μ M PK- CB[7] iki tekrarlı floresans titrasyon sonucunda ortalama bağlanma sabiti 1.05×10^5 olarak bulunmuştur.



Şekil 3.10. 10 μ M PK- CB[7] pH 4.5 ortamında floresans titrasyon grafiği



Şekil 3.11. 10 μ M PK- CB[7] pH 4.5 ortamında floresans titrasyon izotermini

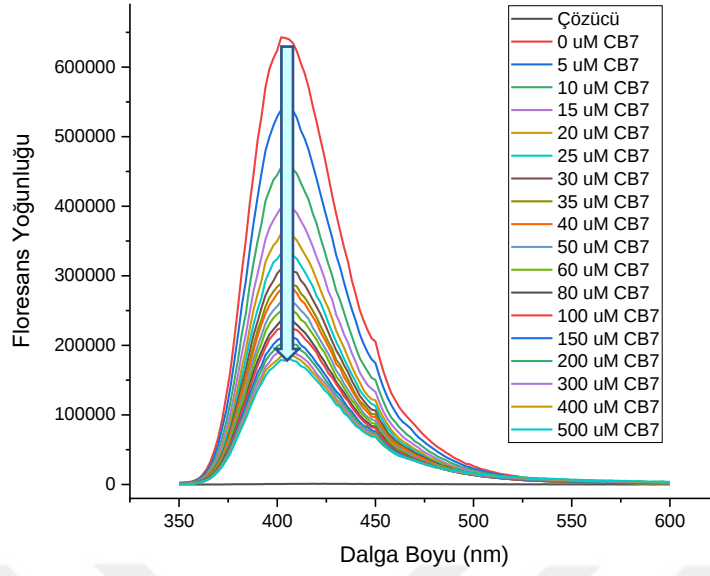


Şekil 3.12. 10 µM PK- CB[7] pH 4.5 ortamında izoterm karşılaştırması

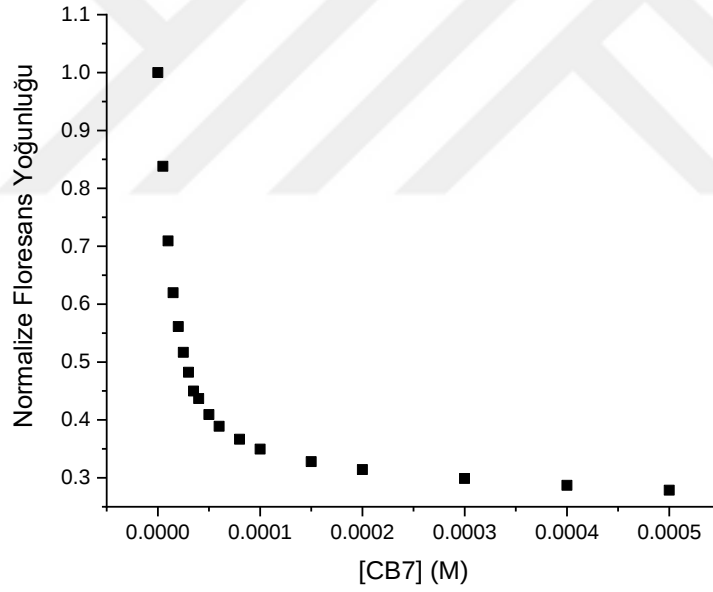
Çizelge 3.2. 10 µM PK- CB[7] pH 4.5 ortamında floresans titrasyon deneme sonuçları

	Ka	Hata
İlk Deneme	9.93×10^4	% ± 4.12
İkinci Deneme	1.1×10^5	% ± 3.70
Ortalama	1.05×10^5	% ± 3.91

10 µM PK boyası ile CB[7] floresans titrasyon grafiği pH 7.0 ortamında Şekil 3.13.'te, titrasyon izotermi Şekil 3.14'te gösterilmiştir. İki defa tekrarlanan titrasyon izoterm karşılaştırması Şekil 3.15.'te bağlanma sabitleri ve ortalamaları ise Çizelge 3.3.'te gösterilmiştir. pH 7.0 ortamında 10 µM PK-CB[7] iki tekrarlı floresans titrasyon sonucunda ortalama bağlanma sabiti 1.14×10^5 olarak bulunmuştur.



Şekil 3.13. 10 μ M PK- CB[7] pH 7.0 ortamında floresans titrasyon grafiği

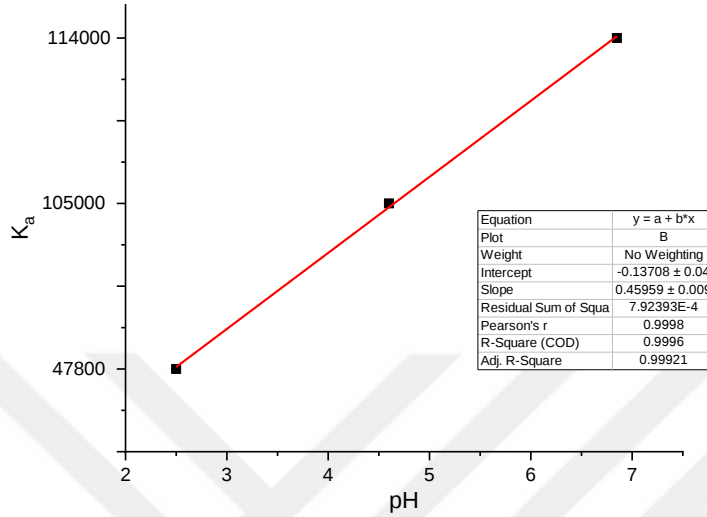


Şekil 3.14. 10 μ M PK- CB[7] pH 7.0 ortamında floresans titrasyon izotermi

Çizelge 3.3. 10 μ M PK- CB[7] pH 7.0 ortamında floresans titrasyon deneme sonuçları

	Ka	Hata
İlk Deneme	1.11×10^5	% ± 2.94
İkinci Deneme	1.16×10^5	% ± 3.96
Ortalama	1.14×10^5	% ± 3.45

3 farklı pH ortamında yapılan PK-CB[7] titrasyon sonucunda Şekil 3.15’te gösterildiği üzere en yüksek bağlanma sabiti pH 7’de elde edilmiştir. Olası hidroforbik ve iyon-dipol etkileşimleri Şekil 3.16’da gösterilmiştir.



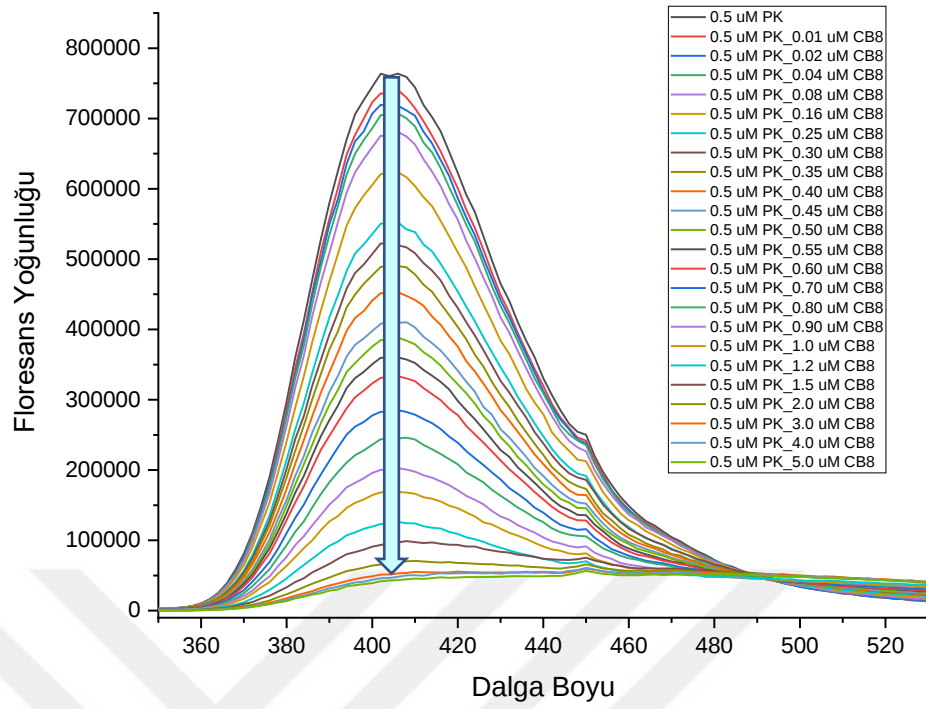
Şekil 3.15. Farklı pH ortamlarında PK- CB[7] titrasyonu bağlanma sabiti karşılaştırılması



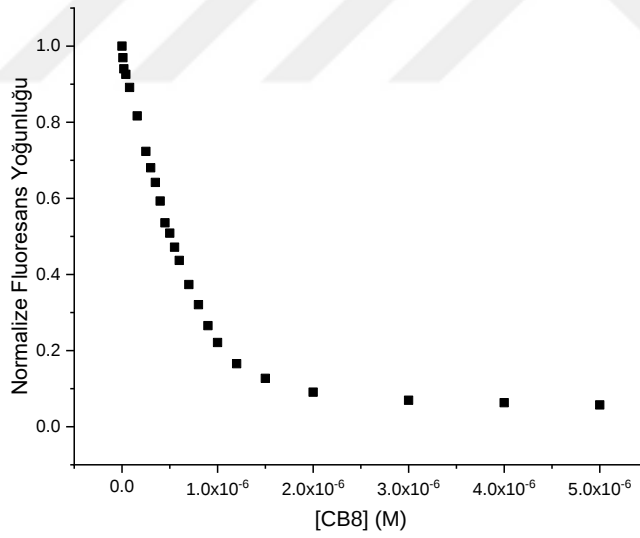
Şekil 3.16. CB'lerin olası etkileşimleri

3.1.2.3. PK Boyasının CB[8] ile Titrasyonu

PK Boyasının CB[7] ile iyon-dipol etkileşimleri sonucunda CB[7]'nin içerisindeki boşluğa girmesiyle boyanın sönümlenme etkisinin görülmesi üzerine CB[8] içinde deneme yapılmıştır. Şekil 3.17’de görüldüğü üzere 0.5 μM PK ile CB[8] titrasyonu sulu çözeltide yapılmıştır ve tekrar boya sönümlenmesi elde edilmiştir. İzoterm grafiği Şekil 3.18’de gösterilmiştir.



Şekil 3.17. 0.5 μ M PK- CB[8] floresans titrasyon grafiği

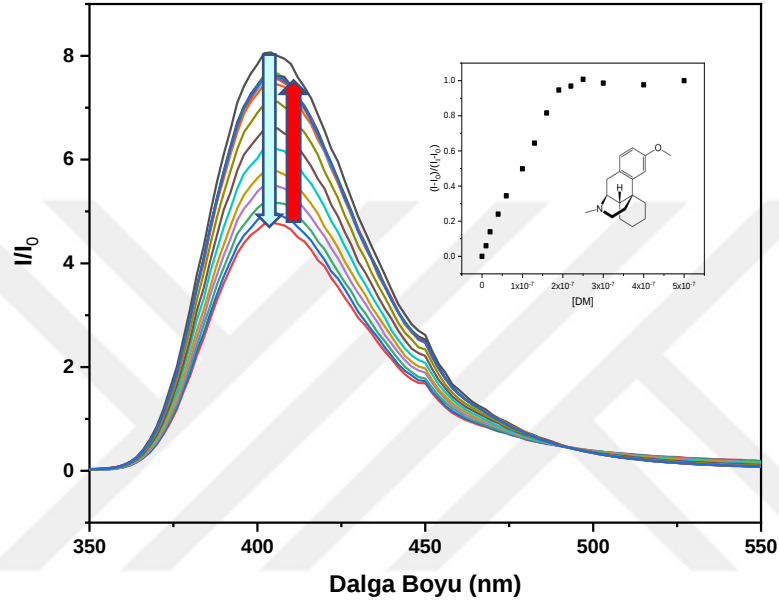


Şekil 3.18. 10 μ M PK- CB[8] floresans titrasyon izotermi

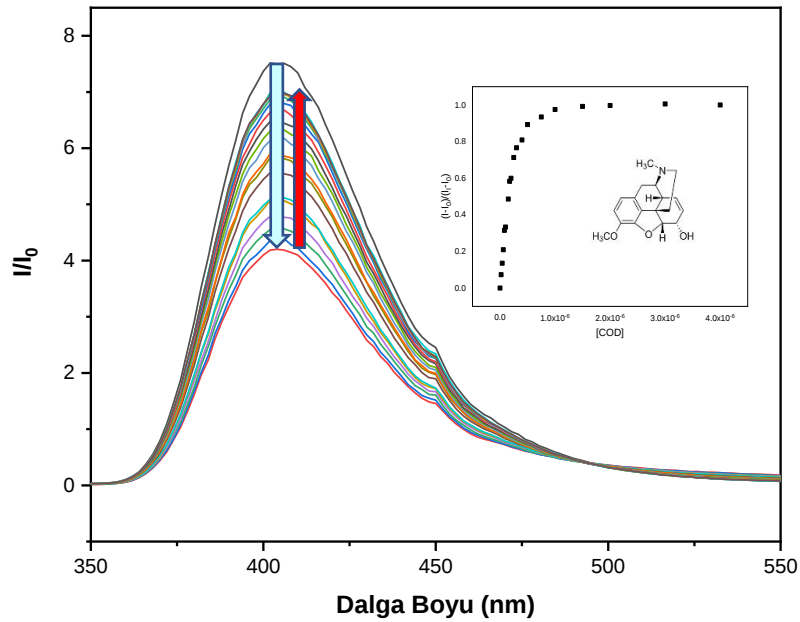
3.1.2.4. PK-CB[8] Sensörünün 4 Farklı Opioid Analizi için Kullanılması

0.5 μ M PK boyası ile CB[8] reseptörü ile sensör oluşturulmuştur. Geliştirilen bu sensör sisteminde 4 farklı opioid kodein, metadon, oksikodon ve dekstrometorfan (DM) indikatör yer değiştirme mekanizmasıyla, opioidler boya ile yer değiştirerek boyanın tekrar

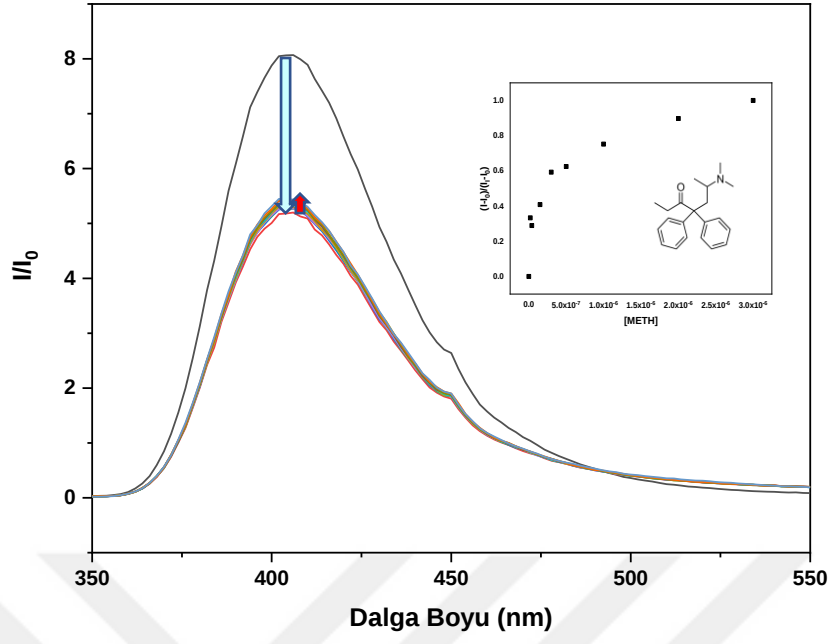
salınmasına ve amplifikasyon sonucu elde edilmiştir. Titrasyonların hepsinde (0.5 μ M, 1:1 oranında) PK-CB[8] kullanılmıştır ve titrasyon grafiklerinin içerisinde ise izoterm grafiği gösterilmiştir. Şekil 3.19'da PK-CB8'in DM (0-0.5 μ M) ile titrasyon grafiği gösterilmiştir. Şekil 3.20'de PK-CB8'in kodein (0-4 μ M) ile titrasyon grafiği gösterilmiştir. Şekil 3.21'de PK-CB8'in metadon (0-3 μ M) ile titrasyon grafiği gösterilmiştir. Şekil 3.22'de PK-CB8'in oksikodon (0-10 μ M) ile titrasyon grafiği gösterilmiştir.



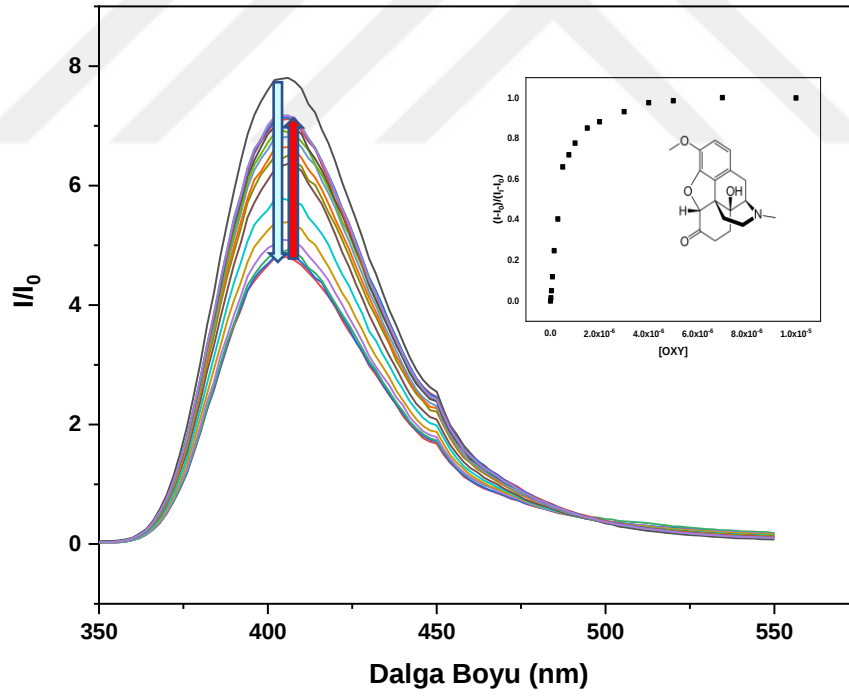
Şekil 3.19. 0.5 μ M, 1:1 oranında PK-CB8'in DM ile titrasyon grafiği



Şekil 3.20. 0.5 μ M, 1:1 oranında PK-CB8'in kodein ile titrasyon grafiği



Şekil 3.21. 0.5 μ M, 1:1 oranında PK-CB8'in metadon ile titrasyon grafiği

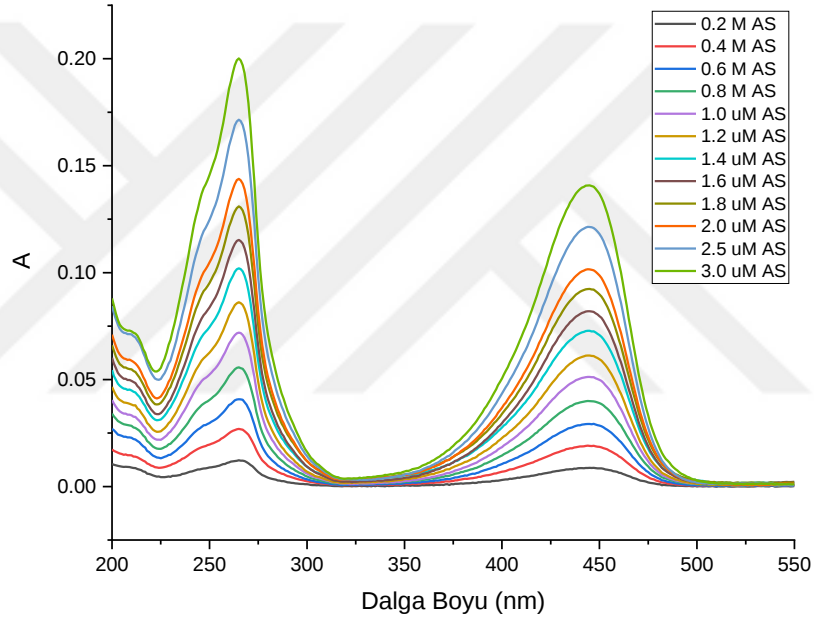


Şekil 3.22. 0.5 μ M, 1:1 oranında PK-CB8'in oksikodon ile titrasyon grafiği

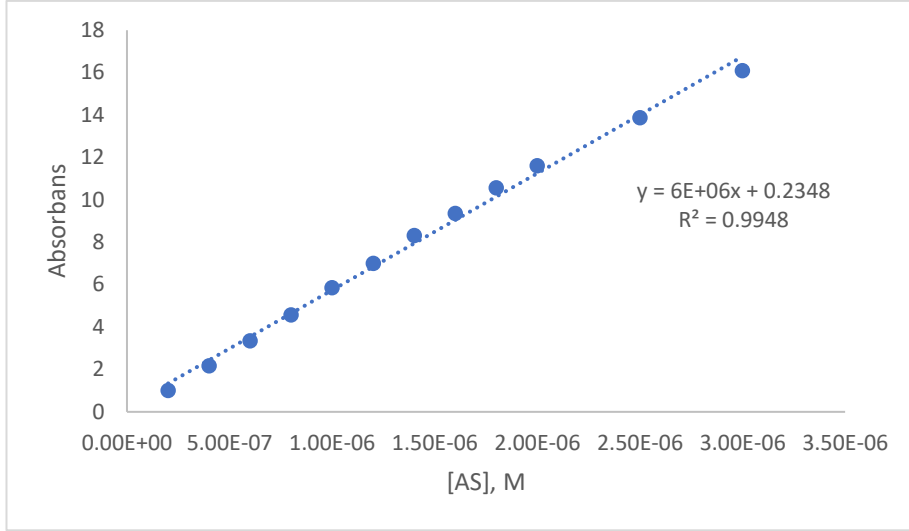
3.1.3. AS Boyasının Optik Sensörlerde Kullanımı

3.1.3.1. AS Boyası Absorbans Ölçümü

AS Boyasının dimer oluşturmaması titrasyonların güvenilirliği açısından önemli bir parametredir. Bu sebepten, Lambert-Beer kanunu uygulanarak konsantrasyon değerleri artırarak absorbans ölçümleri alınmıştır. Şekil 3.23'te absorbans grafiği gösterilmiş ve Şekil 3.24'te AS boyasının konsantrasyona karşı absorbans grafiğinde görüldüğü gibi doğrusal grafik elde edilmiştir. 3 μM 'a kadar doğrusal eğriyle ilerlemesi herhangi bir agregasyon olmadığının göstergesidir.



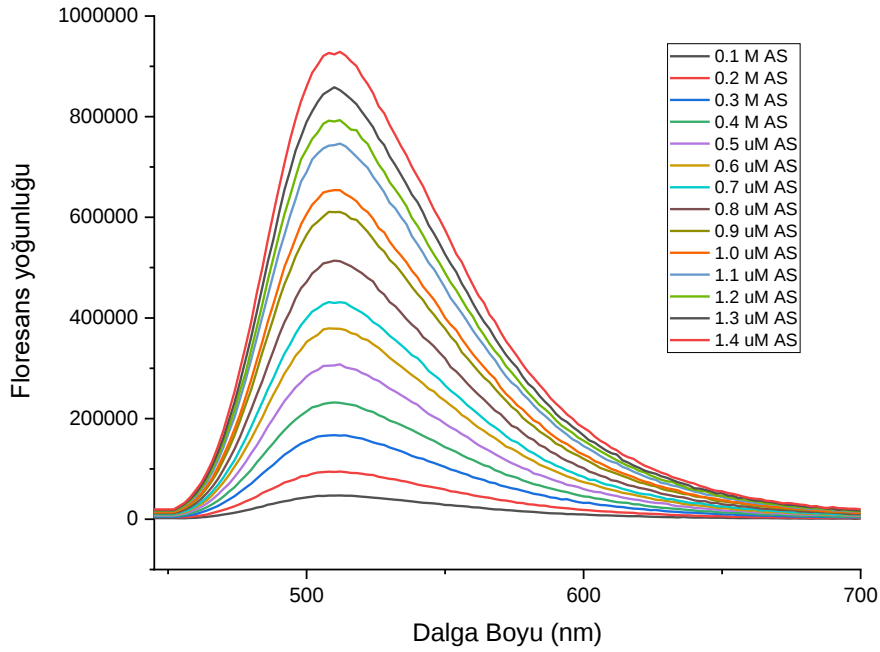
Şekil 3.23. AS boyasının absorbans kalibrasyon grafiği



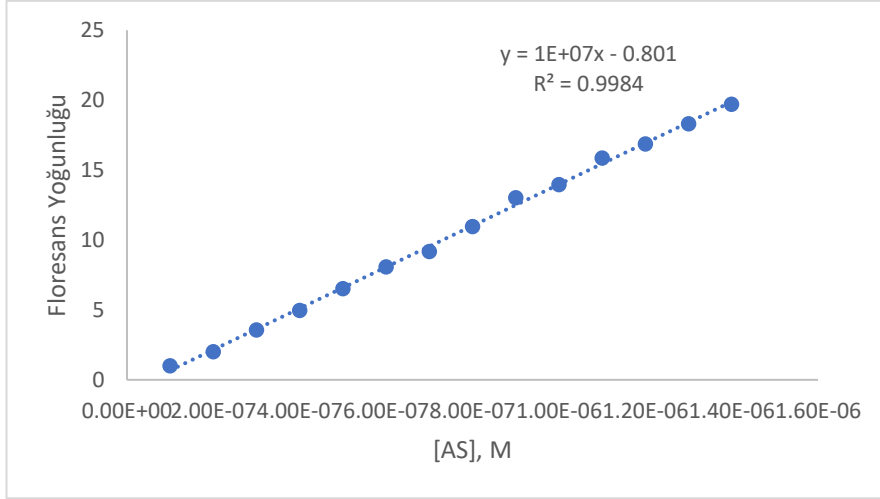
Şekil 3.24. AS boyasının konsantrasyona karşı absorbands kalibrasyon eğrisi

3.1.3.1. AS Boyası Floresans Ölçümü

AS boyasının agrege özelliği göstermediği floresans ölçümüyle de kanıtlanmak istenmiştir. Bu sebepten, Lambert-Beer kanunu uygulanarak konsantrasyon değerleri artırarak absorbands ölçümleri alınmıştır. Şekil 3.25'te floresans grafiği, Şekil 3.26'da AS boyasının konsantrasyona karşı floresans grafiğinde görüldüğü gibi doğrusal grafik elde edilmiştir. 1.4 μM 'a kadar doğrusal eğriyle ilerlemesi herhangi bir agregasyon olmadığının göstergesidir.



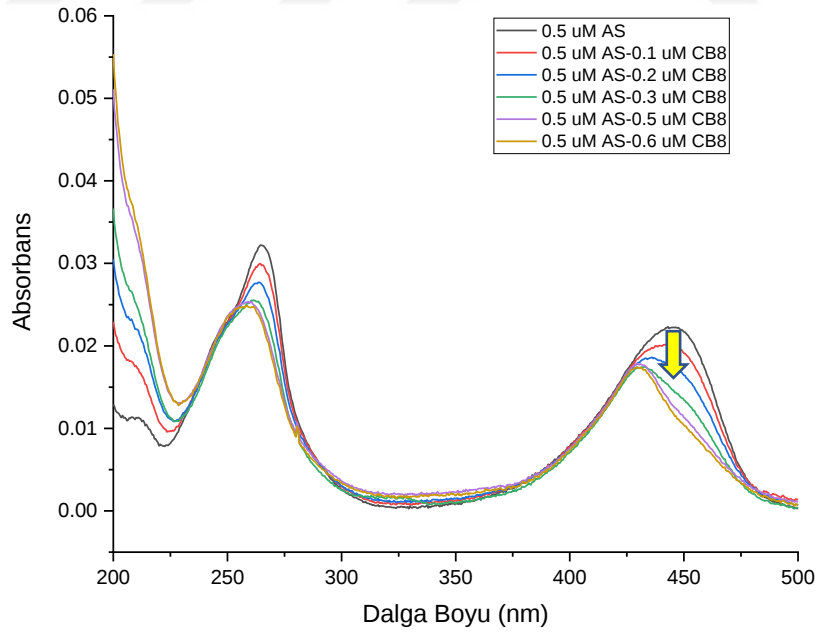
Şekil 3.25. AS boyasının floresans kalibrasyon grafiği



Şekil 3.26. AS boyasının konsantrasyona karşı floresans kalibrasyon eğrisi

3.1.3.3. AS Boyasının CB[8] ile Absorbans Titrasyonu

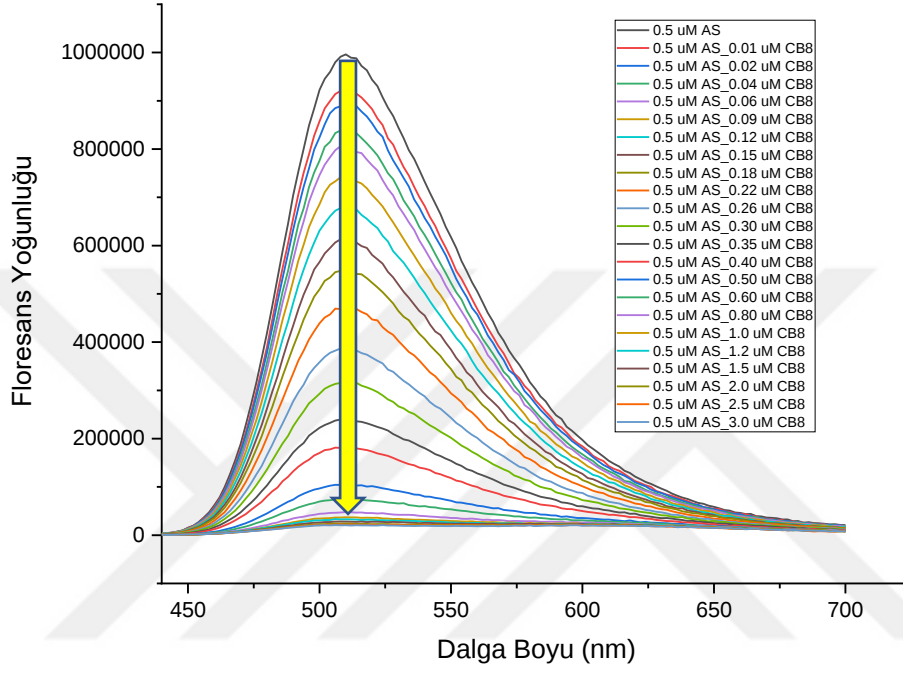
Şekil 3.27’de görüldüğü üzere 0.5 μM AS ile CB[8] absorbans titrasyonu sulu çözeltide yapılmıştır. AS CB[8]’in içerisindeki boşluğa girerek boya sönmülenmesi elde edilmiştir ve izosbestik noktası 426 nm olarak belirlenmiştir.



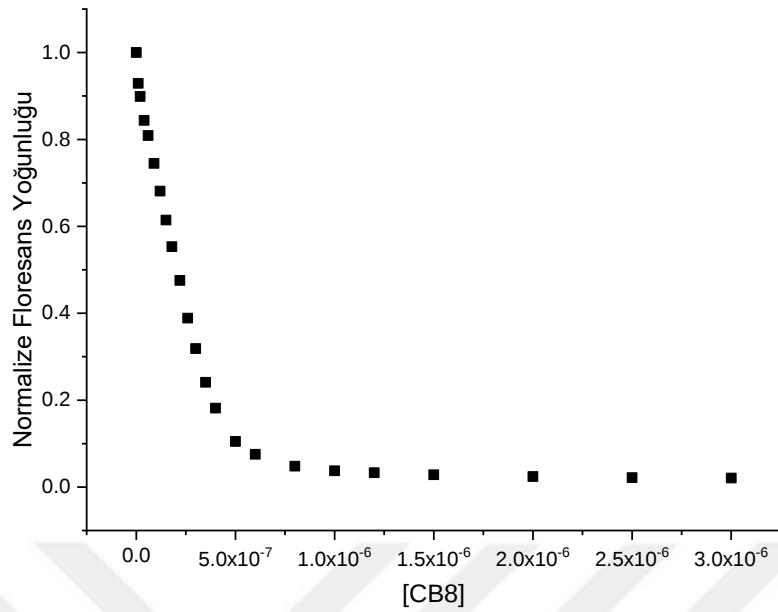
Şekil 3.27. 0.5 μM AS- CB[8] absorbans titrasyon grafiği

3.1.3.4. AS Boyasının CB[8] ile Floresans Titrasyonu

Şekil 3.28’de görüldüğü üzere 0.5 μM AS ile CB[8] floresans titrasyonu sulu çözeltide yapılmıştır. AS CB[8]’in içerisindeki boşluğa girerek boya sönmülenmesi elde edilmiştir. İzoterm grafiği Şekil 3.29’da gösterilmiştir.



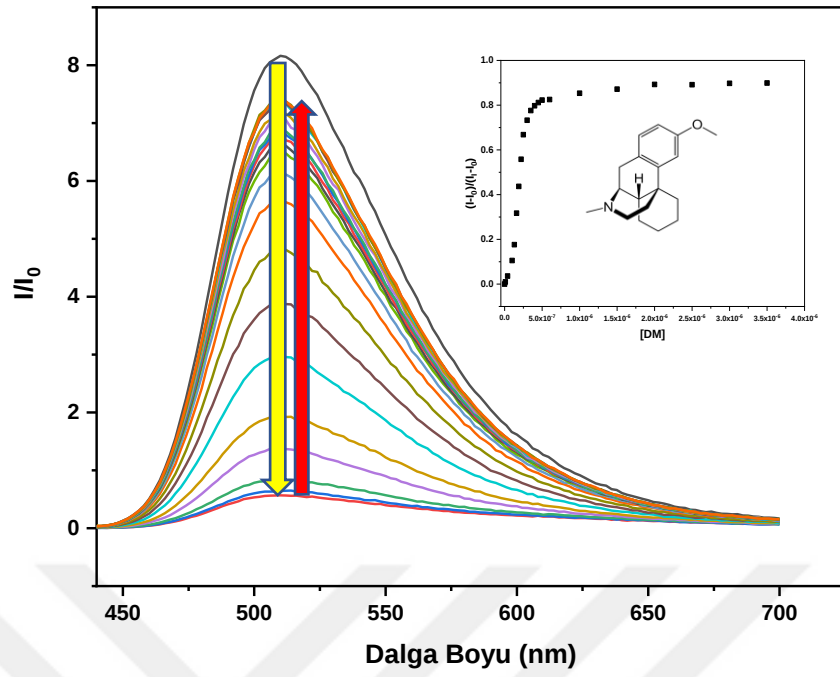
Şekil 3.28. 0.5 μM AS- CB[8] floresans titrasyon grafiği



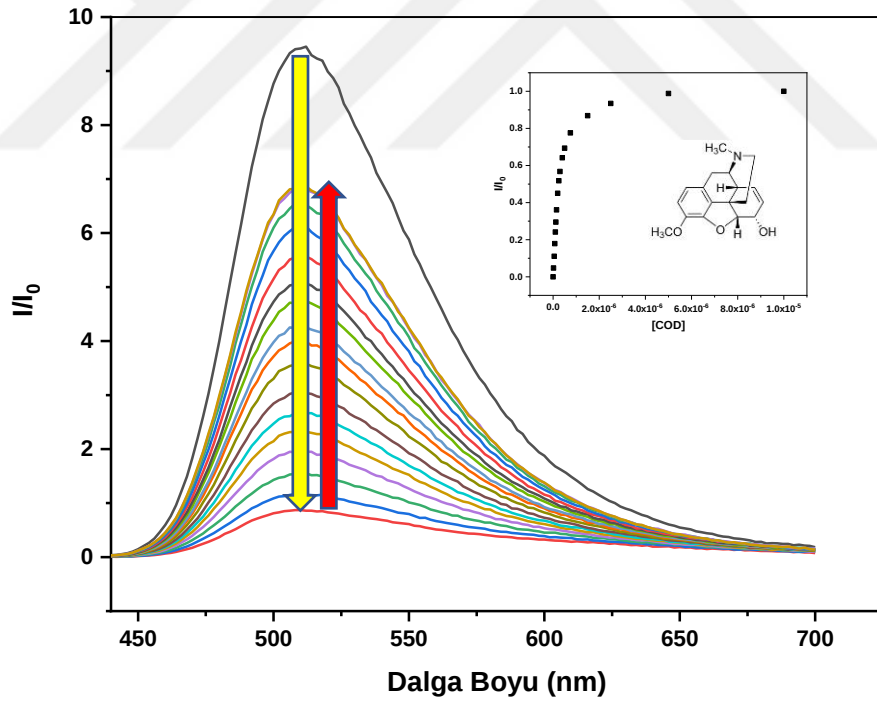
Şekil 3.29. 0.5 μ M AS- CB[8] floresans titrasyon izotermi

3.1.3.5. AS-CB[8] Sensörünün 4 Farklı Opioid Analizi İçin Kullanılması

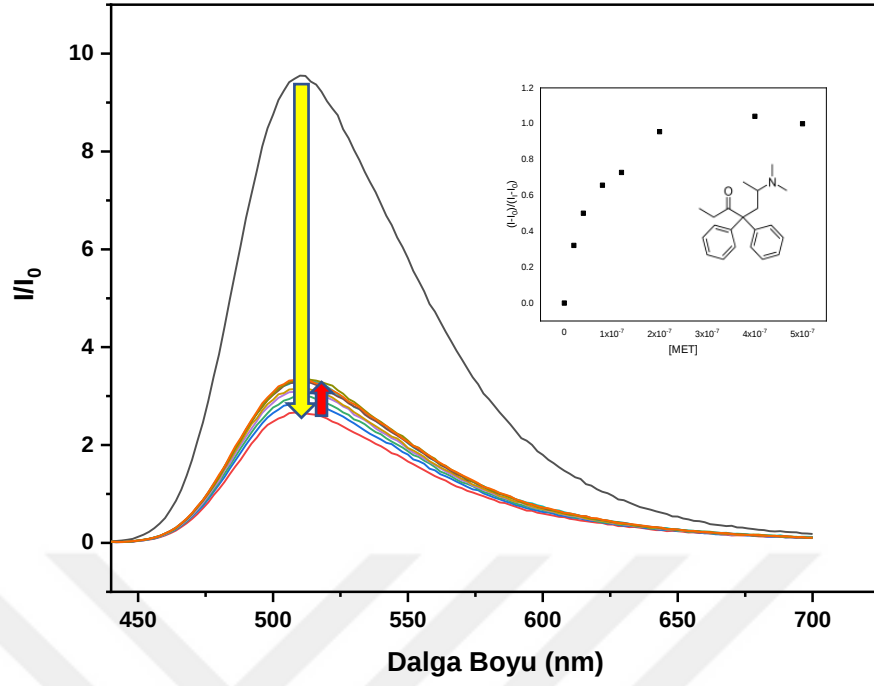
0.5 μ M AS boyası ile CB[8] reseptörü ile sensör oluşturulmuştur. Geliştirilen bu sensör sisteminde 4 farklı opioid kodein, metadon, oksikodon ve dekstrometorfan (DM) indikatör yer değiştirme mekanizmasıyla, opioidler boya ile yer değiştirerek boyanın tekrar salınmasına ve amplifikasyon sonucu elde edilmiştir. Titrasyonların hepsinde (0.5 μ M, 1:1 oranında) AS-CB[8] kullanılmıştır ve titrasyon grafiklerinin içerisinde ise izoterm grafiği gösterilmiştir. Şekil 3.30'da AS-CB8'in DM (0-3.5 μ M) ile titrasyon grafiği gösterilmiştir. Şekil 3.31'de AS-CB8'in kodein (0-1 μ M) ile titrasyon grafiği gösterilmiştir. Şekil 3.32'de AS-CB8'in metadon (0-0.5 μ M) ile titrasyon grafiği gösterilmiştir. Şekil 3.33'te AS-CB8'in oksikodon (0-0.8 μ M) ile titrasyon grafiği gösterilmiştir.



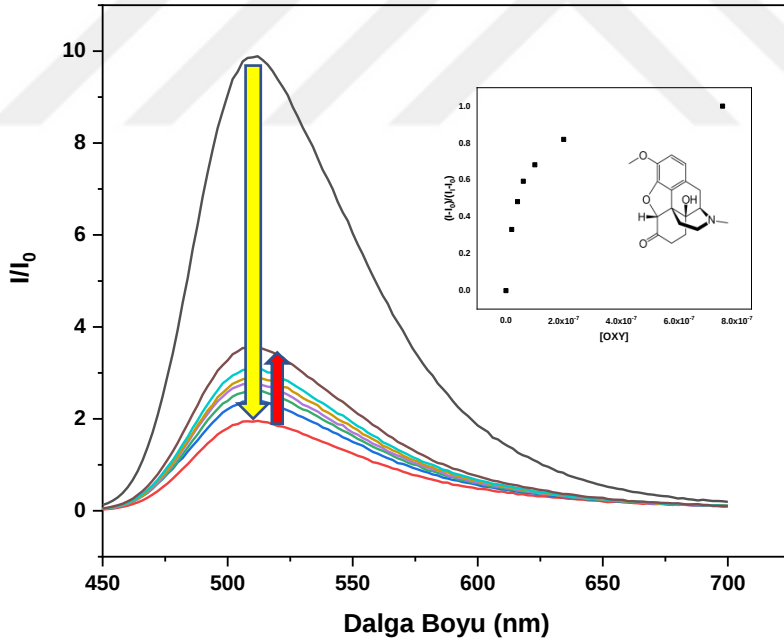
Şekil 3.30. 0.5 μ M, 1:1 oranında AS-CB8'in DM ile titrasyon grafiği



Şekil 3.31. 0.5 μ M, 1:1 oranında AS-CB8'in kodein ile titrasyon grafiği



Şekil 3.32. 0.5 μM , 1:1 oranında AS-CB8'in metadone ile titrasyon grafiği

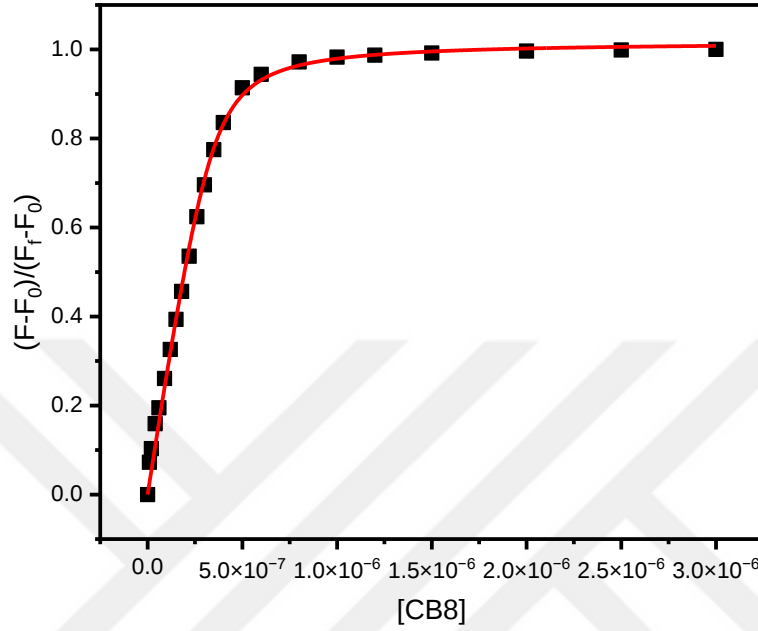


Şekil 3.33. 0.5 μM , 1:1 oranında AS-CB8'in oksikodon ile titrasyon grafiği

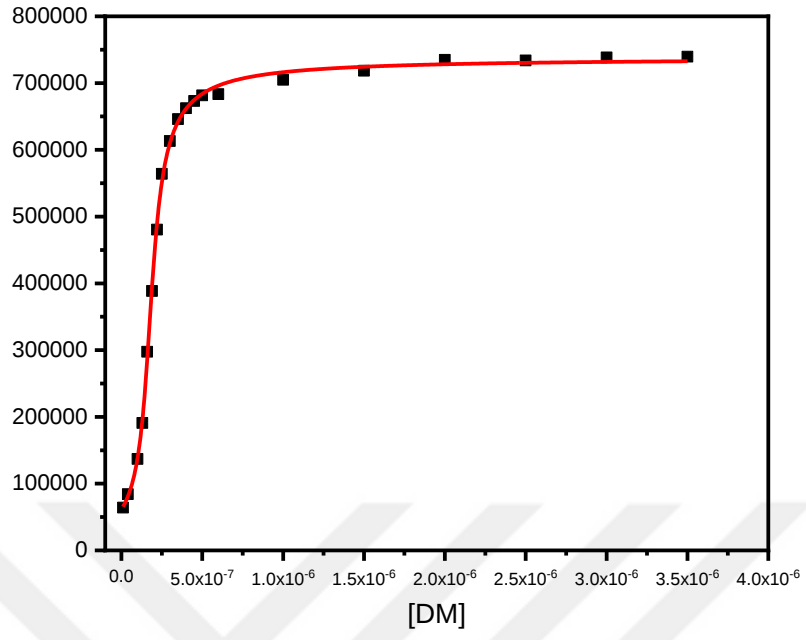
3.1.3.6. AS-CB[8] Sensörünün DM ile titrasyon bulguları

İndikatör yer değiştirme mekanizması sonucunda geliştirilen AS-CB[8] sensöründe DM en fazla amplifikasyon sonucunu vermiştir. Şekil 3.34'te AS ile CB[8] titrasyon izotermi,

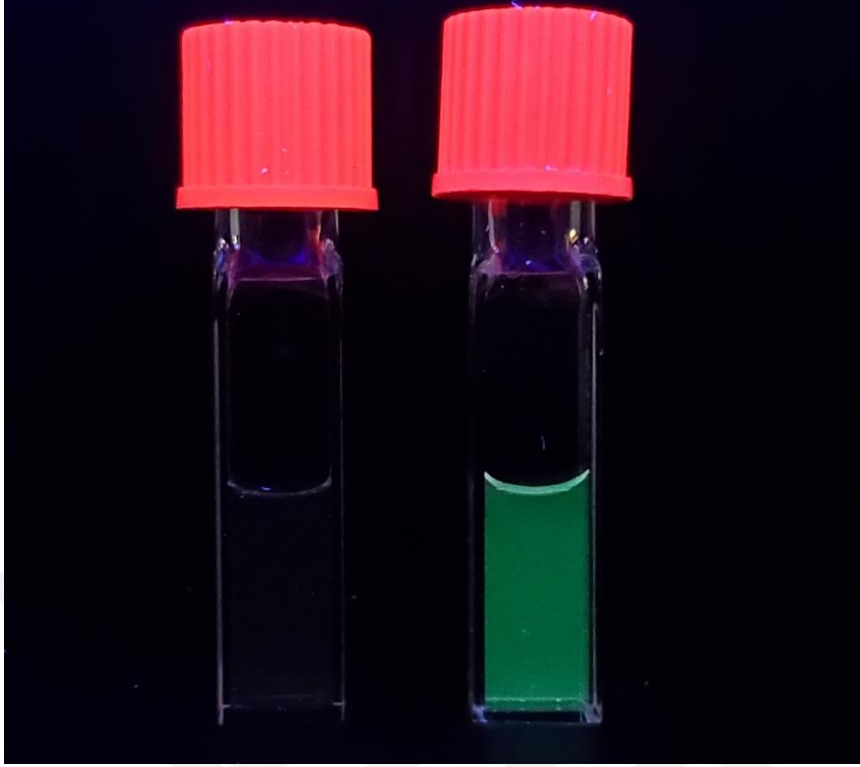
Şekil 3.35'te AS-CB[8] sensörüne DM eklendikten sonra izoterm grafiği gösterilmiştir. Şekil 3.36'da ise bu izotermelere ait titrasyonların floresans küvetinde UV lambası altında çekilmiş fotoğrafları gösterilmiştir.



Şekil 3.34. 0.5 μ M AS- CB[8] floresans titrasyon izotermi



Şekil 3.35. 0.5 μ M, 1:1 oranında AS-CB8'in DM ile titrasyon izotermi

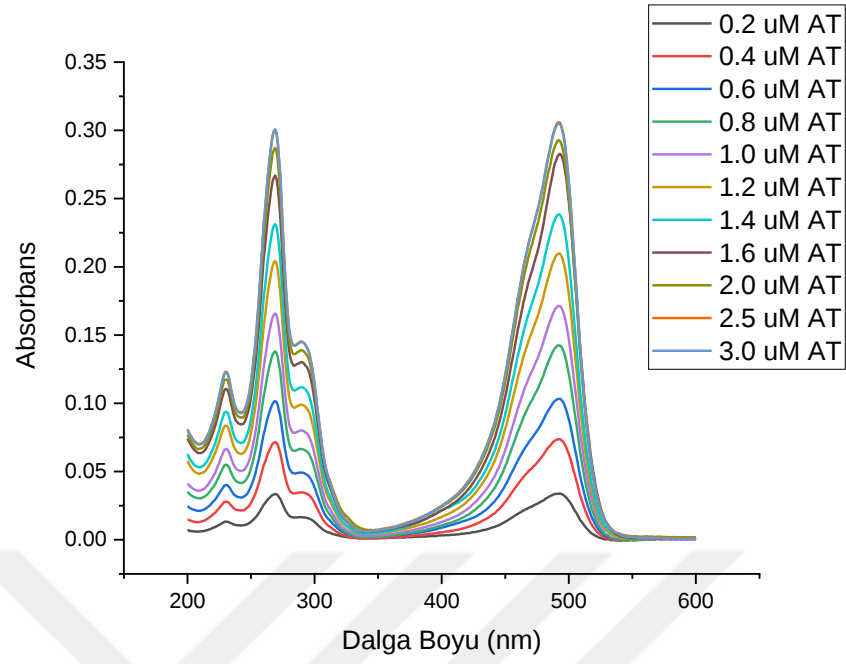


Şekil 3.36. Soldaki küvet 0.5 μM AS-0.5 μM CB8 çözeltisi, sağdaki 0.5 μM AS-0.5 μM CB8-1.5 μM DM

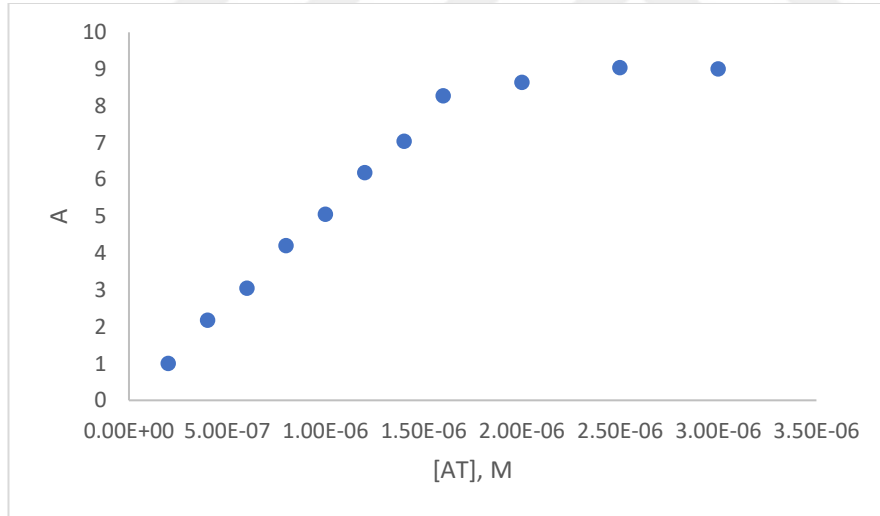
3.1.4. AT Boyasının Optik Sensörlerde Kullanımı

3.1.4.1. AT Boyası Absorbans Ölçümü

Şekil 3.37’de absorbans grafiği, Şekil 3.38’de AT boyasının konsantrasyona karşı absorbans grafiğinde görüldüğü gibi 1.5 μM ’a kadar doğrusal grafik elde edilmiştir. Doğrusal eğrinin 1.5 μM ’dan sonrası dimerleşme olduğunun göstergesidir. Bu sebepten titrasyonlar için 1.5 μM ’dan fazlasını kullanmak doğru değildir.



Şekil 3.37. AT boyasının absorbans kalibrasyon grafiği

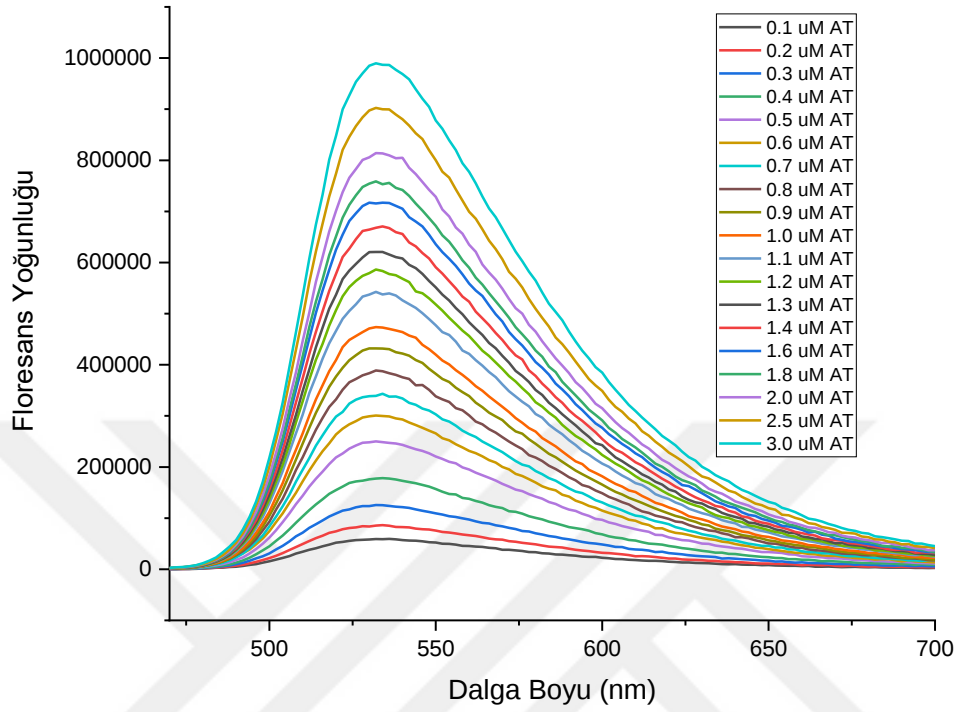


Şekil 3.38. AT boyasının konsantrasyona karşı absorbans kalibrasyon eğrisi

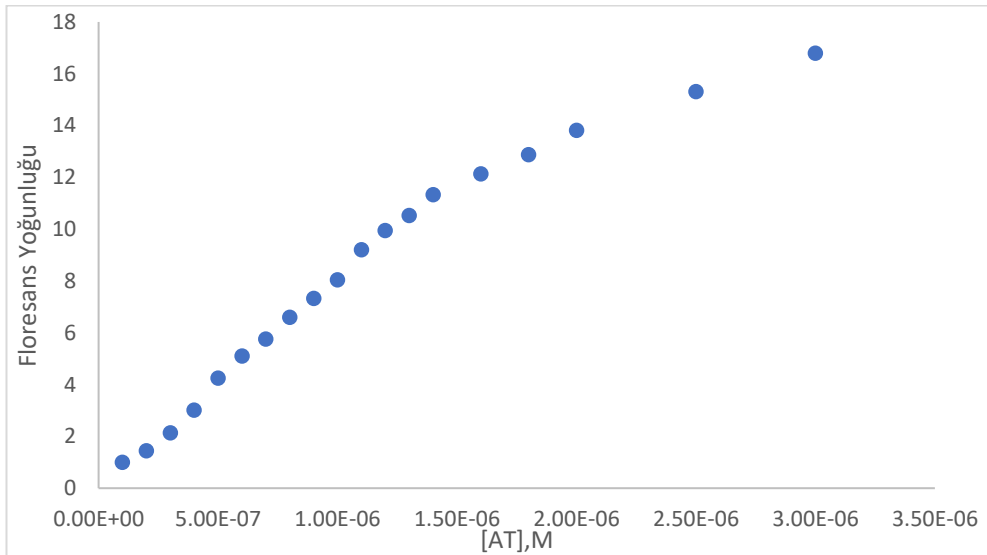
3.1.4.1. AT Boyası Floresans Ölçümü

AT boyasının 1.5 μM 'dan dimerleşme özelliği floresans ölçümüyle de kanıtlanmak istenmiştir. Bu sebepten, Lambert-Beer kanunu uygulanarak konsantrasyon değerleri artırarak floresans ölçümleri alınmıştır. Şekil 3.39'da floresans grafiği, Şekil 3.40'ta AT boyasının

konsantrasyona karşı floresans grafiğinde görüldüğü gibi doğrusal grafik elde edilmiştir. 1.5 μM 'dan sonrasında doğrusal eğrinin bozulması dimerleşme olduğunun göstergesidir.



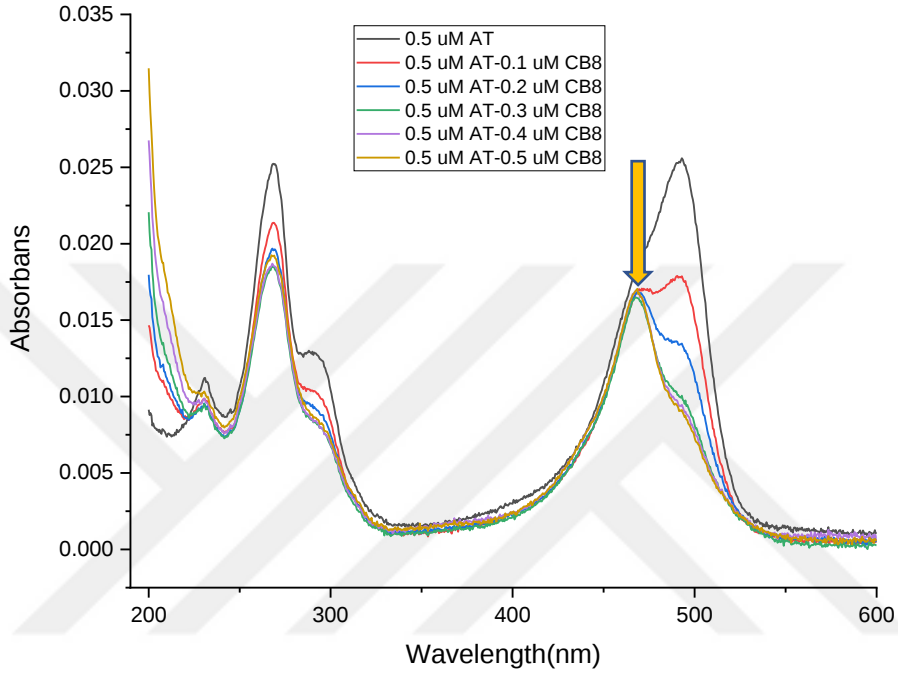
Şekil 3.39. AT boyasının floresans kalibrasyon grafiği



Şekil 3.40. AT boyasının konsantrasyona karşı floresans kalibrasyon eğrisi

3.1.4.3. AT Boyasının CB[8] ile Absorbans Titrasyonu

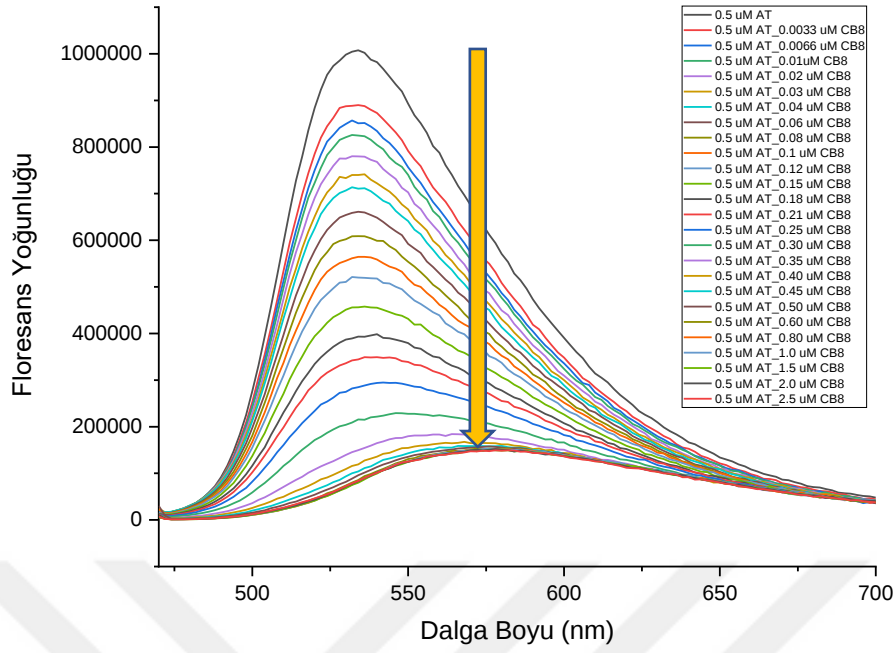
Şekil 3.41’de görüldüğü üzere 0.5 μM AT ile CB[8] absorbans titrasyonu sulu çözeltide yapılmıştır. AT CB[8]’in içerisindeki boşluğa girerek boya sönümlenmesi elde edilmiştir ve izosbestik noktası 460 nm olarak belirlenmiştir.



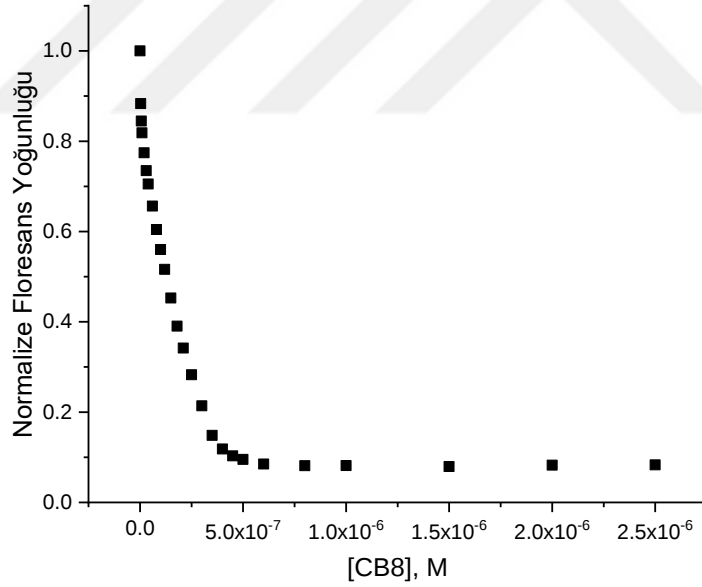
Şekil 3.41. 0.5 μM AT- CB[8] absorbans titrasyon grafiği

3.1.4.4. AT Boyasının CB[8] ile Floresans Titrasyonu

Şekil 3.42’de görüldüğü üzere 0.5 μM AT ile CB[8] floresans titrasyonu sulu çözeltide yapılmıştır. AT CB[8]’in içerisindeki boşluğa girerek boya sönümlenmesi elde edilmiştir. İzoterm grafiği Şekil 3.43’te gösterilmiştir.



Şekil 3.42. 0.5 μ M AT- CB[8] floresans titrasyon grafiği

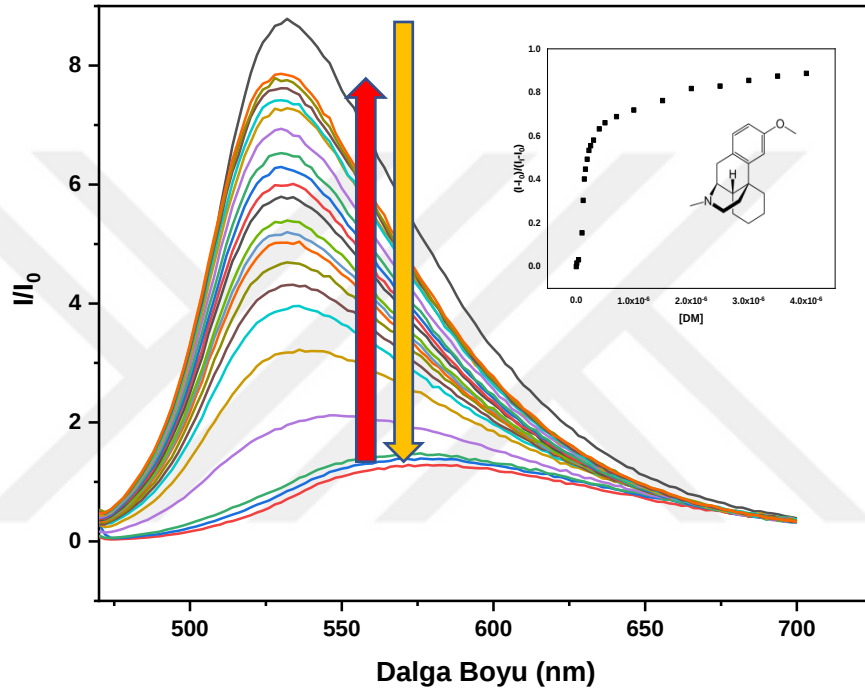


Şekil 3.43. 0.5 μ M AT- CB[8] floresans titrasyon izotermi

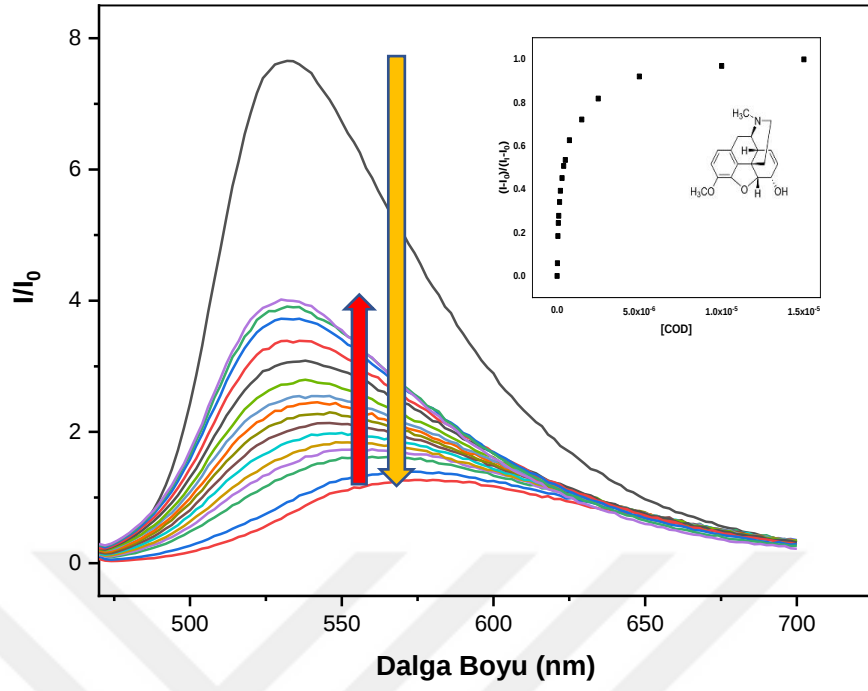
3.1.4.5. AT-CB[8] Sensörünün 4 Farklı Opioid Analizi için Kullanılması

0.5 μ M AT boyası ile CB[8] reseptörü ile sensör oluşturulmuştur. Geliştirilen bu sensör sisteminde 4 farklı opioid kodein, metadon, oksikodon ve dekstrometorfan (DM)

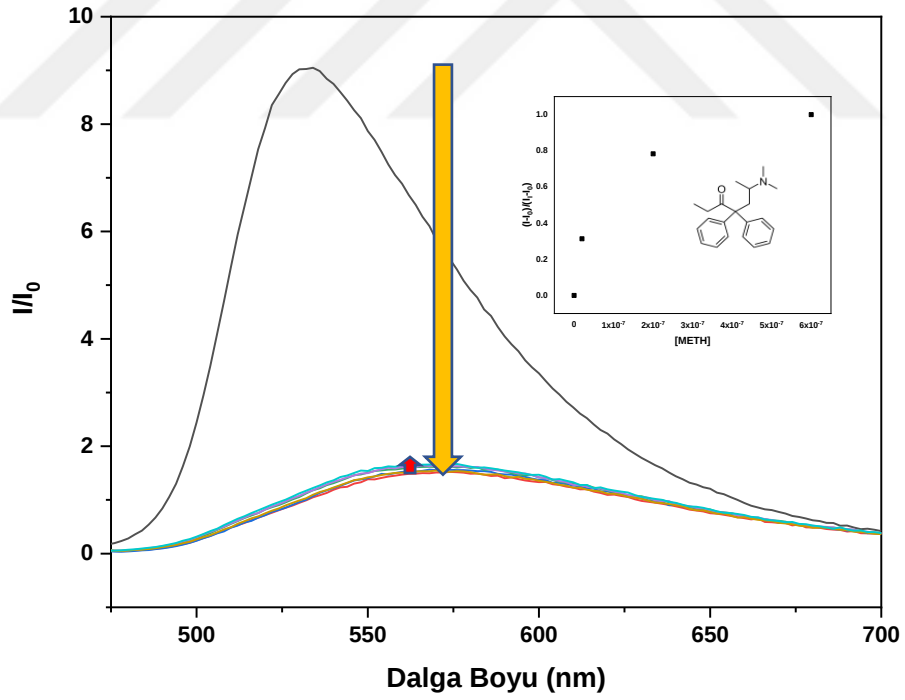
indikatör yer değiştirme mekanizmasıyla, opioidler boya ile yer değiştirerek boyanın tekrar salınmasına ve amplifikasyon sonucu elde edilmiştir. Titrasyonların hepsinde (0.5 μM , 1:1 oranında) AT-CB[8] kullanılmıştır ve titrasyon grafiklerinin içerisinde ise izoterm grafiği gösterilmiştir. şekil 3.44'te AT-CB8'in DM (0-4 μM) ile titrasyon grafiği gösterilmiştir. şekil 3.45'te AT-CB8'in kodein (0-1.5 μM) ile titrasyon grafiği gösterilmiştir. şekil 3.46'da AT-CB8'in metadon (0-0.6 μM) ile titrasyon grafiği gösterilmiştir. şekil 3.47'de AT-CB8'in oksikodon (0-0.5 μM) ile titrasyon grafiği gösterilmiştir.



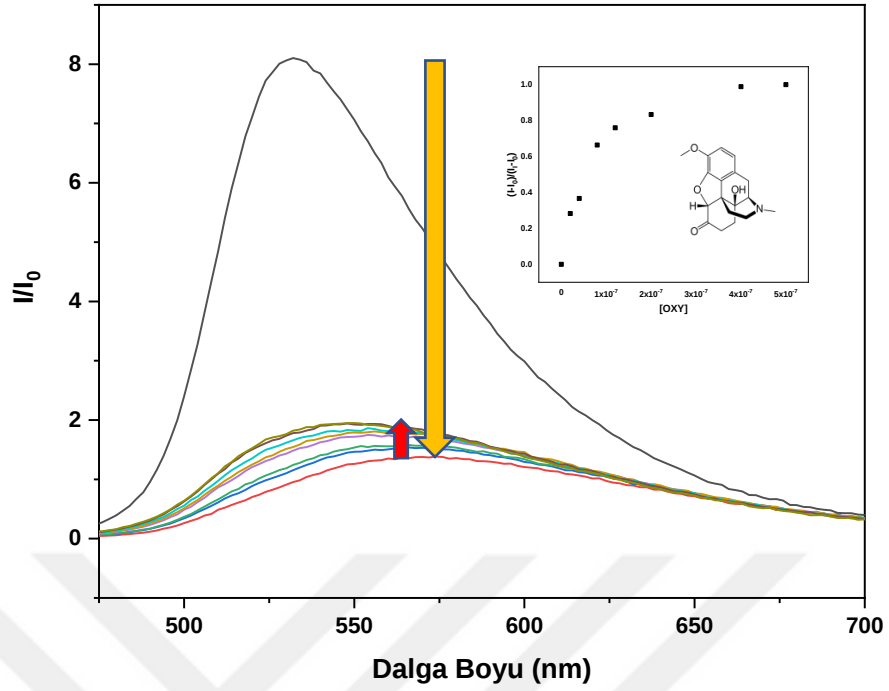
şekil 3.44. 0.5 μM , 1:1 oranında AT-CB8'in DM ile titrasyon grafiği



Şekil 3.45. 0.5 μ M, 1:1 oranında AT-CB8'in kodein ile titrasyon grafiği



Şekil 3.46. 0.5 μ M, 1:1 oranında AT-CB8'in metadone ile titrasyon grafiği

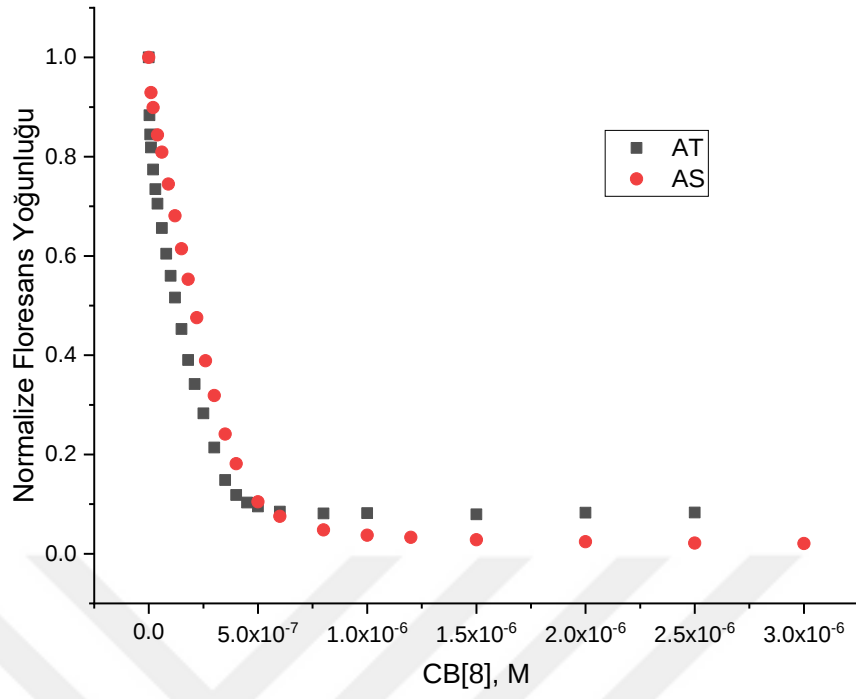


Şekil 3.47. 0.5 μ M, 1:1 oranında AT-CB8'in oksikodon ile titrasyon grafiği

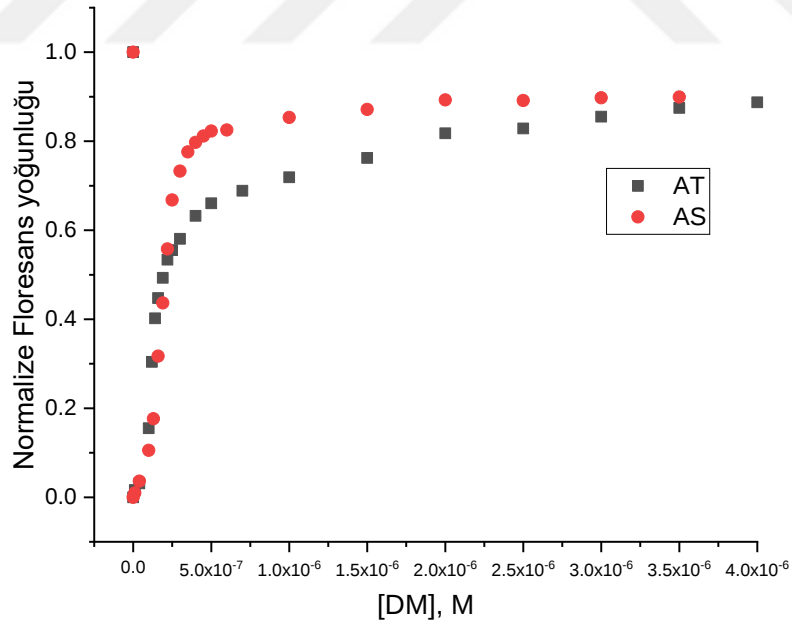
3.1.5. AT ve AS Boyalarının Karşılaştırılması

3.1.5.1. AT ve AS'nin CB[8] ve Analitlerle Titrasyon Karşılaştırılması

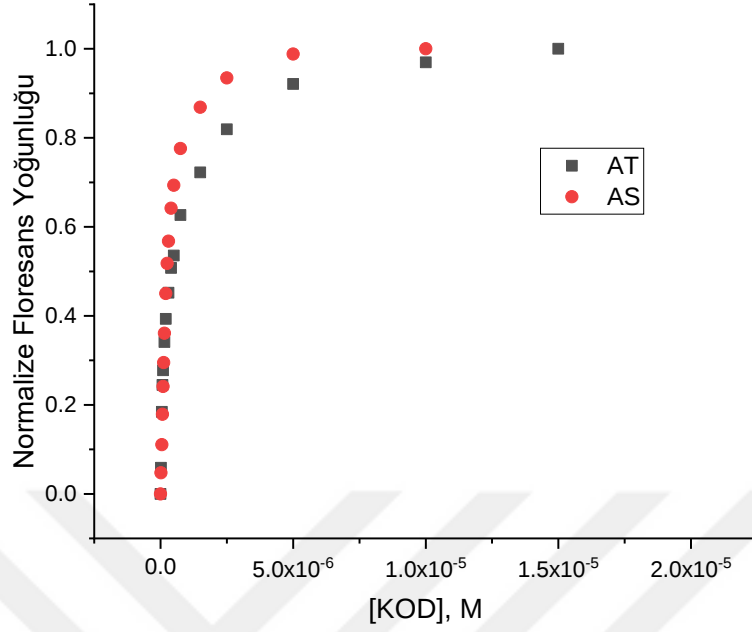
Sensör karşılaştırılması yapabilmek amacıyla AT ve AS boyalarının CB[8] ile titrasyonları karşılaştırılmıştır. Şekil 3.48'de boyaların izoterm grafikleri karşılaştırılmıştır. Sert bir azalma eğrisi olan AT, CB[8] ile daha iyi bağlanmıştır. En yüksek amplifikasyon değeri veren iki analit dekstrometorfan ve kodein AT-CB[8] ve AS-CB[8] sensörleriyle karşılaştırılmıştır. Şekil 3.49'da dekstrometorfan karşılaştırılması, Şekil 3.50'de kodein karşılaştırılması gösterilmiştir.



Şekil 3.48. AT ve AS'nın CB8 ile titrasyon karşılaştırılması



Şekil 3.49. AT-CB[8], AS-CB[8] sensörlerinin DM analiti için karşılaştırılması

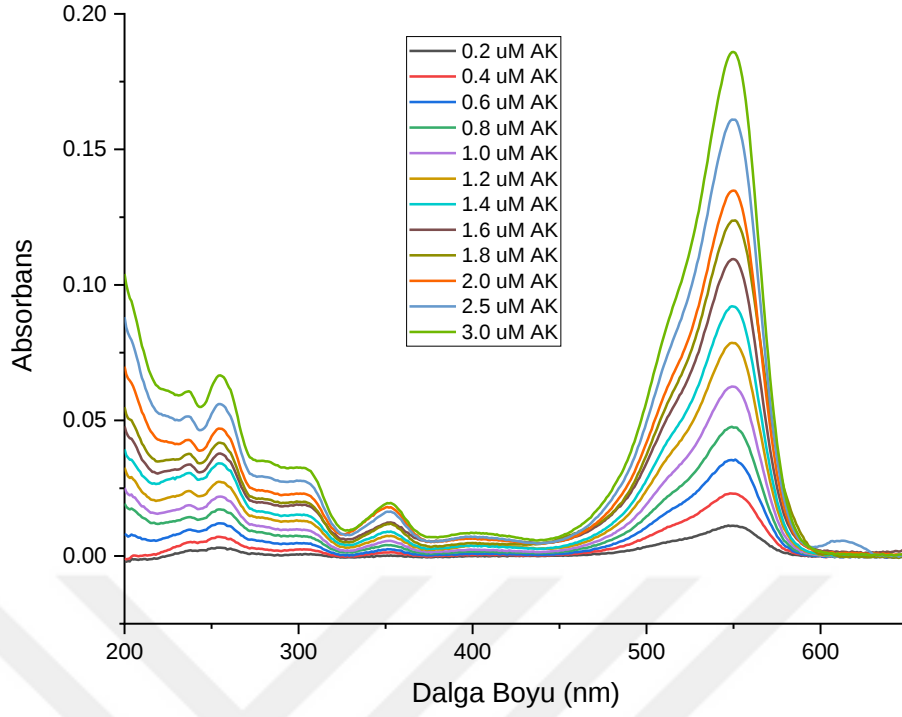


Şekil 3.50. AT-CB[8], AS-CB[8] sensörlerinin kodein analiti için karşılaştırılması

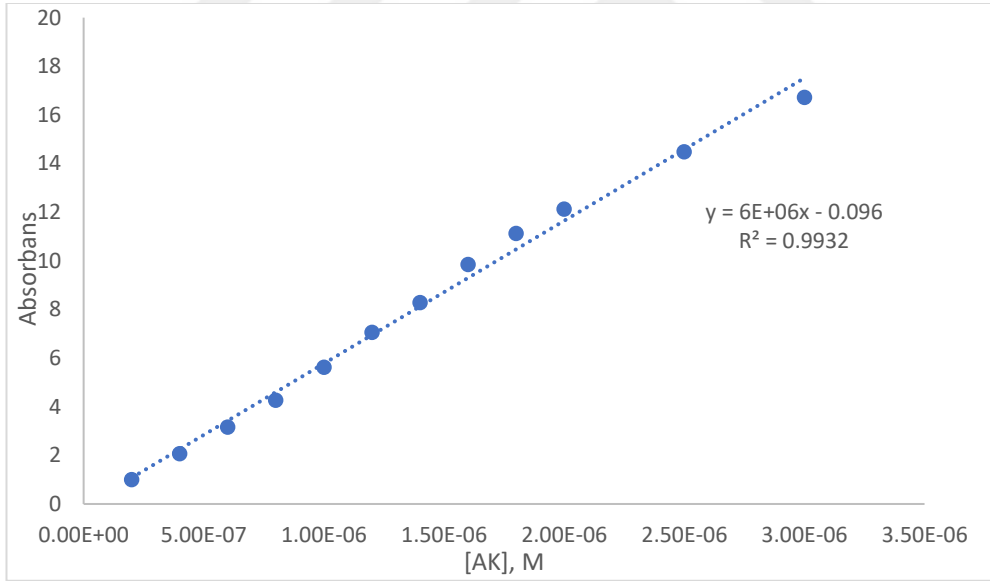
3.1.6. AK Boyasının Optik Sensörlerde Kullanımı

3.1.6.1. AK Boyası Absorbans Ölçümü

Şekil 3.51’de absorbans grafiği, Şekil 3.52’de akridin kırmızısı (AK) boyasının konsantrasyona karşı absorbans grafiğinde görüldüğü gibi doğrusal grafik elde edilmiştir. 3 μM ’a kadar doğrusal eğriyle ilerlemesi herhangi bir dimerleşme olmadığının göstergesidir.



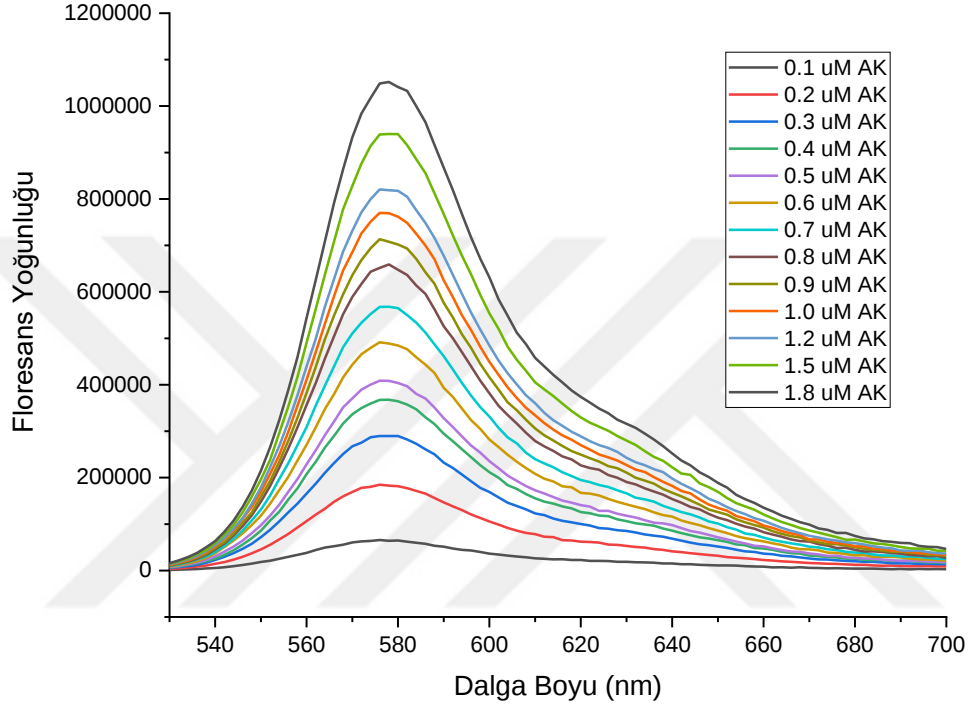
Şekil 3.51. AK boyasının absorbans kalibrasyon grafiği



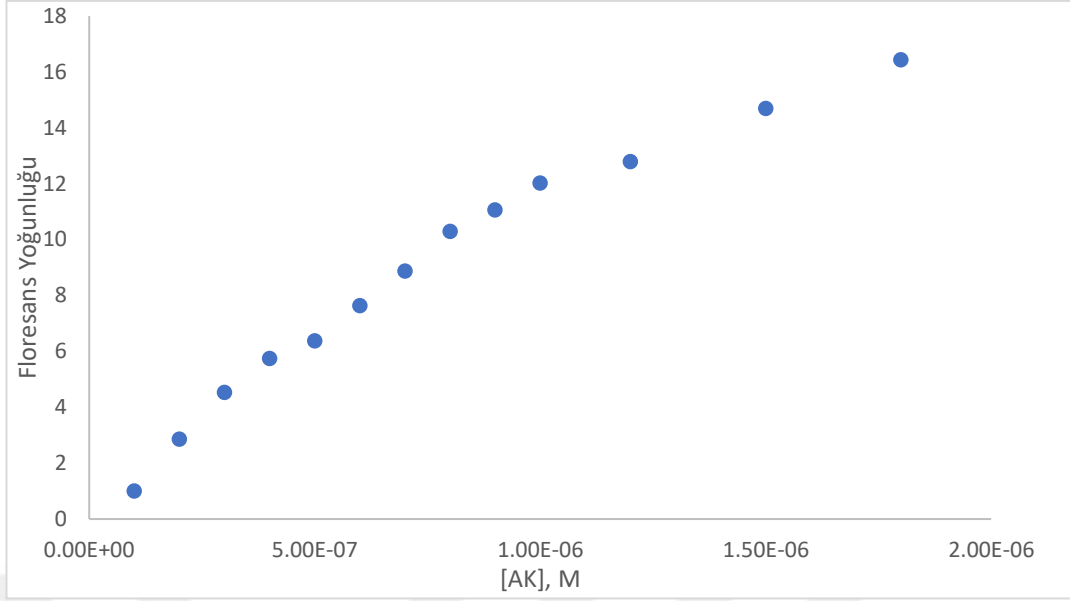
Şekil 3.52. AK boyasının konsantrasyona karşı absorbans kalibrasyon eğrisi

3.1.6.2. AK Boyası Floresans Ölçümü

Şekil 3.53'te floresans grafiği, Şekil 3.54'te AK boyasının konsantrasyona karşı floresans grafiğinde görüldüğü gibi doğrusal grafik elde edilememiştir. Absorbans ölçümlerinde doğrusal grafik elde edilmesine rağmen floresans ölçümlerinde doğrusal grafik elde edilmemiştir.



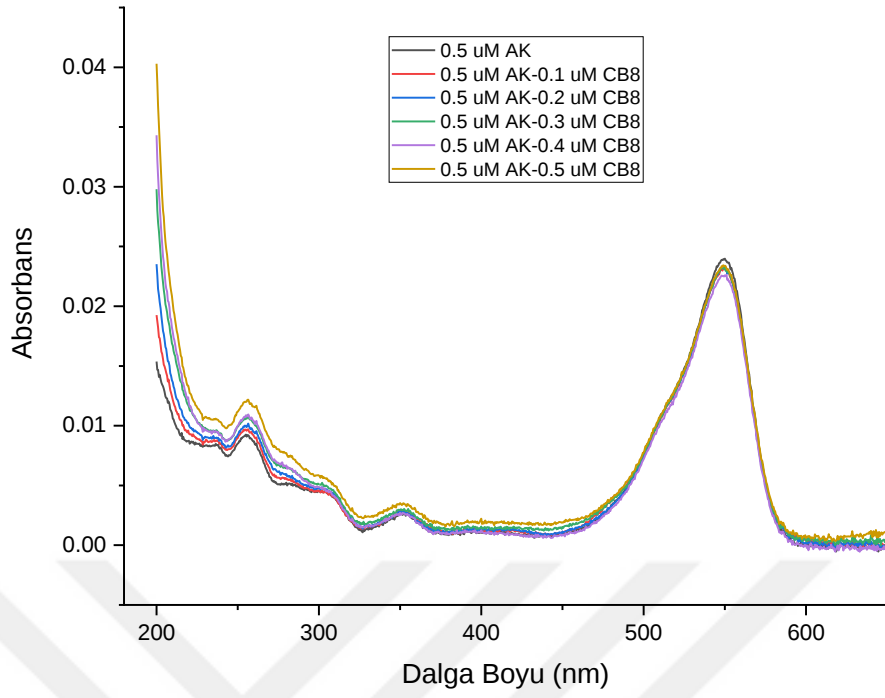
Şekil 3.53. AK boyasının floresans kalibrasyon grafiği



Şekil 3.54. AK boyasının konsantrasyona karşı floresans kalibrasyon eğrisi

3.1.6.3. AK Boyasının CB[8] ile Absorbans Titrasyonu

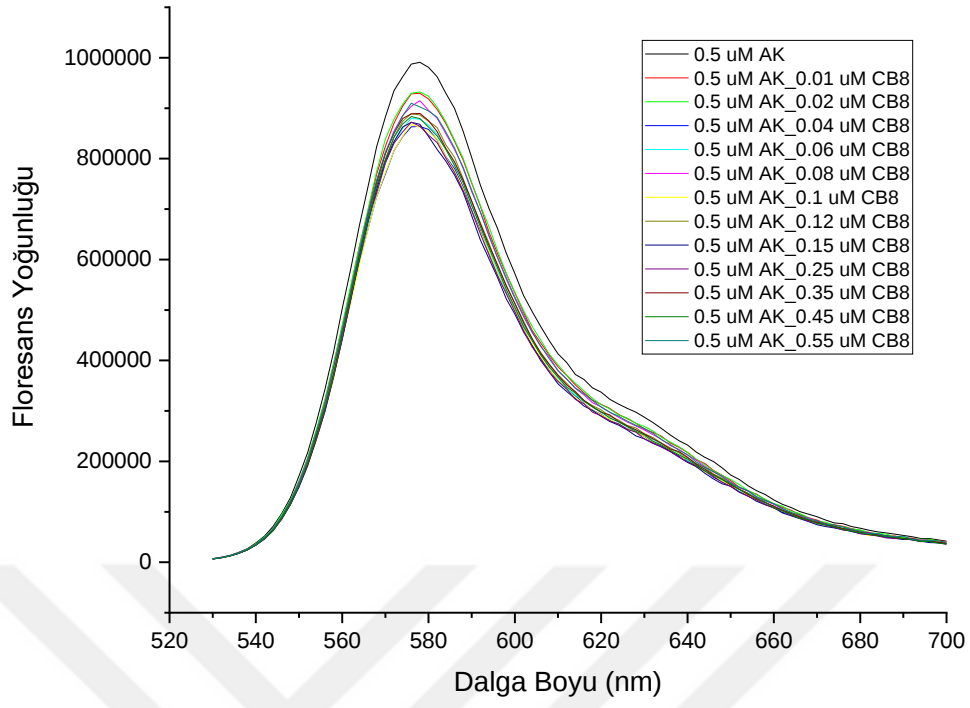
Şekil 3.55'te görüldüğü üzere 0.5 μ M AK ile CB[8] absorbans titrasyonu sulu çözeltide yapılmıştır. AK CB[8] titrasyonunda belirgin bir değişiklik olmamıştır ve izosbestik noktası 570 nm olarak belirlenmiştir.



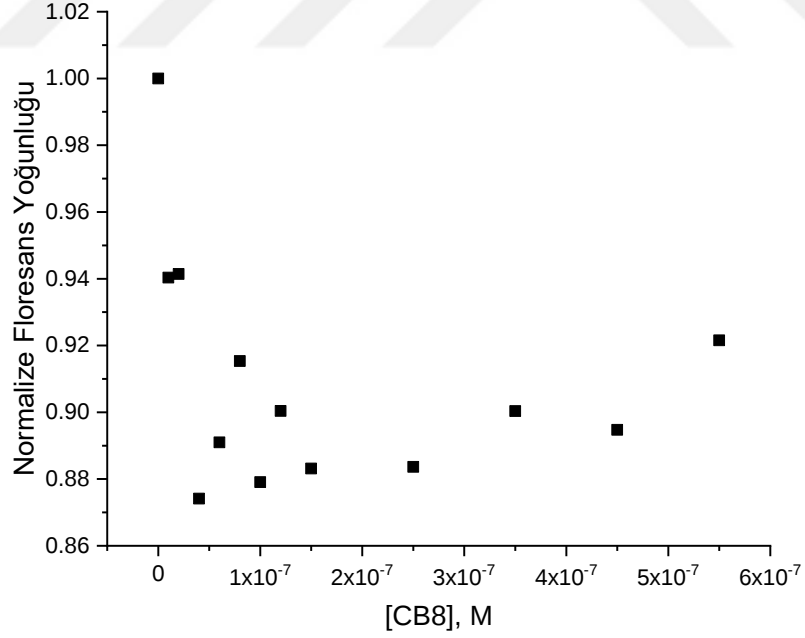
Şekil 3.55. 0.5 μM AK- CB[8] absorbans titrasyon grafiğı

3.1.6.4. AK Boyasının CB[8] ile Floresans Titrasyonu

Şekil 3.56’da görüldüğü üzere 0.5 μM AK ile CB[8] floresans titrasyonu sulu çözeltide yapılmıştır. Titrasyon grafiğinde stabil azalma veya artma elde edilemezken değışken sonuçlar izoterm grafiğinde Şekil 3.57’de gösterilmiştir.



Şekil 3.56. 0.5 μM AK- CB[8] floresans titrasyon grafiği

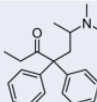
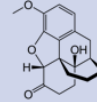
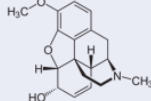
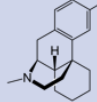


Şekil 3.57. 0.5 μM AK- CB[8] floresans titrasyon izotermini

3.1.7. Geliştirilen Optik Sensörlerin Amplifikasyon Sonuçları

Geliştirilen PK-CB[8], AT-CB[8] ve AS-CB[8] sensörlerinin indikatör yer değiştirme mekanizmasıyla, analit ve boyanın yer değiştirilmesiyle açığa çıkan boyaların amplifikasyon sonuçları Çizelge 3.4.'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. Geliştirilen optik sensörlerin boya amplifikasyon sonuçları

	Analitler	Amplifikasyon (%)		
		AS_CB8	AT_CB8	PK_CB8
	Metadon	21	0	5
	Oksikodon	46	28	33
	Kodein	87	68	40
	Dekstrometorfan	92	84	37

3.1.8. Çapraz Reaktif Dizi Sensör Sonuçları

Çapraz reaktif dizi sensörlerinden elde edilen çok değişkenli verilere linear diskriminant analizi (LDA) uygulanmıştır. LDA testi sonucunda elde edilen çapraz validasyon, özdeğerler gibi istatistik test sonuçları Çizelge 3.5' te gösterilmiştir. Sınıflandırmanın iki boyutlu grafiği Şekil 3.58'te ve üç boyutlu grafiği Şekil 3.59'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.5. LDA sonuçları

Jackknifed Classification Matrix						
	Blank	COD	DM	MET	OXY	%correct
Blank	7	0	0	1	0	88
COD	0	8	0	0	0	100
DM	0	0	8	0	0	100

Jackknifed Classification Matrix						
	Blank	COD	DM	MET	OXY	%correct
MET	2	0	0	6	0	75
OXY	0	0	0	0	8	100
Total	9	8	8	7	8	93

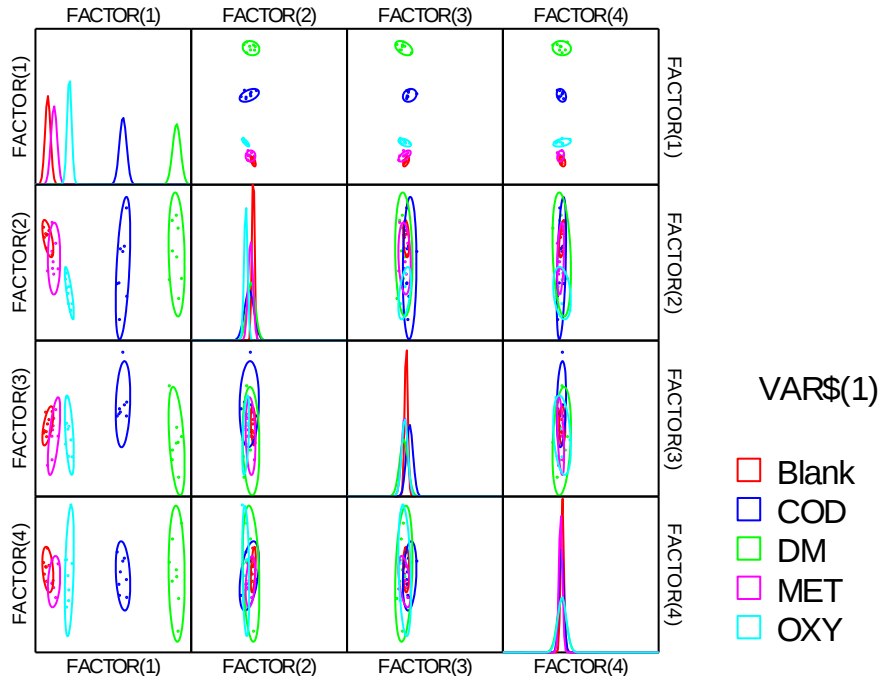
Eigenvalues
270.0940.6770.4900.037

Canonical Correlations
0.998 0.635 0.573 0.190

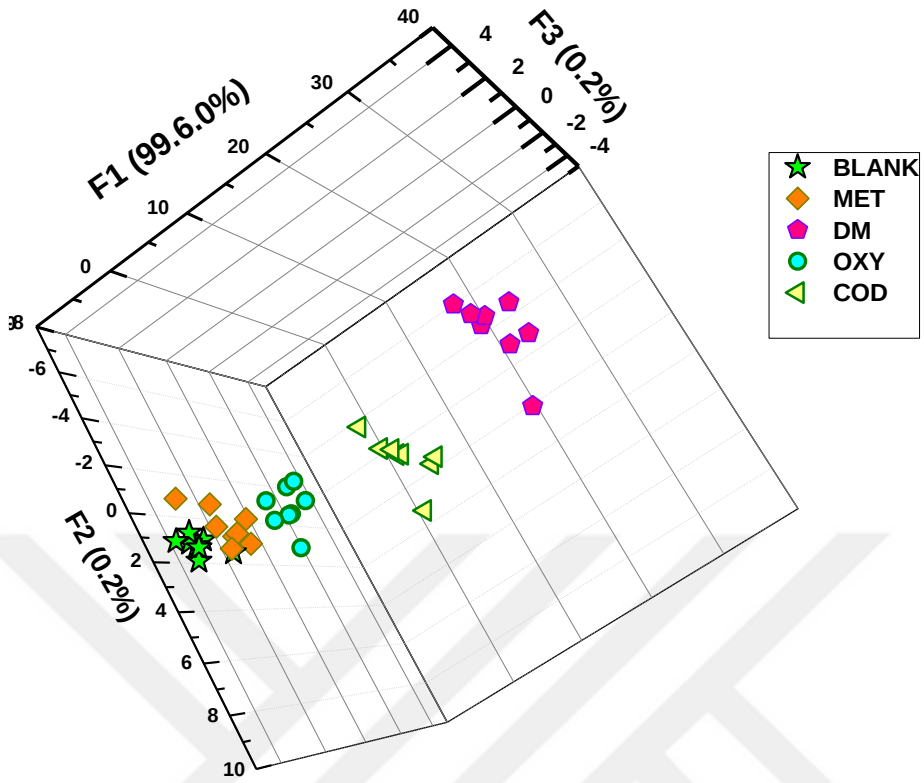
Cumulative Proportion of Total Dispersion
0.996 0.998 1.000 1.000

Test Statistic					
Statistic	Value	Approx. F-Ratio	df	p-Value	
Wilks's Lambda	0.001	13.599	36102	0.000	
Pillai's Trace	1.765	2.632	36120	0.000	
Lawley-Hotelling Trace	271.299	192.170	36102	0.000	

Canonical Scores Plot



Şekil 3.58. Kanonik skor sonuçları

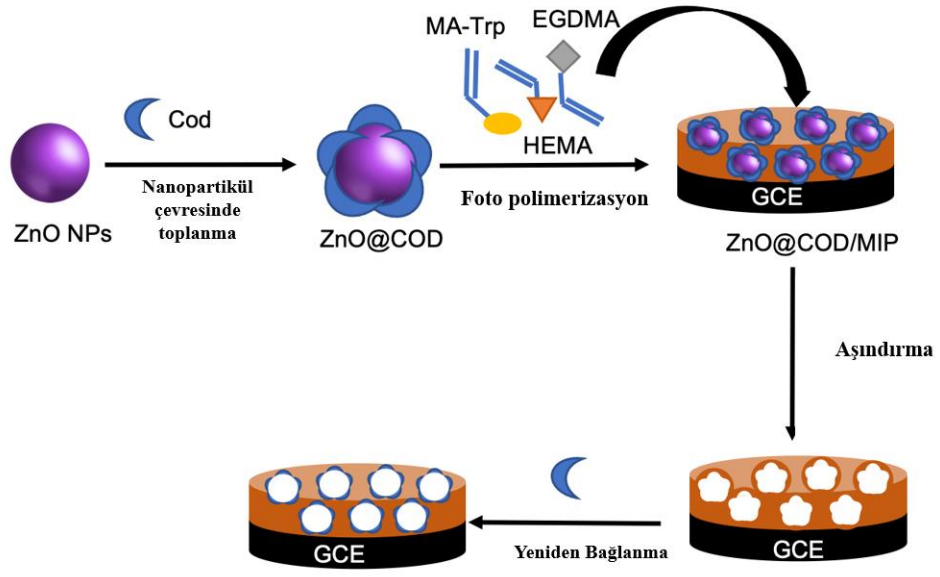


Şekil 3.59. LDA sınıflandırma grafiği

3.2. Elektrokimyasal Sensör Bulguları

3.2.1. Kodein İçin Geliştirilen Elektrokimyasal Sensörün Şematik Gösterimi

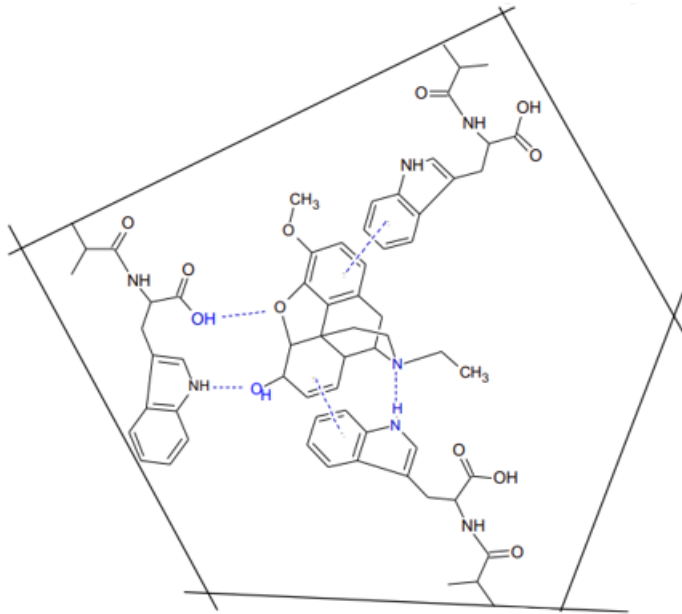
Geliştirilen MIP tabanlı elektrokimyasal sensörde öncelikle gözenek yapıcı malzeme ZnO nanopartiküllerin çevresinde hedef molekül kodein etkileşime girmektedir. Daha sonrasında, amino asit temelli MA-Trp, temel monomerlerden HEMA ve çapraz bağlayıcı monomer EGDMA ve hedef molekülün varlığında foto polimerizasyon tekniğiyle polimerik film sentezlenmiştir. Asidik ortamda aşındırma ile hedef molekül uzaklaştırılır ve tekrar yeniden bağlanmayla polimerik ağ hedef molekülü tanır. Bu işlemler Şekil 3.60'da gösterilmiştir.



Şekil 3.60. Geliştirilen elektrokimyasal sensörün şematik gösterimi

3.2.2. Kodein ve Monomer Arasındaki Olası Etkileşimler

Hedef molekül kodein ve monomer MA-Trp arasında kovalent olmayan etkileşimler hidrojen bağı ve π - π etkileşimi vardır. Olası bu etkileşimler Şekil 3.61’de gösterilmiştir.

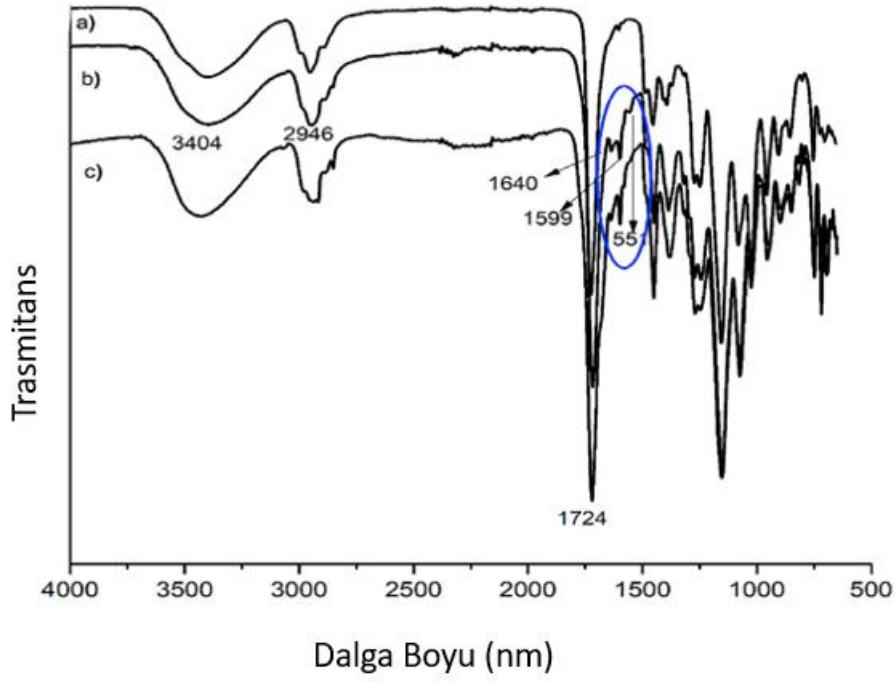


Şekil 3.61. Hedef molekül ve monomer arasındaki olası etkileşimler

3.2.3. Geliştirilen Sensörün ve Polimerik Filmin Karakterizasyonu

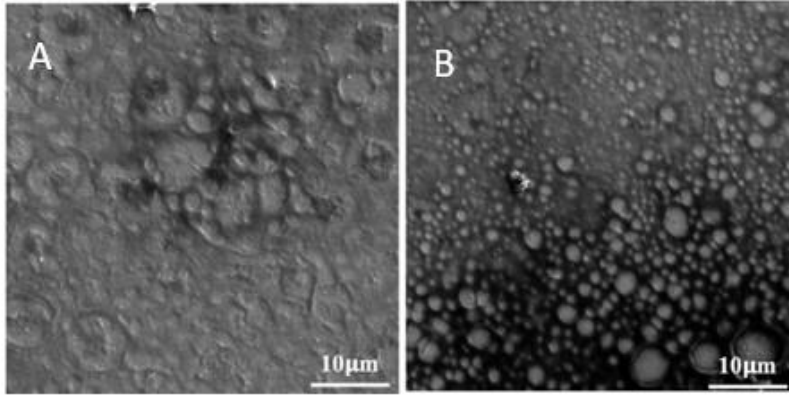
3.2.3.1. Polimerik Filmin FTIR ve Yüzey Karakterizasyonu

Geliştirilen MIP tabanlı elektrokimyasal sensörün polimerik filminin fonksiyonel grupları FTIR spektroskopisi ile incelenmiştir. Şekil 3.62.A’da HEMA molekülü, B’de MIP, C’de NIP filmlerin FTIR sonuçları gösterilmiştir.



Şekil 3.62. A) HEMA B) MIP C) NIP polimerik filmin FTIR spektrumları

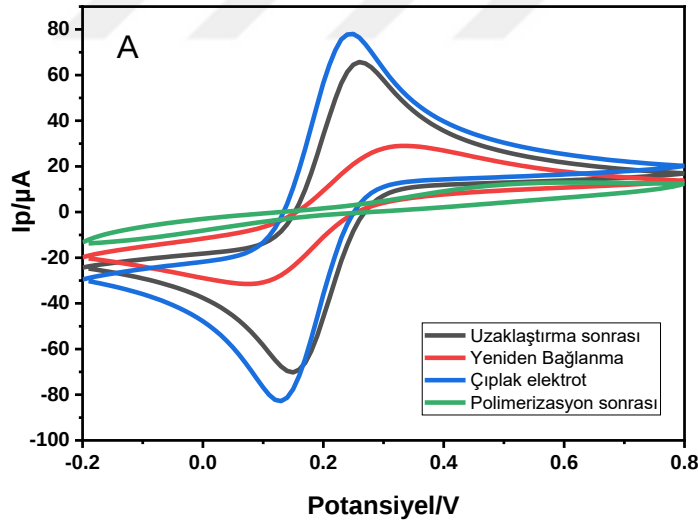
Polimerik filmin yüzey morfolojik analizi taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile yapılmıştır. Şekil 3.63.A’da NIP ve B’de MIP filmlerinin SEM görüntüleri verilmiştir.



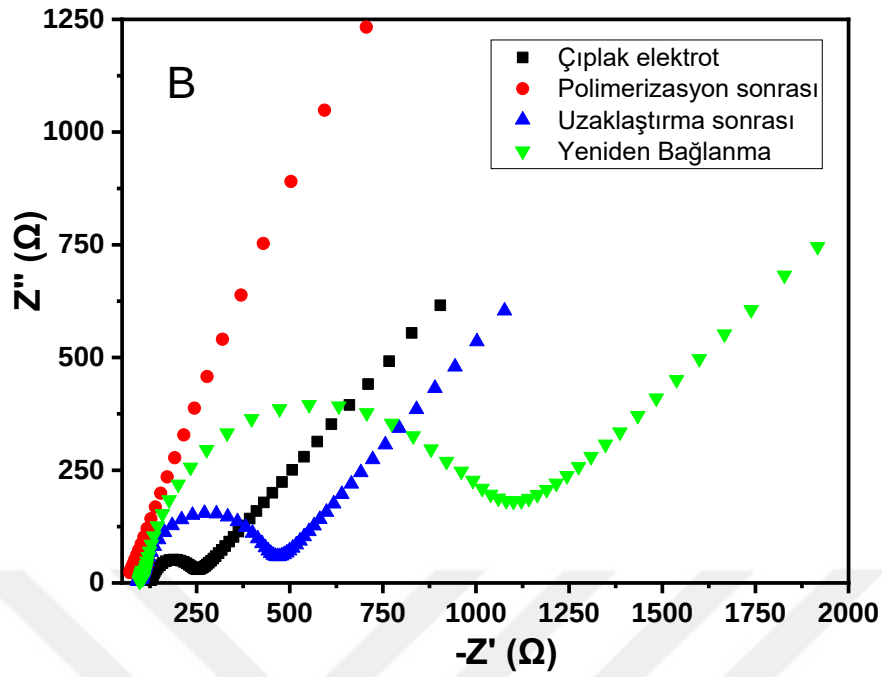
Şekil 3.63. A) NIP B) MIP polimerik filminin SEM görüntüleri

3.2.3.2. Sensörün Elektrokimyasal Karakterizasyonu

Geliştirilen sensörün elektrokimyasal karakterizasyonunda döngüsel voltametri (CV) ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) kullanılarak yük transfer direnci ve elektron transfer süreçleri değerlendirilmiştir. Şekil 3.64'te MA-Trp@MIP/GCE sensörünün CV ile Şekil 3.65'te ise EIS ile karakterizasyon sonuçları gösterilmiştir.

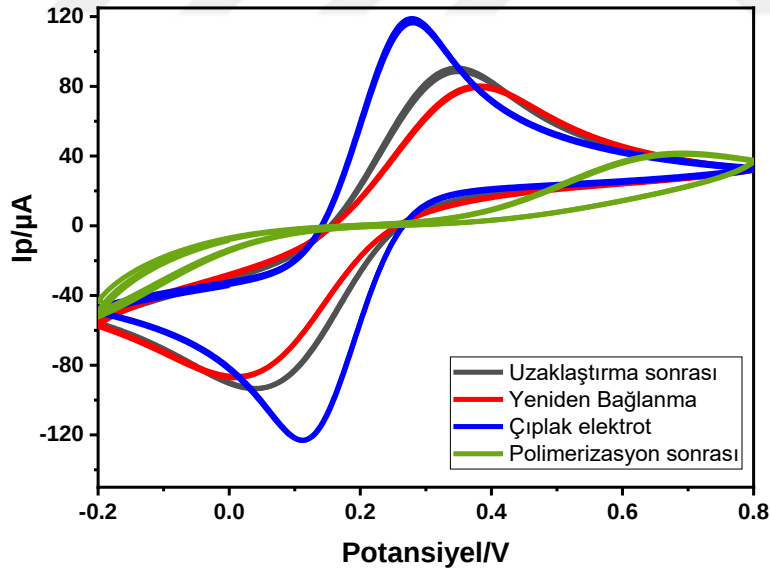


Şekil 3.64. MA-Trp@MIP/GCE sensör basamaklarının CV ile incelenmesi

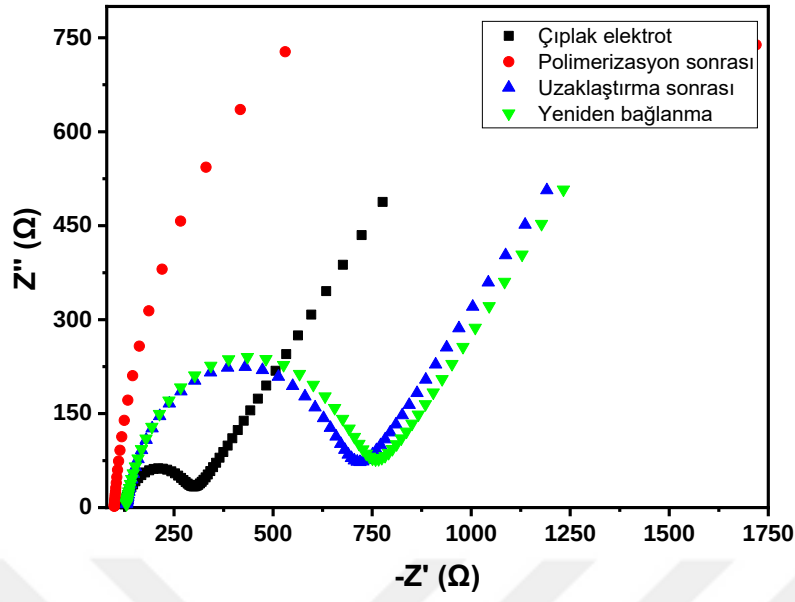


Şekil 3.65. MA-Trp@MIP/GCE sensör basamaklarının EIS ile incelenmesi

Hedef molekül olmadan geliştirilen NIP sensör için de CV (Şekil 3.66) ve EIS (Şekil 3.67) ölçümleri alınmıştır.



Şekil 3.66. MA-Trp@NIP/GCE sensör basamaklarının CV ile incelenmesi

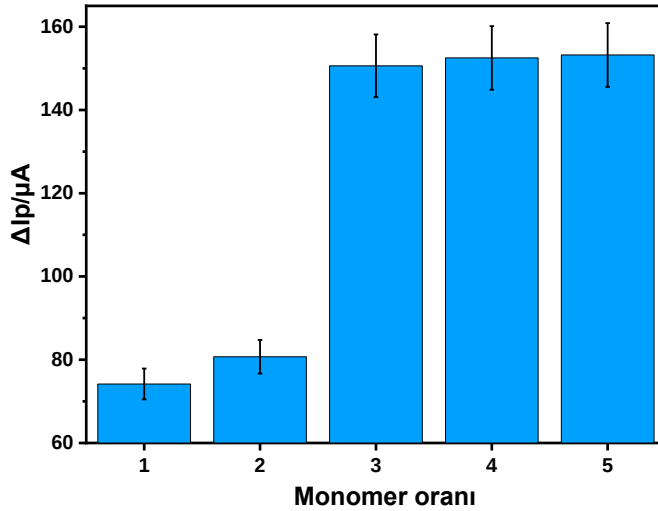


Şekil 3.67. MA-Trp@NIP/NIP sensör basamaklarının EIS ile incelenmesi

3.2.4. MIP Sensörün Optimizasyon Parametreleri

3.2.4.1. Monomer-Hedef Molekül Oranı

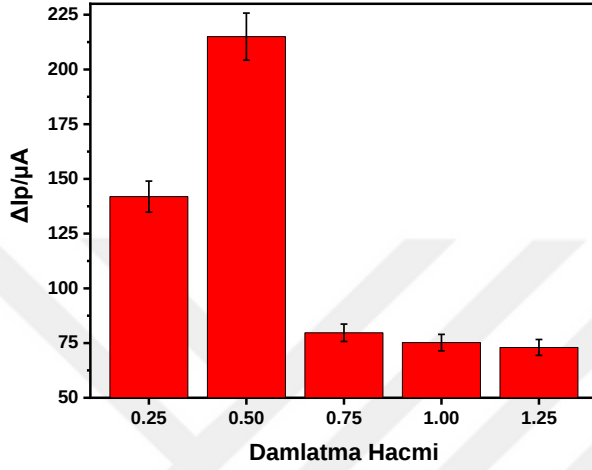
Şekil 3.68’de monomer-hedef molekül oranları (1:1, 2:1, 3:1, 4:1 ve 5:1) incelenmiştir. DPV tekniğiyle polimerizasyon sonrası ile uzaklaştırma işlemi sonrasındaki akım farkı hesaplanarak en yüksek oran 3:1 (MA-Trp:KOD) olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.68. Farklı monomer oranlarının akım grafiği

3.2.4.2. Polimerizasyon Çözeltisinin Damlatma Hacmi

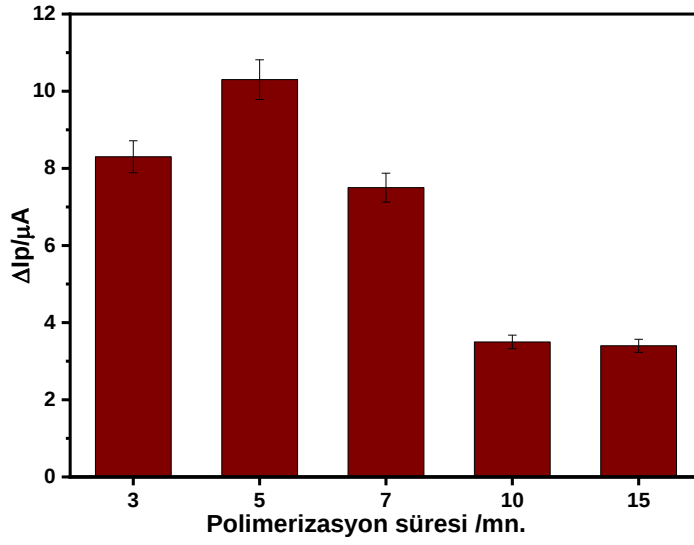
Polimerizasyon çözeltisinin damlatma hacmi parametre optimizasyonu 5 farklı hacimde (0.25, 0.5, 0.75, 1.0 ve 1.25 μL) değerlendirildi. Şekil 3.69’da gösterildiği gibi DPV tekniğiyle polimerizasyon sonrası ile uzaklaştırma işlemi sonrasındaki akım farkı hesaplanarak en optimum oran 0.5 μL olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.69. Damlatma hacminin akım grafiği

3.2.4.3. Foto polimerizasyon Süresi

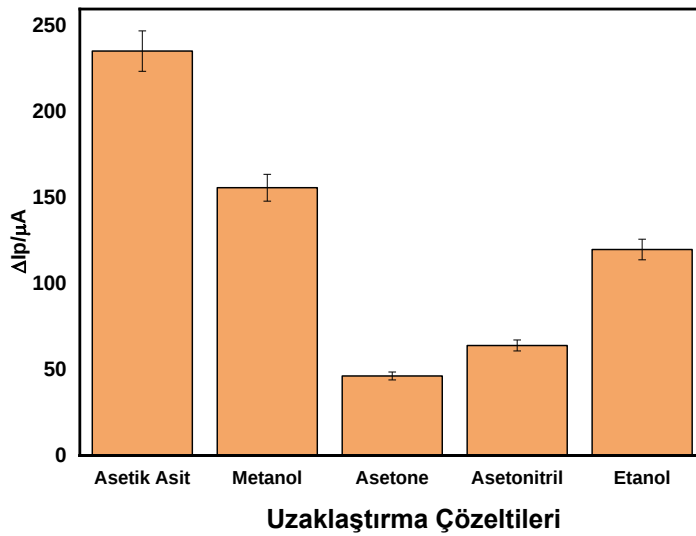
0.5 μL olarak belirlenen polimerik çözelti miktarından sonra, bu çözeltinin foto polimerizasyon süresi de optimize edilmelidir. Elektrot yüzeyinde stabil bir polimerik film oluşturmak için 365 nm’de UV lambası altında 0.5 μL polimerizasyon çözeltisi damlatıldıktan sonra 3, 5, 7, 10 ve 15 dakika UV ışık altında bırakıldı. Şekil 3.70’te gösterildiği gibi DPV tekniğiyle polimerizasyon sonrası ile uzaklaştırma işlemi sonrasındaki akım farkı hesaplanarak en uygun foto polimerizasyon süresi 5 dakika olarak belirlenmiştir.



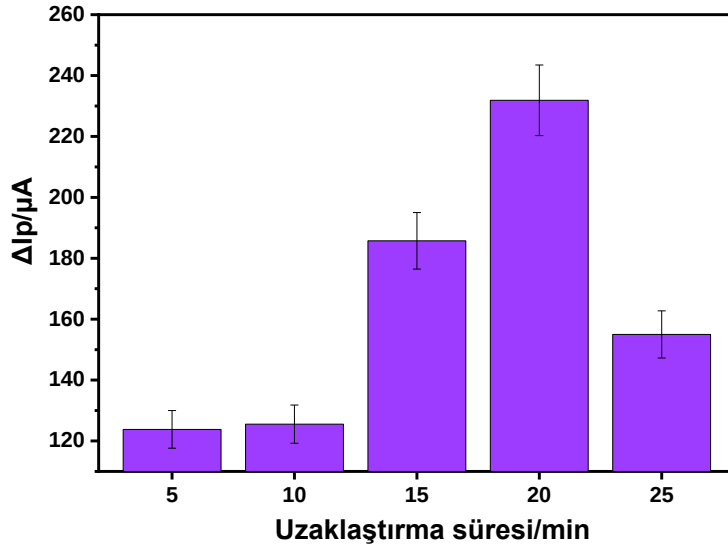
Şekil 3.70. Polimerizasyon süresi akım grafiği

3.2.4.4. Uzaklaştırma Çözeltileri ve Süresi

Diğer bir en önemli optimizasyon parametresi hedef molekülün uzaklaştırma süresi ve zamanıdır. Şekil 3.71’de gösterildiği gibi DPV tekniğiyle polimerizasyon sonrası ile uzaklaştırma işlemi sonrasındaki akım farkı hesaplanarak en uygun çözücü asetik asit olarak belirlenmiştir. Polimerik ağıdan hedef molekülü asetik asit içerisinde uzaklaştırmak için 5 ila 25 dakika arasındaki birden fazla çıkarma süresi değerlendirilmiştir. Şekil 3.72’de gösterildiği gibi en yüksek akım değerine 20 dakika sonunda ulaşılmıştır.



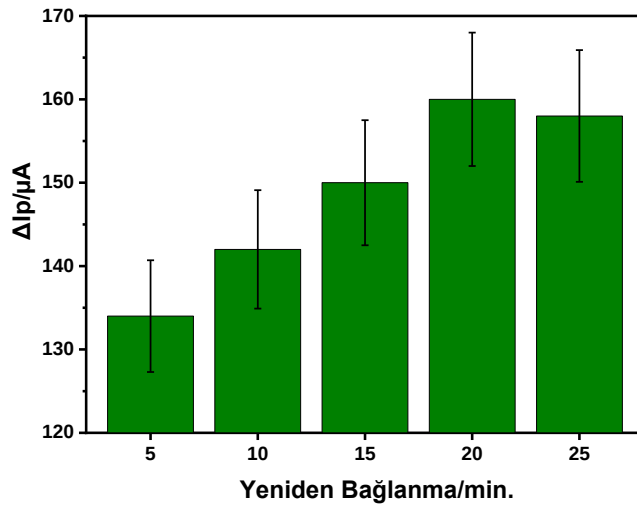
Şekil 3.71. Uzaklaştırma çözeltileri akım grafiği



Şekil 3.72. Uzaklaştırma süresi akım grafiği

3.2.4.5. Yeniden Bağlanma Süresi

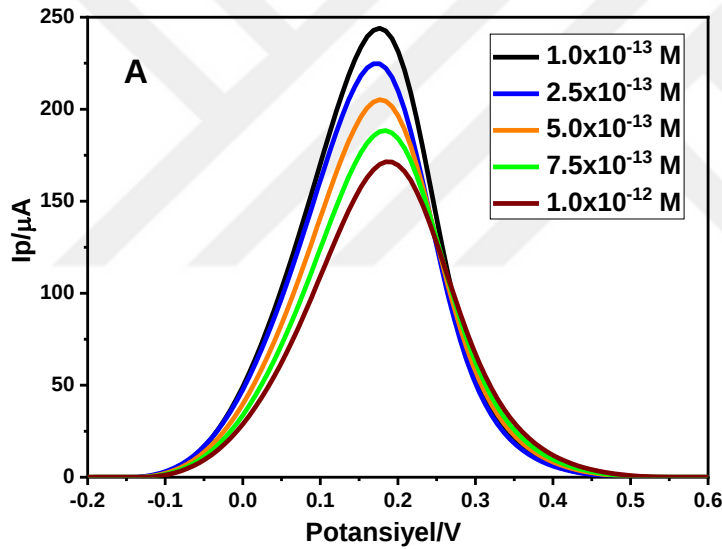
Hedef molekülün yeniden bağlanma süresi geliştirilen sensörün analitik performansını ve tanıma sürecini doğrudan etkiler. Şekil 3.73'te gösterildiği gibi 5×10^{-13} M kodein çözeltisi 5 ile 20 dakika aralığında farklı inkübasyon süresinde incelenmiştir. Çıkarma işlemi sonucunda oluşan gözeneklere hedef molekülün yeniden bağlanması 20 dakika sonucunda tamamlanmıştır.



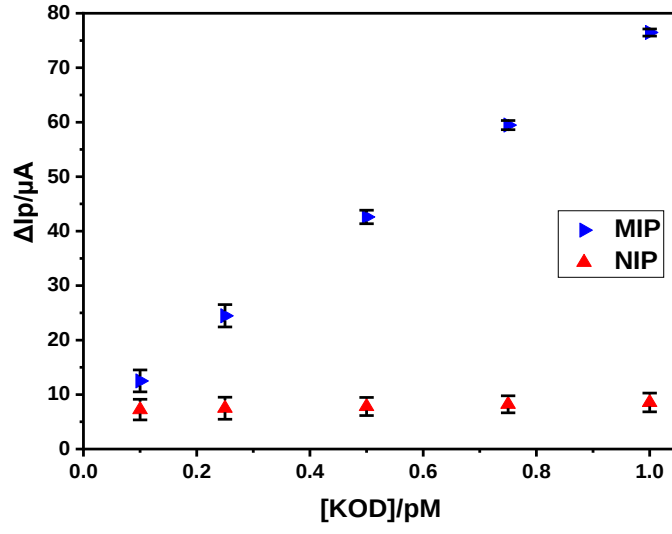
Şekil 3.73. Yeniden bağlanma süresi akım grafiği

3.2.5. Geliştirilen Sensörün Analitik Uygulaması

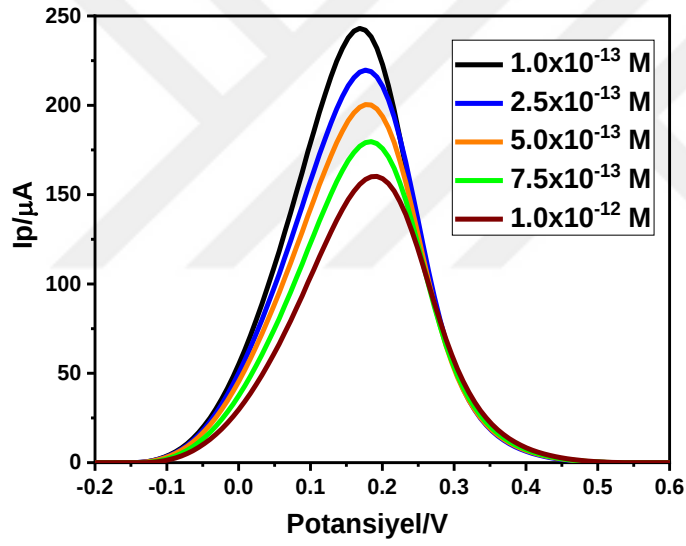
Geliştirilen MA-Trp@MIP/GCE sensörünün analitik performansının değerlendirilebilmesi için bazı regresyon verileri ve validasyon parametreleri hesaplanmıştır. Bu hesaplamalar DPV tekniği kullanılarak kodein yeniden bağlanmasından sonra değerlendirilmiştir. Standart çözelti, ticari serum ve idrar çözeltisinde kalibrasyon grafikleri ve eğrileri elde edilmiştir. Standart çözelti içerisinde DPV voltamogramı Şekil 3.74'te kalibrasyon eğrisi 3.75'te gösterilmiştir. Ticari serum çözeltisi içerisinde DPV voltamogramı Şekil 3.76'da kalibrasyon eğrisi 3.77'de gösterilmiştir. İdrar çözeltisi içerisinde DPV voltamogramı Şekil 3.78'de kalibrasyon eğrisi 3.79'da gösterilmiştir. Ayrıca regresyon parametreleri Çizelge 3.6'da gösterilmiştir. Geliştirilen sensörün tekrarlanabilirliğini incelemek için elektrot desikatörde tutulmuştur ve üçüncü günün sonunda elektrot performansı %92 olarak elde edilmiştir.



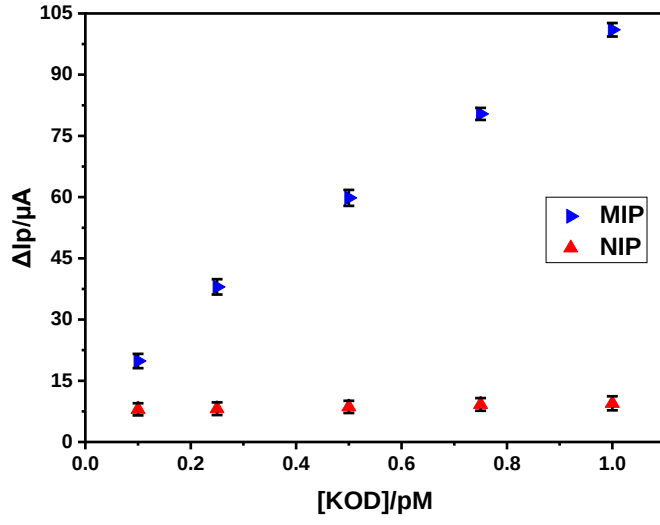
Şekil 3.74. Kodein'in standart çözelti içerisinde DPV voltamogramı



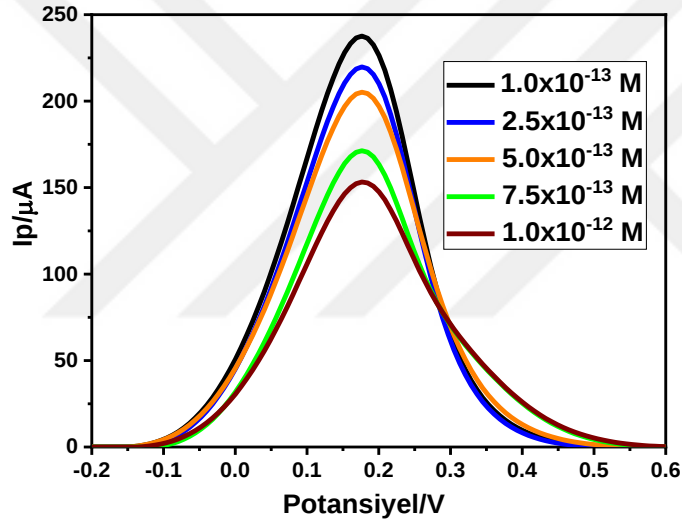
Şekil 3.75. Kodein'in standart çözelti içerisinde kalibrasyon grafiği



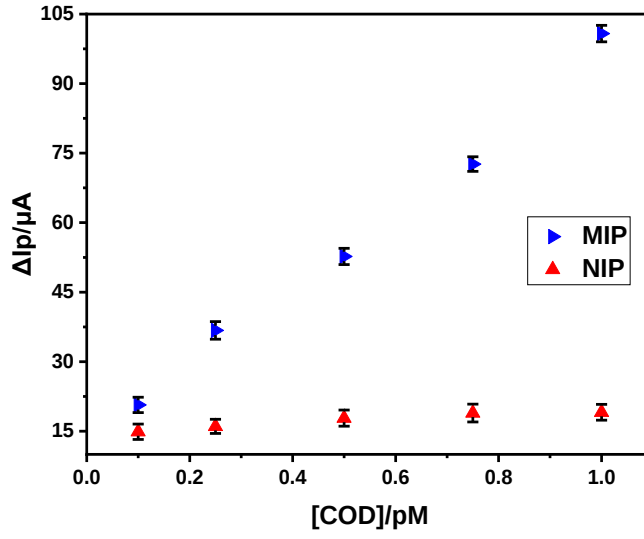
Şekil 3.76. Kodein'in ticari serum içerisinde DPV voltamogramı



Şekil 3.77. Kodein'in ticari serum içerisinde kalibrasyon grafiği



Şekil 3.78. Kodein'in idrar çözeltisi içerisinde DPV voltamogramı



Şekil 3.79. Kodein'in idrar çözeltisi içerisinde kalibrasyon grafiği

Çizelge 3.6. MA-Trp@MIP/GCE sensörlerinin KOD için kalibrasyon eğrisine ait regresyon verileri ve validasyon parametreleri

	Standart Çözelti	Serum Çözeltisi	İdrar Çözeltisi
Doğrusal çalışma aralığı (pM)	0.1-1.0	0.1-1.0	0.1-1.0
Eğim (μA/M)	6.96×10^{13}	8.85×10^{13}	8.53×10^{13}
Eğimin standart hatası	1.02×10^{12}	3.26×10^{12}	4.89×10^{12}
Kesişim (μA)	7.02	13.79	12.39
Kesişimin standart hatası	0.84	2.00	3.00
Korelasyon katsayısı (r)	0.999	0.998	0.995
Teşhis sınırı (pM)	0.0150	0.0193	0.0108
Tayin alt sınırı (pM)	0.0500	0.0644	0.0359
Tekrarlanabilirlik (BSS%)*	0.66	0.88	1.36
Tekrar üretilebilirlik (BSS%)*	1.24	1.69	1.87

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

3.2.6. Geliştirilen Sensörün Gerçek Örneklerle Uygulanması

Geliştirilen MA-Trp@MIP/GCE sensörü gerçek örneklerde tablet, serum ve idrarda incelenmiştir. Geri kazanım çalışmalarıyla, bilinen konsantrasyonda kodein bu örneklerle eklenmiş ve geliştirilen sensörle kodein miktarı hesaplanmıştır. Çizelge 3.7’de geri kazanım deneylerinin sonuçları gösterilmiştir.

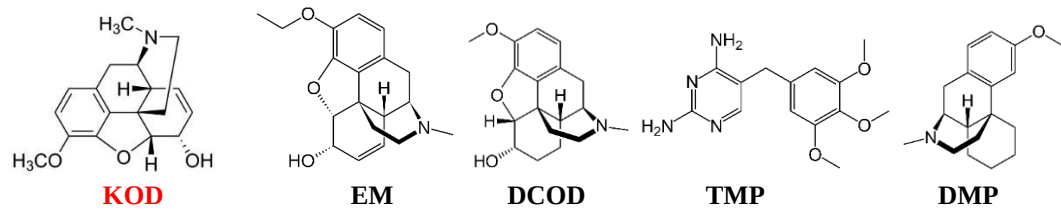
Çizelge 3.7. Tablet ve biyolojik numunelerde geri kazanım deneylerinin sonuçları

	Standart Çözelti	Serum Çözeltisi	İdrar Çözeltisi
Etiket miktarı (mg)	30.000	-	-
Bulunan miktar (mg)*	30.075	-	-
Bağlı Standard sapma (BSS)%*	0.546	-	-
Bağlı hata (BH)%	0.250	-	-
Eklenen miktar (mg)	1.000	1.000	1.000
Bulunan miktar (mg)*	1.003	1.009	1.013
Geri kazanım (%)	101.51	101.42	98.54
BSS%	0.631	1.488	0.622
BH%	0.300	0.800	1.300

*Elde edilen %BSS değerlerinin ölçüm sayısı 5’dir.

3.2.7. Seçicilik Çalışması

Geliştirilen sensörün seçicilik etkinliğini değerlendirmek amacıyla yapısal olarak kodeine benzeyen moleküller etil morfin (EM), dihidrokodein (DCOD), trimetoprim (TMP) ve dekstrometorfan (DMP) kullanılmıştır. DPV ölçümleriyle seçicilik katsayısı (k) değeri hesaplanmıştır. Çizelge 3.8’de MIP ve NIP sensörleri için k değeri ve MIP’lerin spesifik tanıma özelliklerini belirten bağlı seçicilik katsayısı ($k' = k_{MIP}/k_{NIP}$) gösterilmiştir.

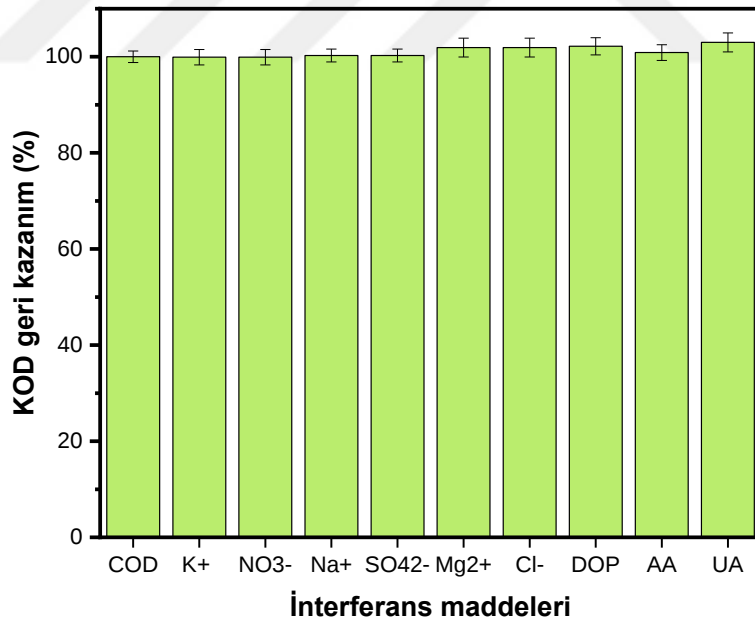


Çizelge 3.8. Geliştirilen sensörün seçicilik sonuçları

	MIP (k)	NIP (k)	COEFFICIENT (k')
KOD	-	-	-
EM	2.27	0.60	3.78
DCOD	2.33	0.65	3.58
TMP	5.19	0.91	5.72
DMP	2.14	0.60	3.57

3.2.8. İnterferans Çalışması

Geliştirilen sensör biyolojik sıvılarda bulunan K^+ , Cl^- , Na^+ , SO_4^{2-} , dopamin (DA), askorbik asit (AA), ürik asit (UA) ve parasetamol (PAR) gibi girişim yapan maddelerin etkisi test edilmiştir. Şekil 3.80’de 1:10 oranında (kodein-interferans çözeltileri) geri kazanım sonuçları gösterilmiştir.



Şekil 3.80. Kodein tayininde farklı maddelerin interferans etkisi

4. TARTIŞMA

Doktora tez kapsamında opioid ilaçlar için optik ve elektrokimyasal sensör geliştirilmiştir. Optik sensör sistemi iki farklı kükürbitürl sınıfından reseptör CB[7], CB[8] ile üç farklı boya akridin sarısı, akridin turuncusu ve piridin kumarin kullanılarak geliştirilmiştir. Bu sistemde dört farklı opioid analiti kodein, metadon, dekstrometorfan ve oksikodon analizi gerçekleştirilmiştir. Elektrokimyasal sensör kısmında ise MIP kullanılarak kodein için seçici sensör geliştirilmiştir. Baskılı polimer sisteminde özel amino asit temelli MA-Trp monomeri ve çapraz bağlayıcı, gözenek yapıcı malzeme kullanılmıştır. Kodein analiti için seçici olan bu sensör güçlü analitik performans sergileyerek gerçek numunelerde test edilmiştir.

Tezin giriş bölümünde opioid analjezikler hakkında genel bilgiler, bu ilaçların ortaya çıkarabileceği olumsuz yönler ve ilaçların tespiti için geliştirilen güncel analitik yöntemler anlatılmıştır. Opioidlerin tespiti için geliştirilen optik ve elektrokimyasal sensörler hakkında genel bilgiler verilmiştir. Sensörlerde kullanılan iki farklı yaklaşım olan direk algılama ve çapraz reaktivite anlatılmıştır. Optik sensör sisteminde kullanılan reseptörlerden kükürbitürillerin fiziksel özellikleri, kullanım alanları ve sensör olarak nasıl kullanılabileceğine dair bilgiler verilmiştir. İndikatör olarak kullanılan üç farklı boyanın özellikleri ve optik sensörlerde kullanımı literatürden örneklerle açıklanmıştır. Elektrokimyasal sensör sisteminde kullanılan moleküler baskılı polimerin prosesi ve bileşenleri anlatılmıştır. Geliştirilen elektrokimyasal sensörün polimerik ağ sentezi sırasında kullanılan her bir kimyasalın görevi ve yöntemi anlatılmıştır.

Gereç ve yöntem bölümünde ise deneyler sırasında kullanılan kimyasal malzemeler, kullanılan tüm çözeltilerin hazırlanışı, boya sentezi, gerçek numune örneklerinin hazırlanması, geliştirilen sensörlerin hazırlanması, cihaz ve ekipmanlar ve karakterizasyon teknikleri anlatılmıştır.

Bulgular bölümü optik sensör sonuçları ile başlamıştır. Optik sensörlerde indikatör yer değiştirme mekanizması kullanılarak reseptör CB'lerin içerisine öncelikli olarak boyaların bağlanması, sonrasında CB'ler ile daha güçlü bağlanan analitlerin varlığında boya ile analitin yer değiştirmesi amaçlanmıştır. Böylece ilk olarak boyanın sönümlenmesi (turn off- kapanma) sonrasında ise boyanın tekrar ortaya çıkmasıyla (turn on-açılma) optik özelliklerinde

değişiklik meydana gelmiştir. Literatürde bulunmayan PK boyası yüksek saflıkta sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir. Optik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla altı farklı çözücü içerisinde absorbans değeri incelenmiştir ve en yüksek absorbans değeri %2 MeOH-su çözücüsünde elde edilmiştir. Fakat, incelenen altı çözücü ortamında absorbans değerlerinde çok fazla bir değişiklik elde edilememiştir. PK boyasının farklı çözücüler ortamında absorbans değerinin değişmemesi veya piklerde herhangi bir mavi veya kırmızı kayma göstermemesi solvatokromik etkiye sahip olmadığını göstermektedir. PK boyası ve CB[7] reseptörüyle sensör oluşturulmuş ve pH 2.5, 4.5 ve 7.0 ortamlarında titrasyonlar yapılmıştır. Titrasyon sonucunda en yüksek bağlanma katsayısı pH 7.0'da 1.14×10^5 olarak bulunmuştur. CB'lerin hidrofobik boşlukları ve iki özdeş karbonil saçaklı portalları bulunmaktadır. Bu boşlukların içerisine hidrofobik fenil veya alkil grupları olan bileşikler, negatif yüklü karbonil grubuyla ise pozitif yüklü bileşiklerin etkileşime girmesi beklenir. CB'lerin portalda bulunan karbonil grubunun negatif yüklü olması asidik ortamda (pH 2.5) iyonik etkileşimlerden dolayı pozitif yüklü PK boyası ile CB[7] etkileşimini engellemektedir. Bu sebepten nötr ortamda, CB[7]'nin negatif yüklü karbonil grubu ile pozitif yüklü PK boyasının etkileşimi kuvvetli olduğu için bağlanma sabiti en yüksektir. Literatürde anlatıldığı gibi, CB'lerin portallarındaki karbonil grupları, pozitif yüklü organik moleküllerle supramoleküler itici kuvvetler özellikle iyon-dipol etkileşimiyle bağlanırlar (Lü et al., 2013). Nötr ortamda asidik veya bazik iyonlar olmadığı için, CB[7]'nin negatif yüklü karbonil grubu ile pozitif yüklü PK boyası iyon-dipol etkileşimiyle güçlü bir şekilde bağlanırlar. Bu bilgiler deney sonucunda en yüksek bağlanma sabitinin pH 7.0'da çıkmasını doğrulamaktadır. PK boyasının CB[7]'nin içerisine girmesiyle boya sönümlenmiş istenilen kapanma etkisi elde edilmiştir. PK boyasının %2 MeOH-su çözücüsü içerisinde pH 7.0 ortamında CB[8] ile titrasyonu yapılmıştır. PK boyası CB[8] ile de etkileşime girerek boya sönümlenmesi elde edilmiştir. PK-CB[8] sensörü 4 farklı opioid analiti ile yer değiştirmesi sonucunda boyanın serbest kalarak elde ettiği amplifikasyon değerine göre değerlendirilmiştir. Bu sonuçlardan benzer şekillere ve molekül büyüklüğüne sahip oksikodon %33, kodein %40 ve deksmetorfan %33 ile yakın amplifikasyon değerlerine sahipken 2 adet fenil grubuna ve geniş molekül yapısına sahip metadon en düşük amplifikasyon %5 sonucunu vermiştir. Yuvarlak yapıdaki CB'lerin içerisine iki fenil halkası ve halkaların arasındaki mesafeden dolayı metadonun girmesi daha zor olduğu için PK boyası ile metadon yer değiştirmesi düşük oranda gerçekleşmekte ve boya amplifikasyonu en az oranda olmaktadır.

AS ve AT boyalarının agrege olma konsantrasyonunu belirlemek amacıyla UV-VIS ve floresans spektroskopisi kullanılarak konsantrasyon değerleri artırılarak absorbans ve

floresans değerleri ölçölmüştür. Moleküller arası etkileşim sebebiyle moleküller birleşme ve düzenli yapılar oluşturma eğilimindedir, bu sebepten yeni fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip agrege yapılar oluşabilir (Xu vd., 2020). Genellikle agregasyon boyanın konsantrasyonu, çözücünün içeriği veya ortamda bulunan diğer maddelerden etkilenebilir. Bu sebepten boyanın konsantrasyonunu belirlemek önemli bir faktördür. AS, AT ve AK boyaarı için agrege olmayan konsantrasyonu bulabilmek için doğrusallığın bozulduğu konsantrasyon değerine kadar ölçömler alınmıştır. AS boyası artan konsantrasyona karşı absorbans ve floresans ölçüm sonucunda doğrusal grafik göstererek agrege olmadığını göstermiştir. Fakat AT boyası 1.5 µM'dan sonra absorbans ve floresans grafiğinde doğrusallığın bozulduğu ve yatay eğri elde edildiği görölmüştür. Literatürde yapılan birçok çalışmada AT boyasının agrege olduğunu gösterilmiştir. Katyonik AT boyası sulu olmayan çözeltilerde agrege olmazken sulu çözeltilerde H agregasyonu gözlemlenebilir ve oligomerik/monomerik oran 10^{-5} – 10^{-4} M konsantrasyon aralığında güçlü bir şekilde değişir (Shenderovich, 2019). Bu bilgiler ve deney sonucunda güvenilir konsantrasyon aralığı AT boyası için 0.5 µM olarak belirlenmiş ve bu konsantrasyon diğer boyalar için de kullanılmıştır. AK boyası artan konsantrasyona karşı absorbans ve floresans sonuçlarında genel olarak doğrusal bir grafik elde edilememiştir. Agrege olmayan boya konsantrasyonu 0.5 µM olarak belirlendikten sonra CB[8] ile titrasyonlar yapılmıştır.

AS boyasının CB[8] ile absorbans ve floresans titrasyon sonucunda boyanın sinyalinde azalış olması sönümleme etkisinin olduğunu yani konakçı molekül CB[8]'in içerisine girerek kovalent olmayan bağlar ile etkileştiiğini göstermektedir. Floresans titrasyonu 0.5 µM boyanın üzerine 0- 3.0 µM aralığında CB[8] eklenmesi sonucunda izoterm grafiğinde göröleceği üzere 0.5 µM CB[8] noktasında grafik eğrisi sabitleşmeye 1 µM'dan sonra ise tamamen stabil kaldığı görölmüştür. İzoterm grafiğinin sabitleşmeye başladığı nokta 0.5 µM CB[8] konsantrasyonu konukçu ile konağın 1:1 oranında etkileştiiğini göstermektedir. 1:1 oranında AS-CB[8] sensörü üzerine 4 farklı opioid analiti eklenerek yer değiştirme mekanizmasıyla boyanın amplifikasyon sonucunda en yüksek değer % 92 ile dekstrometorfan, % 87 ile kodein, % 46 ile oksikodon ve % 21 ile metadon elde edilmiştir. Metadon geniş molekül yapısına sahip olduğu için CB[8]'in içerisine girmesi daha zor olduğundan en düşük amplifikasyon değerine sahiptir. Hidrofobik ve yapısal büyüklük olarak benzer moleküller kodein ve dekstrometorfan çok yakın amplifikasyon değerine sahipken oksikodon yarı değere sahiptir. Oksikodon diğerlerine göre daha fazla oksijen atomuna ve karbonil grubuna sahip olduğu için elektronegativitesi daha yüksektir bu sebepten CB[8]'in yapısında bulunan

karbonil grubu itmesinden dolayı iyonik etkileşimi zayıflatır ve CB[8] ile güçlü bir bağ kuramaz ve boya amplifikasyon değeri daha düşük olur.

AT boyasının CB[8] ile absorbans titrasyonu sonucunda boyanın sinyalinde azalış, pik şeklinde değişiklik ve mavi kayma elde edilmiştir. Literatürde yapılan çalışmalarda da aynı şekilde sonuçlar elde edilmiştir. Boyanın sulu çözeltide titrasyon öncesinde ikili pik görünmesi monomer ve dimer-H agregasyon sonucu ve CB[8] ile titrasyon sonucunda kayması ise boyanın agreste olması veya kendi kendine sönümlenmesiyle ilişkilendirilmiştir (Montes-Navajas vd., 2009). Floresans titrasyon sonucunda ise boyanın sinyalinde azalış ve kırmızı kayma elde edilmiştir. Genellikle kırmızı kayma J agregasyon sonucu görülebilir. Monomerlerin birbiri ardına sıralanmasıyla dipol momentleri aynı hizaya gelir, enerji seviyesinin bölünmesine ve azalmasına sebep olur. Azalan enerji yüksek dalga boyunda yani kırmızı bölgede kaymaya sebep olur (Murata vd., 2001). Absorbans ve floresans titrasyon sonucunda elde edilen piklerdeki kayma AT boyasının agreste olabileceğini göstermektedir. AT-CB[8] izoterm grafiğinde eğrinin sabitleşmeye başladığı nokta 1:1 oranında etkileştiğini göstermektedir. 1:1 oranında AT-CB[8] sensörü üzerine 4 farklı opioid analiti eklenerek yer değiştirme mekanizmasıyla boyanın amplifikasyon sonucunda en yüksek değer % 84 ile dekstrometorfan, % 68 ile kodein, % 28 ile oksikodon ve neredeyse hiçbir değişiklik göstermeyen % 0 ile metadon elde edilmiştir. CB[8] içerisine en iyi fit olan elektronegativitesi düşük dekstrometorfan ve kodein'dir. Elektronegativitesi yüksek oksikodon, fenil halkaları ve halkalar arasındaki mesafeden dolayı metadonun CB[8] ile etkileşimleri daha düşüktür. Böylece boya ile yer değiştirmesi zor olmasından düşük amplifikasyon sonucu vermektedirler.

AT ve AS boyaalarının CB[8] ile oluşturduğu sensörlerin izoterm grafikleri karşılaştırılmıştır. Sert ve belirgin bir eğriyle azalan AT boyası AS'ye göre CB[8] ile daha iyi bağlanmışır. En yüksek amplifikasyon değeri veren iki analit dekstrometorfan ve kodein AT-CB[8] ve AS-CB[8] sensörleriyle izoterm grafikleri karşılaştırılmıştır. AS boyasının analitlerle etkileşim izoterm grafiğı sert ve belirgin eğri göstermesi ve boya amplifikasyon sonuçlarının daha yüksek olması CB[8] ile etkileşiminin AT boyasına göre daha düşük olmasından kaynaklanmaktadır. Bu bulgu AS-CB[8] titrasyon sonucunu doğrulamaktadır.

AK boyasının agreste olup olmadığını anlamak amacıyla konsantrasyon arttıkça absorbans ve floresans ölçümleri yapılmıştır. Absorbans grafiğinde doğrusal eğri elde edilirken floresans grafiğinde yaklaşık 1 μM 'dan sonra doğrusallık bozulması agreste olduğunun göstergesidir. Bu sebepten CB[8] ile titrasyonu 0.5 μM AK boyası kullanarak yapılmıştır. Absorbans titrasyon sonucunda pikte belirgin bir azalış olmazken floresans

titrasyon sonucunda ise doğrusal bir azalış veya artış elde edilememiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda AK boyası ile CB[8] etkileşiminin olmadığı anlaşılmıştır. AK boyası AS ve AT boyalarından farklı olarak düzlemsel molekülde oksijen hetero atomu içermesi sebebiyle CB'nin karbonil grubuyla itici kuvvetler göstererek etkileşimi engeller. Bu sebepten AK boyası sensör olarak kullanılmamıştır.

Dizi sensör çalışması LDA çapraz validasyonunda analitler 93% oranında sınıflandırılmıştır. İki ve üç boyutlu grafiklerle ve elde edilen skor sonuçlarıyla analitlerin başarılı bir şekilde sınıflandırılması elde edilmiştir.

Elektrokimyasal sensör kısmında kodein analiti için MIP temelli hassas, seçici ve yüksek analitik performans gösteren sensör indirekt yöntemle ferri/ferro üzerinden takip edilmiştir. Sentezlenen polimerik yapıda gözenek yapıcı ZnO nanopartikülleri kullanarak oluşturulan gözeneklerde hedef molekülün daha iyi bağlanması amaçlanmıştır. Amino asit temelli MA-Trp monomeri özellikle kodein ile kovalent olmayan etkileşimler güçlü hidrojen bağ yapabilme ve π - π etkileşimleriyle bağlanmasından dolayı seçilmiştir. Monomerin yapısında bulunan amino ve karboksil grupları sayesinde hidrojen donör ve alıcı özellik göstererek kodein ile kovalent olmayan etkileşimle bağlanabilir. Ayrıca monomerin yapısında bulunan fenil grubu ile kodeinin yapısında bulunan fenil π - π etkileşimleriyle hedef molekül-monomer bağına güçlendirir. Polimerik yapıda monomer ile bağlanmayı ve stabil yapıyı oluşturmak amacıyla temel monomer HEMA ve çapraz bağlayıcı monomer EGDMA kullanılmıştır. Oluşturulan polimerik yapı içeren çözeltiye 2-hidroksi-2-metilpropiofenon başlatıcısı eklenerek foto polimerizasyon yöntemiyle elektrot yüzeyinde polimerik film sentezlenmiştir. Sentezlenen polimerik film FTIR yöntemiyle karakterize edilmiştir. Özellikle kontrol sensör olarak geliştirilen NIP sensör ile MIP sensör karşılaştırılması yapılmıştır. Polimerik yapıda bulunan karbon hidrojen gerilmeleri ve çeşitli fonksiyonel grupların varlığı bu yöntemle ispat edilmiştir. 3404 cm^{-1} 'deki pik OH gerilmesi ve 2946 cm^{-1} 'deki ise C-H gerilmesini gösterir. Ayrıca polimerik filmlerdeki amid I (1640 cm^{-1}), amid II (1551 cm^{-1}) ve indolün (CC halkası, 1599 cm^{-1}) pikleri de fonksiyonel grupların varlığını ispatlar. MIP ve NIP polimerik filmlerinin ikisi de monomer MA-Trp'yi içermesi nedeniyle belirgin bir fark görülemedi. Polimerik film yüzey morfolojisi SEM ile incelenmiştir ve MIP yüzeyinin özellikle pürüzlü ve gözenekli morfolojiye sahip olduğunu gösterir. Bu gözenekli yapı sayesinde hedef molekül tanıma bölgelerine kolayca erişir ve sağlam bir yüzey oluşturur. MIP yüzeyi daha fazla gözenek ve heterojen dağılıma sahipken NIP yüzeyi daha düz bir yüzeye sahiptir.

Geliştirilen MIP ve NIP sensörleri CV ve EIS elektrokimyasal yöntemleriyle karakterize edilmiştir. Elektrokimyasal davranış, çıplak elektrot, polimerizasyon, uzaklaştırma ve yeniden bağlama sonrasındaki adımları CV ile incelenmiştir. Boş elektrot yüzeyinde elektron transferini engelleyecek faktör olmadığı için pik akımı en yüksektir. Elektrot yüzeyinde işlemler oldukça pik değerleri değişir. Örneğin, polimerizasyon sonrası yüzey tamamen dolu olduğu için elektron transferi yapılmaz ve pik kaybolur. Uzaklaştırma işlemi pik akım değeri yeniden bağlanma işleminden daha fazladır. Uzaklaştırma işlemi sonrasında oluşan boşluklar elektron transferine izin verdiği için akım değeri daha yüksektir. Aynı polimerizasyon basamaklarını değerlendirmek amacıyla EIS kullanılarak direnç (R_{ct}) değerleri karşılaştırıldı. En düşük R_{ct} değeri elektron taşınması mümkün olduğu için çıplak elektrot yüzeyine aittir (139,2 Ω). En yüksek değer ise polimerik yapının varlığının elektrot yüzeyini kaplamasıyla elektron geçişini engellemesi sonucu polimerizasyon sonrasına aittir (13100 Ω). Hedef molekülün yeniden bağlanması sonucu direnç değeri artar (933,64 Ω), çıkarma işlemi sonrasında oluşan boşluklar elektron geçişine izin verdiği için direnç azalır (358,54 Ω). Polimerizasyon basamaklarının CV ve EIS ile incelenmesi NIP sensör için de yapılmıştır. Çıplak elektrot ve polimerizasyon sonrası MIP sensör ile aynı sonuçları verirken, tek fark uzaklaştırma ve yeniden bağlanma sonrasındaki pik değerleridir. NIP sensörde hedef molekül olmadığı için uzaklaştırma ve yeniden bağlanma sonuç pikleri birbirine çok yakındır.

Elektrokimyasal ve yüzey karakterizasyonu tamamlandıktan sonra geliştirilen sensörün optimizasyon parametreleri belirlenmiştir. İlk parametre monomer-hedef molekül oranıdır. Stabil ve etkili polimerik film oluşturabilmek için en önemli parametrelerden biri monomer-hedef molekül oranıdır. Monomer-hedef molekül arasında oluşan bağlar filmin kalıcılığını etkileyerek hedef molekülün daha iyi bir şekilde tanınmasına olanak sağlar. Monomer oranının fazla kullanılması durumunda yan reaksiyonlar görülebilir ve baskı bölgelerini bozabilir. Bu sebepten bu oranın optimizasyonu yapılmalıdır. Monomer-hedef molekül oranları (1:1, 2:1, 3:1, 4:1 ve 5:1) incelenmiştir. En yüksek akım değeri 3:1 (MA-Trp:KOD) oranında elde edilmiştir. Bu oranda monomer ve hedef molekül kovalent olmayan bağlarla en iyi etkileşimi gösterdiği ve etkili polimerik yapının oluştuğu söylenebilir. Bu orandan daha fazlası kullanıldığında aynı sonuç değeri elde edilmiştir ve böylece monomer ve hedef molekül doygunluğa ulaşmıştır. İkinci parametre ise polimerizasyon çözeltisinin damlatma hacmidir. Elektrot yüzeyine damlatılan polimerizasyon çözeltisinin miktarı polimerik filmin kalınlığını ve hedef molekülün polimerik ağ tarafından tanınması etkileyebilir. Bu sebepten 5 farklı çözelti hacmi denenmiştir ve en yüksek akım değeri 0.5 μ L

olarak belirlenmiştir. Üçüncü parametre ise foto polimerizasyon süresidir. Polimerizasyon süresi morfolojinin belirlenmesinde ve polimerik yapının performansını belirleyen önemli bir faktördür (Piletsky vd., 2005). Bu sebepten UV ışığı altında 5 farklı zamanda bekletilen elektrot, akım sonucuna göre 5 dakikada polimerizasyonun en yüksek değerine ulaştığını göstermektedir. Polimerizasyon için uygun parametreler belirlendikten sonra, hedef molekülün uzaklaştırma süresi, çözeltisi ve yeniden bağlanma süresi belirlenmiştir. Hedef molekül uzaklaştırıldıktan sonra tanıma bölgeleri oluşturulur. Analitin tanıma işleminin iyi yapılabilmesi için hedef molekülün verimli bir şekilde çıkarılması gerekir. Bu nedenle, asetik asit (10 M), metanol aseton, asetonitril ve etanol gibi çeşitli çözücüler kullanılmıştır. Güçlü hidrojen bağı yapabilen asetik asidin akım değeri en yüksektir. Uzaklaştırma çözeltisi asetik asit olarak belirlendikten sonra uzaklaştırma süresi 5 ila 25 dakika arasında değerlendirilmiştir. Polimerik zincirlerin arasındaki etkileşimlerin bozulup yeniden kurulması için bu sürenin belirlenmesi önemlidir. 20 dakika içerisinde hedef molekülün uzaklaştırıldığı belirlenmiştir. Uzaklaştırılan hedef molekülün tekrardan polimerik yapı tarafından tanınması için 5×10^{-13} M kodein çözeltisi 5 ile 20 dakika aralığında farklı inkübasyon süresinde incelenmiştir. Çıkarma işlemi sonucunda oluşan gözeneklere hedef molekülün yeniden bağlanması 20 dakika sonucunda tamamlanmıştır. Bu süre sonucunda boşlukların doygunluğa ulaştığı ve akım değerinin değişmeden kaldığı görülmüştür.

Geliştirilen MA-Trp@MIP/GCE sensörünün analitik performansının değerlendirilebilmesi için bazı regresyon verileri ve validasyon parametreleri hesaplanmıştır. Standart çözelti, ticari serum ve idrar çözeltisinde kalibrasyon grafikleri ve eğrileri elde edilmiştir. Standart çözelti için kalibrasyon grafiği beş farklı konsantrasyonda oluşturulmuş ve 0.1-1.0 pM konsantrasyon aralığında doğrusallık aralığı elde edilmiştir. $\Delta I (\mu A) = 6.96 \times 10^{13} C (M) + 7.02$ ($r = 0.99$) regresyon denklemi bulunmuştur. Tespit sınırı (TS) ve tayin alt sınırı (TAS) değerlerini hesaplamak için TS ($TS = 3 \times (\text{standart sapma}) / \text{eğim}$) ve TAS ($TAS = 10 \times (\text{standart sapma}) / \text{eğim}$) formülleri kullanılmıştır (Ozkan et al., 2015). TS ve TAS değerleri sırasıyla 0.0150 pM ve 0.050 pM olarak belirlenmiştir. DPV kalibrasyon grafiklerinde konsantrasyon miktarı arttıkça akım değeri düşmektedir çünkü boşlukların içerisine hedef molekül yerleştikçe elektron transferi yavaşlar ve elektrik akımı azalır. Kalibrasyon eğrilerindeki MIP ve NIP karşılaştırılmasında ise NIP sensörde konsantrasyon arttıkça eğride bir değişiklik olmaz çünkü hedef molekülü tanıyacak bir polimerik ağ yoktur fakat MIP de ise kodein konsantrasyonu arttıkça akım farkı değeri de artar. Validasyon parametreleri üç farklı çözelti içerisinde belirlenmiştir ve sonuçlar doğruluk, güvenilirlik ve tutarlılık açısından değerlendirilmiştir. Kesinlik parametresi standart sapma ve bağıl standart sapma ile ifade

edilebilir ve tekrarlanabilirlik ile tekrar elde edilebilirlik değerleri incelenmiştir. Üç farklı çözeltide tekrarlanabilirlik ve tekrar elde edilebilirlik %2'nin altında olmasıyla kesinlik kriteri sağlanmıştır. Doğrusallık parametresi geri kazanım deney sonuçları ile tanımlanmıştır. Bu değerlerin pM seviyesinde olması geliştirilen sensörün çok düşük konsantrasyon değerini teşhis edebildiğini göstermektedir.

Geliştirilen MA-Trp@MIP/GCE sensörün gerçek örneklerle uygulanabilirliğini test etmek amacıyla ticari serum ve idrar numunelerine standart ekleme yöntemi ile kodein içeren numuneler hazırlanmış ve geri kazanım çalışmalarıyla analitik parametreleri hesaplanmıştır. Tayin sınırı tablet, serum ve idrarda sırasıyla 0.0150 pM, 0.0193 pM ve 0.0108 pM olarak bulunmuştur. Tayin alt sınırı sırasıyla 0.0500 pM, 0.0644 pM ve 0.0359 pM olarak bulunmuştur. Ayrıca tablet, serum ve idrar örneklerinin geri kazanım sonuçları sırasıyla %101.514, %101.424 ve %98.544 olarak bulunmuştur. Geri kazanım sonuçlarının %95-105 arasında olması ve tayin sınırlarının pM seviyesinde olması geliştirilen sensörün çok düşük konsantrasyon değerinde serum ve idrar çözeltilerinde tayin edebileceğini göstermektedir.

Seçicilik parametresinde ise geliştirilen sensörün kodein haricinde diğer maddelere polimerik yapıda bağlanması incelenmiştir. Yapısal ve fonksiyonel grup olarak kodeine benzeyen moleküller EM, DCOD, TMP ve DMP kullanılarak seçicilik katsayısı ($k' = k_{MIP}/k_{NIP}$) hesaplanmıştır. Hazırlanan polimerik sensör kodein için seçici olduğundan diğer moleküllerin katsayı değeri düşüktür. Bu değerlere göre kodein baskılı sensör EM, DCOD, TMP ve DMP moleküllerine göre sırasıyla 3.78, 3.58, 5.72 ve 3.57 kat seçicidir.

Geliştirilen sensörün kan ve idrarda bulunan çeşitli iyonik tuzların ve ilaçların varlığında girişim etkisi incelenmiştir. İnterferans maddeleri 10 kat daha fazla olmasına rağmen geri kazanım sonuçları %99.91 ile %102.99 arasında hesaplanırken bağıl standart sapma %1.09 ile %1.70 arasında bulunmuştur. Geri kazanımın %95-105 arasında olması ve bağıl standart sapmanın %2'nin altında olması MA-Trp@MIP/GCE sensörünün kodein tespitinde interferans çözeltilerinin herhangi bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, kodein, dekstrometorfan, metadon ve oksikodon için indikatör yer değiştirme mekanizmasıyla çalışan optik sensör geliştirilmiştir. Çapraz reaktif sensör CB[8] reseptörü ve piridin kumarin, akridin sarısı ve turuncusu boyaları ile oluşturulmuştur. Planlanan ve dizayn edilerek sentezlenen boylarla geliştirilen optik sensör uygulama açısından kolay olması, düşük maliyetli olması, renk değişimine bağlı gözle analit tespitine olanak sağlamasıyla diğer yöntemlere göre üstünlük sağlamaktadır. Kodein analiti için MIP

temelli elektrokimyasal sensör geliştirilmiştir. Bu çalışmada kullanılan monomerin sentez ürünü olması, düşük tespit sınırına sahip olması ve literatürde bulunmayan elektrokimyasal metot geliştirmesi açısından çalışmayı değerli kılmaktadır.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında opioid analjeziklerden kodein, dekstrometorfan, metadon ve oksikodon için optik sensör ve kodein için elektrokimyasal sensör geliştirilmesi amaçlanmıştır. Optik sensör sisteminde indikatör yer değiştirme mekanizmasıyla önce reseptör ile boyanın bağlanması, sonrasında reseptör ile analitin bağlanarak boyanın açığa çıkması hedeflenmiştir. MIP temelli elektrokimyasal sensör ile seçici olarak kodein tayini, geliştirilen sensörün analitik validasyonu yapılması, gerçek numune örneklerine uygulanarak düşük konsantrasyonlarda hassas ölçümlerin elde edilmesi amaçlanmıştır.

Geliştirilen optik sensör sisteminde konakçı yapı ve reseptör supramoleküler sınıfından kükürbütiril, içi boş uçlarında karboksil grup bulunan bir moleküldür. Uçlarında bulunan negatif yüklü karboksil grubu ile etkileşecek pozitif yüklü ve boşluktaki yapı ile etkileşecek hidrofobik yapıya sahip boyalar ile konakçı-konuk ilişkisi kurulmuştur. Bu optik sensörde boyanın eklenmesiyle kapanma sonrasında analitin eklenmesiyle açılma sistemi elde edilmiştir. Bu sistem amacına uygun başarılı bir şekilde oluşturularak 4 analit için çapraz reaktif sensör geliştirilmiştir.

Bu kapsamda literatürde bulunmayan piridin kumarin boyası ilk defa sentezlenmiştir. Kimyasal ve spektroskopik karakterizasyonu yapılan bu boyanın solvatokromik etkiye sahip olmadan farklı çözücüler içerisinde benzer absorbans değerine sahip olduğu ve en yüksek absorbans değerinin %2 metanol-su çözücü içerisinde olduğu belirlenmiştir. Bu çözücü içerisinde kükürbütiril[7] ve kükürbütiril[8] ile titrasyon sonucunda iki reseptöre de bağlanarak içerisindeki boşluklu yapıya girmesiyle boya sönümlenmesi elde edilmiştir. Kükürbütiril[7] ile titrasyonu üç farklı pH ortamında test edilmiş ve nötr ortam pH 7’de en iyi bağlanma sabiti elde edilmiştir. Asidik veya bazik ortamda kükürbütiril[7]’nin iyonlarla etkileşmesi sonucunda boya ile etkileşimi beklenemez bu sebepten nötr ortamda en iyi bağlanma gerçekleşmiştir. Piridin kumarin boyasının kükürbütiril[8] ile etkileşimi floresans titrasyonu sonucunda 1:1 oranında belirlenmiş ve piridin kumarin-kükürbütiril[8] sensörü 4 farklı analit tespiti için kullanılmıştır. Çapraz reaktivenin amacına uygun olarak her bir analite farklı cevap geliştirilmiştir. Dekstrometorfan, kodein ve oksikodon analitleri görece yüksek boya amplifikasyon değerleri verirken, iki adet fenil halkası ve halkaların arasındaki uzaklıktan dolayı büyük yapıya sahip metadon analiti düşük değer vermiştir.

Akridin turuncusu, Akridin sarısı ve Akridin kırmızısı boyaları da kükürbitürl[8] ile sensör oluşturmak için kullanılmıştır. Agrege olduğu bilinen akridin boyalarının birleşerek kümesel yapı oluşturmadığı konsantrasyon değerlerinin belirlenmesi için Lambert-Beer kanunu uygulanarak konsantrasyon değeri arttıkça absorbans ve floresans ölçümleri alınmıştır. Bu üç boya içinde agregre olmayan konsantrasyon değeri 0.5 μM olarak belirlenmiştir. Absorbans ve floresans titrasyonları kükürbitürl[8] reseptörü ile yapılmıştır.

Akridin sarısı boyası ve kükürbitürl[8], absorbans ve floresans titrasyonları sonucunda boya sönümlenmesi elde edilmiştir. Akridin sarısı boyası ve kükürbitürl[8] arasında kovalent olmayan iyonik ve hidrofobik etkileşimler gerçekleşerek boyanın kükürbitürl[8] ile bağlanması sonucunda sönümlenme elde edilmiştir. Floresans titrasyon izoterm grafik sonucuna göre 1:1 bağlanma gerçekleşmiş ve 0.5 μM akridin sarısı boyası ve 0.5 μM kükürbitürl[8] reseptörüyle sensör sistemi oluşturulmuştur. Geliştirilen bu sensör ile 4 farklı analit tayini yapılmış ve dekstrometorfan ve kodein analiti sırasıyla %92 ve %87 amplifikasyon sonuçları vermiştir. Daha fazla elektronegativiteye sahip oksikodon %46 boyut olarak büyük olan metadon %21 sonuçları vererek analite özgü cevaplar elde edilmiştir.

Akridin turuncusu boyası ve kükürbitürl[8] absorbans ve floresans titrasyonları sonucunda kovalent olmayan etkileşimler sonucunda boya sönümlenmesi elde edilmiştir. Absorbans titrasyonunda mavi bölgeye kayma olurken floresans titrasyonunda kırmızı bölgeye kayma olmuştur. Floresans titrasyon izoterm grafik sonucuna göre 1:1 bağlanma gerçekleşmiş ve 0.5 μM akridin turuncusu boyası ve 0.5 μM kükürbitürl[8] reseptörüyle sensör sistemi oluşturulmuştur. Akridin turuncusu-kükürbitürl[8] sensörüyle 4 farklı analit tespiti sonucunda akridin sarısı boyasında elde edilen benzer sonuçlar görülmüştür. Dekstrometorfan ve kodein analiti sırasıyla %84 ve %68 amplifikasyon sonuçları vermiştir. Daha fazla elektronegativiteye sahip oksikodon %28 boyut olarak büyük olan metadon nerdeyse hiç artış göstermeyerek %0 sonuçları elde edilmiştir.

Akridin kırmızısı boyası kükürbitürl[8] absorbans titrasyonu sonucunda çok az bir oranda sönümleme elde edilirken floresans titrasyon sonucunda artış ve azalış gösteren stabil olmayan sonuçlar elde edilmiştir. Akridin turuncusu ve akridin sarısı boyalarından farklı olarak düzlemsel yapısında oksijen atomu içermesi kükürbitürl[8]'in negatif yüklü karbonil grubuyla itici etki göstermesi sebebiyle konakçı-konuk etkileşimi elde edilememiştir. Bu sebepten akridin kırmızısı boyası optik sensör sisteminde kullanılmamıştır.

Dizi sensör çalışması LDA çapraz validasyonu, skor ve grafik analiz sonuçlarıyla 93% oranında analitler başarılı bir şekilde sınıflandırılmıştır.

Moleküler baskılama yöntemiyle hassas ve seçici elektrokimyasal sensör kodein tespiti için geliştirilmiştir. Bu yöntemde ilk kez sentezlenen polimerik yapı amino asit bazlı özel fonksiyonel monomer (MA-Trp), temel monomerlerden (HEMA), çapraz bağlayıcı (EGDMA), foto başlatıcı (2-hidroksi-2-metilpropiofenon), gözenek yapıcı malzeme (ZnO), fonksiyonel şablon molekül kodein kullanılarak oluşturulmuştur. Baskılanmış gözenekli polimerik film foto polimerizasyon yöntemiyle sentezlenmiştir. Geliştirilen MIP tabanlı elektrokimyasal sensörün (MA-Trp@MIP/GCE), yüzey karakterizasyonu ve morfolojik incelenmesi SEM ve FTIR kullanılarak yapılmıştır. MIP sensör ve kontrol NIP sensörü karşılaştırıldığında morfolojik olarak MIP sensörün gözenekli yapıya sahip yapı görülmektedir. FTIR karakterizasyonunda ise polimerik yapıdaki karbon hidrojen gerilmeleri, amid ve indol fonksiyonel grupları görülmüştür. Hedef molekül kodein ve fonksiyonel monomer MA-Trp arasında hidrojen bağı ve π - π etkileşimleriyle bağ kurulmuştur. Elektrokimyasal CV ve EIS yöntemleriyle polimerizasyon aşamalarındaki elektron transferi incelenmiş ve karşılaştırılmıştır. Elektrot yüzeyi boş olduğunda veya polimerik ağ uzaklaştırma basamağında boşluklar oluşunca elektron transferi kolaylaşır ve pik akım değeri yükselir. EIS yönteminde ise boşluklu yapıda direnç az olduğu için pik değeri yüksek olur.

Polimerik filmin yüzeysel ve elektrokimyasal karakterizasyonundan sonra sensör performansını arttırmak için 5 farklı parametre optimize edilmiştir. Birinci parametre hedef monomer-hedef molekül oranı (3:1) olarak belirlenmiştir. İkinci parametre hazırlanan foto polimerizasyon çözeltisinin damlatma hacmi 0.5 μ L, üçüncü parametre foto polimerizasyon süresi 5 dakika, dördüncü parametre uzaklaştırma çözücüsü asetik asit ve uzaklaştırma süresi ve son parametre bağlanma süresi 20 dakika olarak belirlenmiştir. Optimize edilen bu parametrelerle stabil, etkili ve kodein tanınması kolay yüksek analitik performansta sensör hazırlanmıştır.

Geliştirilen elektrokimyasal sensörün analitik performansı incelenmiş ve validasyon parametreleri belirlenmiştir. Dinamik doğrusal aralığı 0.1–1.0 pM ve tespit limiti 0.0150 pM olarak hesaplanmıştır. Gerçek numunelere uygulanabilirliğini göstermek amacıyla idrar ve serum çözeltilerinde test edilmiştir. Sırasıyla %98.544, %101.424 ve %101.514 idrarda, ticari serum örneklerinde ve tablet formunda geri kazanım sonuçları elde edilmiştir. Sensörün sadece

kodein için seçici olduğunu göstermek amacıyla kodeine benzer 4 farklı molekülle seçicilik katsayısı hesaplanmış ve bu değerlerin kodeine göre düşük olması sentezlenen polimerik ağa sadece kodeinin bağlanacağını göstermiştir. Biyolojik sıvılarda bulunan bazı iyonik maddelerle olası birlikte kullanılan bazı ağrı kesiciler varlığında sensörün kodein tayin limitini etkilemediği geri kazanım sonuçları %99.91-102.99 arasında olmasıyla ispat edilmiştir. Sonuç olarak, geliştirilen elektrokimyasal sensör tablet ve biyolojik sıvı örneklerinde kodeini başarıyla tespit etmiş ve iyi, doğru, hassas, seçici, girişim direnci gösteren sonuçlarla yüksek analitik performans göstermiştir.



KAYNAKLAR

- Abbate, V., Moreno, A. S., & Wiegand, T. J. (2021). Novel synthetic opioids. In *Novel Psychoactive Substances: Classification, Pharmacology and Toxicology* (pp. 447–474). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818788-3.00018-8>
- Afkhami, A., Gomar, F., & Madrakian, T. (2016). CoFe₂O₄ nanoparticles modified carbon paste electrode for simultaneous detection of oxycodone and codeine in human plasma and urine. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 233, 263–271. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.04.067>
- Afkhami, A., Khoshsafari, H., Bagheri, H., & Madrakian, T. (2014). Facile simultaneous electrochemical determination of codeine and acetaminophen in pharmaceutical samples and biological fluids by graphene–CoFe₂O₄ nanocomposite modified carbon paste electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 203, 909–918. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.07.031>
- Afkhami, A., Soltani-Felehgari, F., & Madrakian, T. (2014). A sensitive electrochemical sensor for rapid determination of methadone in biological fluids using carbon paste electrode modified with gold nanofilm. *Talanta*, 128, 203–210. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2014.03.003>
- Akbari, S., Jahani, S., Foroughi, M. M., & Hassani Nadiki, H. (2020). Simultaneous determination of methadone and morphine at a modified electrode with 3D β -MnO₂ nanoflowers: application for pharmaceutical sample analysis. *RSC Advances*, 10(63), 38532–38545. <https://doi.org/10.1039/D0RA06480G>
- Akhigbe, R. E., Ebiwonjumi, O. S., Ajayi, L. O., & Ajayi, A. F. (2022). Codeine alters female reproductive function by targeting ovarian steroidogenesis and folliculogenesis via the induction of oxidative stress, inflammation, and apoptosis. *Reproductive Toxicology*, 109, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2022.02.001>
- Al numani, R., Bolognesi, G., & Vladislavjević, G. T. (2018). Microfluidic Production of Poly(1,6-hexanediol diacrylate)-Based Polymer Microspheres and Bifunctional Microcapsules with Embedded TiO₂ Nanoparticles. *Langmuir*, 34(39), 11822–11831. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b02452>
- Aleksic, S. (2019). A Survey on Optical Technologies for IoT, Smart Industry, and Smart Infrastructures. *Journal of Sensor and Actuator Networks*, 8(3), 47. <https://doi.org/10.3390/jsan8030047>
- Aliaga, M. E., García-Río, L., Pessêgo, M., Montecinos, R., Fuentealba, D., Uribe, I., Martín-Pastor, M., & García-Beltrán, O. (2015). Host–guest interaction of coumarin-derivative dyes and cucurbit[7]uril: leading to the formation of supramolecular ternary complexes with mercuric ions. *New Journal of Chemistry*, 39(4), 3084–3092. <https://doi.org/10.1039/C5NJ00162E>
- Alihosseini, F., & Sun, G. (2011). Antibacterial colorants for textiles. In *Functional Textiles for Improved Performance, Protection and Health* (pp. 376–403). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9780857092878.376>
- Alipour, E., Majidi, M. R., & Hoseindokht, O. (2015). Development of simple electrochemical sensor for selective determination of methadone in biological samples using multi-walled carbon nanotubes modified pencil graphite electrode. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 62(5), 461–468. <https://doi.org/10.1002/JCCS.201400391>
- Aljohani, M. M., Cialla-May, D., Popp, J., Chinnappan, R., Al-Kattan, K., & Zourob, M. (2022). Aptamers: Potential Diagnostic and Therapeutic Agents for Blood Diseases. *Molecules*, 27(2), 383. <https://doi.org/10.3390/molecules27020383>
- Álvaro-Alonso, E. A., Lorenzo, M. P., Escobar-Rodríguez, I., & Aguilar-Ros, A. (2022). Development and validation of a HPLC-UV method for methadone hydrochloride quantification in a new oral solution with preservatives to be implemented in physicochemical stability studies. *BMC Chemistry*, 16(1), 32. <https://doi.org/10.1186/s13065-022-00827-9>
- Amiri-Aref, M., Raoof, J. B., & Ojani, R. (2013). Electrocatalytic oxidation and selective determination of an opioid analgesic methadone in the presence of acetaminophen at a glassy

- carbon electrode modified with functionalized multi-walled carbon nanotubes: Application for human urine, saliva and pharmaceutical samples analysis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 109, 287–293. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2013.03.055>
- Amiri, M., Rezapour, F., & Bezaatpour, A. (2014). Hydrophilic carbon nanoparticulates at the surface of carbon paste electrode improve determination of paracetamol, phenylephrine and dextromethorphan. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 735, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2014.10.006>
- Anderson, I. B. (2000). Use of methadone. *Western Journal of Medicine*, 172(1), 43–46. <https://doi.org/10.1136/ewjm.172.1.43>
- Ansari, S., & Masoum, S. (2021). A hybrid imprinted polymer based on magnetic graphene oxide and carbon dots for ultrasonic assisted dispersive solid-phase microextraction of oxycodone. *Microchemical Journal*, 164, 105988. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.105988>
- Ares-Fuentes, A. M., Lorenzo, R. A., Fernández, P., Fernández, A. M., Furton, K. G., Kabir, A., & Carro, A. M. (2022). Determination of synthetic opioids in oral fluid samples using fabric phase sorptive extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1663, 462768. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462768>
- Aryal, G. H., Hunter, K. W., & Huang, L. (2018). A supramolecular red to near-infrared fluorescent probe for the detection of drugs in urine. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 16(40), 7425–7429. <https://doi.org/10.1039/C8OB02180E>
- Aryal, G. H., Lu, K., Chen, G., Hunter, K. W., & Huang, L. (2019). A colorimetric and fluorescent dual-modal displacement probe based on host-assisted modulation of intramolecular charge transfer and deaggregation. *Chemical Communications*, 55(92), 13912–13915. <https://doi.org/10.1039/C9CC07513E>
- Asadi, A., Daglioglu, N., Hasani, T., & Farhadian, N. (2022). Construction of Mg-doped ZnO/g-C₃N₄@ZIF-8 multi-component catalyst with superior catalytic performance for the degradation of illicit drug under visible light. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 650, 129536. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.129536>
- Asturias-Arribas, L., Asunción Alonso-Lomillo, M., Domínguez-Renedo, O., & Julia Arcos-Martínez, M. (2014). Cytochrome P450 2D6 based electrochemical sensor for the determination of codeine. *Talanta*, 129, 315–319. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.05.053>
- Azevedo, K., Johnson, M., Wassermann, M., & Evans-Wall, J. (2021). Drugs of Abuse—Opioids, Sedatives, Hypnotics. *Critical Care Clinics*, 37(3), 501–516. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2021.03.003>
- Bae, J., Baek, K., Yuan, D., Kim, W., Kim, K., Zhou, H.-C., & Park, J. (2017). Reversible photoreduction of Cu(II)—coumarin metal–organic polyhedra. *Chemical Communications*, 53(66), 9250–9253. <https://doi.org/10.1039/C7CC04799A>
- Baghayeri, M., Nabavi, S., Hasheminejad, E., & Ebrahimi, V. (2021). Introducing an Electrochemical Sensor Based on Two Layers of Ag Nanoparticles Decorated Graphene for Rapid Determination of Methadone in Human Blood Serum. *Topics in Catalysis*. <https://doi.org/10.1007/S11244-021-01483-4>
- Baghayeri, M., Nabavi, S., Hasheminejad, E., & Ebrahimi, V. (2022). Introducing an Electrochemical Sensor Based on Two Layers of Ag Nanoparticles Decorated Graphene for Rapid Determination of Methadone in Human Blood Serum. *Topics in Catalysis*, 65(5–6), 623–632. <https://doi.org/10.1007/s11244-021-01483-4>
- Bagheri, H., Shirzadmehr, A., Rezaei, M., & Khoshshafar, H. (2018). Determination of tramadol in pharmaceutical products and biological samples using a new nanocomposite carbon paste sensor based on decorated nanographene/tramadol-imprinted polymer nanoparticles/ionic liquid. *Ionics*, 24(3), 833–843. <https://doi.org/10.1007/s11581-017-2252-1>
- Baranwal, J., Barse, B., Gatto, G., Broncova, G., & Kumar, A. (2022). Electrochemical Sensors and Their Applications: A Review. *Chemosensors*, 10(9), 363. <https://doi.org/10.3390/chemosensors10090363>
- Barooah, N., Mohanty, J., Pal, H., & Bhasikuttan, A. C. (2012). Non-covalent interactions of coumarin dyes with cucurbit[7]uril macrocycle: modulation of ICT to TICT state conversion. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 10(26), 5055. <https://doi.org/10.1039/c2ob25759a>
- Barrow, S. J., Kasera, S., Rowland, M. J., del Barrio, J., & Scherman, O. A. (2015). Cucurbituril-Based Molecular Recognition. *Chemical Reviews*, 115(22), 12320–12406. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00341>
- Bazargan, M., Mirzaei, M., Amiri, A., & Mague, J. T. (2023). Opioid Drug Detection in Hair Samples

- Using Polyoxometalate-Based Frameworks. *Inorganic Chemistry*, 62(1), 56–65.
<https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.2c02658>
- BelBruno, J. J. (2019). Molecularly Imprinted Polymers. *Chemical Reviews*, 119(1), 94–119.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00171>
- Bhandari, M., Bhandari, A., & Bhandari, A. (2011). Recent updates on codeine. *Pharmaceutical Methods*, 2(1), 3–8. <https://doi.org/10.4103/2229-4708.81082>
- BRADLEY, D. E. (1965). Staining of Bacteriophage Nucleic Acids with Acridine Orange. *Nature*, 205(4977), 1230–1230. <https://doi.org/10.1038/2051230a0>
- Brighenti, R., Cosma, M. P., Marsavina, L., Spagnoli, A., & Terzano, M. (2021). Multiphysics modelling of the mechanical properties in polymers obtained via photo-induced polymerization. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, 117(1–2), 481–499.
<https://doi.org/10.1007/s00170-021-07273-2>
- Buschmann, H.-J., Cleve, E., Jansen, K., Wego, A., & Schollmeyer, E. (2001). The determination of complex stabilities between different cyclodextrins and dibenzo-18-crown-6, cucurbit[6]uril, decamethylcucurbit[5]uril, cucurbit[5]uril, p-tert-butylcalix[4]arene and p-tert-butylcalix[6]arene in aqueous solutions using a spectrophotometer. *Materials Science and Engineering: C*, 14(1–2), 35–39. [https://doi.org/10.1016/S0928-4931\(01\)00206-5](https://doi.org/10.1016/S0928-4931(01)00206-5)
- Çakıcı, Mehmet; Araz, Damla; Aksoy, Elif; Gökyiğit, A. (2019). Opioid Bağımlılığının Tedavisinde Metadon ve Buprenorfin'in Etkinliği: Hangisini Kullanalım? *Cyprus Turkish Journal of Psychiatry and Psychology*, 1(3). <https://doi.org/10.35365/ctjpp.19.1.25>
- Cao, J., Chen, X. Y., & Zhao, W. R. (2019). Determination of morphine in human urine by the novel competitive fluorescence immunoassay. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/7826090>
- Cao, L., Hettiarachchi, G., Briken, V., & Isaacs, L. (2013). Cucurbit[7]uril Containers for Targeted Delivery of Oxaliplatin to Cancer Cells. *Angewandte Chemie International Edition*, 52(46), 12033–12037. <https://doi.org/10.1002/anie.201305061>
- Carlton, B. D. (2005). Coumarins. In *Encyclopedia of Toxicology* (pp. 674–676). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B0-12-369400-0/00269-6>
- Chakraborty, B., & Basu, S. (2011). Deciphering the host–guest chemistry of Acridine Yellow and Cucurbit[7]uril: An integrated spectroscopic and calorimetric study. *Chemical Physics Letters*, 507(1–3), 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2011.03.014>
- Charkravarthula, P., & Mugweru, A. (2023). Molecularly Imprinted Electrochemical Sensor Based on Poly (O-Phenylenediamine) for Sensitive Detection of Oxycodone in Water. *Electrochem*, 4(4), 435–446. <https://doi.org/10.3390/electrochem4040028>
- Chen, Z. H., Fan, Q. X., Han, X. Y., Shi, G., & Zhang, M. (2020). Design of smart chemical ‘tongue’ sensor arrays for pattern-recognition-based biochemical sensing applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 124, 115794. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2019.115794>
- Cheremina, O., Bachmakov, I., Neubert, A., Brune, K., Fromm, M. F., & Hinz, B. (2005). Simultaneous determination of oxycodone and its major metabolite, noroxycodone, in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Biomedical Chromatography*, 19(10), 777–782. <https://doi.org/10.1002/bmc.516>
- Chugh, B., Thakur, S., Singh, A. K., Joany, R. M., Rajendran, S., & Nguyen, T. A. (2022). Electrochemical sensors for agricultural application. In *Nanosensors for Smart Agriculture* (pp. 147–164). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824554-5.00018-5>
- Collins, B. E., & Anslyn, E. V. (2007). Pattern-based peptide recognition. *Chemistry - A European Journal*, 13(17), 4700–4708. <https://doi.org/10.1002/chem.200700153>
- Cormack, P. A. ., & Elorza, A. Z. (2004). Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation. *Journal of Chromatography B*, 804(1), 173–182.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.02.013>
- Dagar, M., Yadav, S., Sai, V. V. R., Satija, J., & Bhatia, H. (2022). Emerging trends in point-of-care sensors for illicit drugs analysis. *Talanta*, 238, 123048.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.123048>
- Demir, Ö., Ulusoy, H. İ., Özer, E. T., & Osman, B. (2020). Development of a new solid phase extraction method for sensitive determination of some carbamate pesticides in water using poly(EGDMA-MATrp) microbeads. *Microchemical Journal*, 158, 105317.
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105317>
- Diaconu, I., Aboul-Enein, H. Y., Bunaciu, A. A., & Tănase, I. G. (2010). Estimation of Uncertainty for Measuring Codeine Phosphate Tablets Formulation Using UV-Vis Spectrophotometry.

- Analytical Letters*, 43(7–8), 1207–1216. <https://doi.org/10.1080/00032710903518633>
- Diouf, A., Aghoutane, Y., Burhan, H., Sen, F., Bouchikhi, B., & El Bari, N. (2021). Tramadol sensing in non-invasive biological fluids using a voltammetric electronic tongue and an electrochemical sensor based on biomimetic recognition. *International Journal of Pharmaceutics*, 593, 120114. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.120114>
- Dowell, D., Haegerich, T. M., & Chou, R. (2016). CDC Guideline for Prescribing Opioids for Chronic Pain — United States, 2016. *MMWR. Recommendations and Reports*, 65(1), 1–49. <https://doi.org/10.15585/mmwr.rr6501e1>
- Drug, E., Marder, D., Binyamin, I., Yeffet, D., Gershonov, E., & Dagan, S. (2024). Software-assisted automated detection and identification of “unknown” fentanyl analogues. *Journal of Mass Spectrometry*, 59(1). <https://doi.org/10.1002/jms.4994>
- Dryer, L., & Berghard, A. (1999). Odorant receptors: a plethora of G-protein-coupled receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 20(10), 413–417. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(99\)01381-4](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(99)01381-4)
- DU, X., GU, H., LIU, X., LI, W., LV, S., DING, H., LI, L., QIU, D., & HAO, H. (2023). Selective and reversible chemical sensor for methamphetamine detection using AIEgen and cucurbit[7]uril. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 51(7), 100275. <https://doi.org/10.1016/j.cjac.2023.100275>
- Duan, Q., Chen, R., Deng, S., Yang, C., Ji, X., Qi, G., Li, H., Li, X., Chen, S., Lou, M., & Lu, K. (2023). Cucurbit[n]uril-based fluorescent indicator-displacement assays for sensing organic compounds. *Frontiers in Chemistry*, 11. <https://doi.org/10.3389/fchem.2023.1124705>
- Ebeshi, B., Obodozie, O., & Bolaji, O. (2014). Sensitive and Selective Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatographic-UV Spectrophotometric Determination of Dextromethorphan and its CYP2D6 Mediated Metabolite, Dextrorphan in Human Urine. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(2), 281. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v13i2.18>
- Eckart, K., Röhrich, J., Breitmeier, D., Ferner, M., Laufenberg-Feldmann, R., & Urban, R. (2015). Development of a new multi-analyte assay for the simultaneous detection of opioids in serum and other body fluids using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1001, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.06.028>
- El-Naby, E. H. (2008). Polymeric Membrane Sensors for the Selective Determination of Dextromethorphan in Pharmaceutical Preparations. *Analytical Sciences*, 24(11), 1409–1414. <https://doi.org/10.2116/analsci.24.1409>
- El-Naby, E. H., & Kamel, A. H. (2015). Potential transducers based man-tailored biomimetic sensors for selective recognition of dextromethorphan as an antitussive drug. *Materials Science and Engineering: C*, 54, 217–224. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.05.044>
- Ensafi, A. A., Abarghoui, M. M., & Rezaei, B. (2015). Simultaneous determination of morphine and codeine using Pt nanoparticles supported on porous silicon flour modified ionic liquid carbon paste electrode. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 219, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.05.010>
- Fakhari, A. R., Koruni, M. H., Ahmar, H., Shahsavani, A., & Movahed, S. K. (2014). Electrochemical Determination of Dextromethorphan on Reduced Graphene Oxide Modified Screen-Printed Electrode after Electromembrane Extraction. *Electroanalysis*, 26(3), 521–529. <https://doi.org/10.1002/elan.201300323>
- Farahani, A., Azimi, S., & Azimi, M. (2022). Developing an integrated POC spectrophotometric device for discrimination and determination of opioids based on gold nanoparticles. *Microchemical Journal*, 182, 107930. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107930>
- Faridbod, F., Ganjali, M. R., & Hosseini, M. (2018). Lanthanide materials as chemosensors. In *Lanthanide-Based Multifunctional Materials* (pp. 411–454). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813840-3.00012-0>
- Florence, C. S., Zhou, C., Luo, F., & Xu, L. (2016). The Economic Burden of Prescription Opioid Overdose, Abuse, and Dependence in the United States, 2013. *Medical Care*, 54(10), 901–906. <https://doi.org/10.1097/MLR.0000000000000625>
- Fritsch, C., Goerz, G., & Ruzicka, T. (1998). Photodynamic Therapy in Dermatology. *Archives of Dermatology*, 134(2), 207. <https://doi.org/10.1001/archderm.134.2.207>
- Ganjali, M. R., Larijani, B., Shams, H., Riahi, S., Faridbod, F., & Norouzi, P. (2010). Using dextromethorphan potentiometric membrane sensor in analysis of dextromethorphan hydrobromide in pharmaceutical formulation and urine; Computational study. *Journal of*

- Analytical Chemistry*, 65(10), 1052–1060. <https://doi.org/10.1134/S1061934810100114>
- Gaudette, F., Sirhan-Daneau, A., St-Onge, M., Turgeon, J., & Michaud, V. (2016). Development of a sensitive method for the determination of oxycodone and its major metabolites noroxycodone and oxymorphone in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 1008, 174–180. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.11.035>
- Gharbavi, Mahmoud; Sereshti, Hassan; Gharbavi, S. (2014). Optimized Of Dispersive Liquid-Liquid Micro Extraction and UV- Vis Spectrophotometer for Determination of Codeine in Waters. *International Journal of Current Research*, 2, 570–574.
- Glasscott, M. W., Vannoy, K. J., Iresh Fernando, P. U. A., Kosgei, G. K., Moores, L. C., & Dick, J. E. (2020). Electrochemical sensors for the detection of fentanyl and its analogs: Foundations and recent advances. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 132, 116037. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2020.116037>
- Habibi, M. M., Ghasemi, J. B., Badiei, A., & Norouzi, P. (2022). Simultaneous electrochemical determination of morphine and methadone by using CMK-5 mesoporous carbon and multivariate calibration. *Scientific Reports*, 12(1), 8270. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12506-9>
- Hasanpour, F., Taei, M., & Tahmasebi, S. (2018). Ultra-sensitive electrochemical sensing of acetaminophen and codeine in biological fluids using CuO/CuFe₂O₄ nanoparticles as a novel electrocatalyst. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(2), 879–886. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2017.10.001>
- Heli, H., Majdi, S., Jabbari, A., Sattarahmady, N., & Moosavi-Movahedi, A. A. (2010). Electrooxidation of dextromethorphan on a carbon nanotube–carbon microparticle–ionic liquid composite: applied to determination in pharmaceutical forms. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 14(8), 1515–1523. <https://doi.org/10.1007/s10008-009-0979-y>
- Hoyas Pérez, N., & Lewis, J. E. M. (2020). Synthetic strategies towards mechanically interlocked oligomers and polymers. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 18(35), 6757–6780. <https://doi.org/10.1039/D0OB01583K>
- Huang, L., Yang, X., Qi, C., Niu, X., Zhao, C., Zhao, X., Shangguan, D., & Yang, Y. (2013). A label-free electrochemical biosensor based on a DNA aptamer against codeine. *Analytica Chimica Acta*, 787, 203–210. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.05.024>
- Hur, D., Ekti, S., & Say, R. (2007). N-Acylbenzotriazole Mediated Synthesis of Some Methacrylamido Amino Acids. *Letters in Organic Chemistry*, 4(8), 585–587. <https://doi.org/10.2174/157017807782795556>
- Jayawardana, S., Forman, R., Johnston-Webber, C., Campbell, A., Berterame, S., de Joncheere, C., Aitken, M., & Mossialos, E. (2021). Global consumption of prescription opioid analgesics between 2009-2019: a country-level observational study. *EClinicalMedicine*, 42, 101198. <https://doi.org/10.1016/J.ECLINM.2021.101198>
- ji Kwon, N., & Han, E. (2019). A review of drug abuse in recently reported cases of driving under the influence of drugs (DUID) in Asia, USA, and Europe. *Forensic Science International*, 302, 109854. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.06.012>
- Katzung, B. G., & Trevor, A. J. (Eds.). (2015). *Basic & Clinical Pharmacology* (13th ed.).
- Khaled, E., Kamel, M. S., Hassan, H. N. A., & Aboul-Enein, H. Y. (2011). Cyclodextrin-based dextromethorphan potentiometric sensors. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 661(1), 239–244. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2011.08.008>
- Kharazmi, F., Hosseini, F. S., & Ebrahimzadeh, H. (2024). Synthesis, characterization of MOF NiCoZn-LDH@GO on carbon cloth as sensitive and novel nanocomposite applied to electrospun nanofibers network as thin-film microextraction sorbent for detection trace amount of opioid and analgesic drugs from biological f. *Talanta*, 267, 125241. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.125241>
- Khosropour, H., Rezaei, B., Alinajafi, H. A., & Ensafi, A. A. (2021a). Electrochemical sensor based on glassy carbon electrode modified by polymelamine formaldehyde/graphene oxide nanocomposite for ultrasensitive detection of oxycodone. *Microchimica Acta*, 188(1). <https://doi.org/10.1007/s00604-020-04655-3>
- Kim, J., Ji, D., Kang, S., Park, M., Yang, W., Kim, E., Choi, H., & Lee, S. (2014). Simultaneous determination of 18 abused opioids and metabolites in human hair using LC-MS/MS and illegal opioids abuse proven by hair analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 89, 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.10.041>
- Kim, K., Stoll, S., Singh, R., Lee, W. H., & Hwang, J.-H. (2023). Recent advances in illicit drug

- detection sensor technology in water. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 168, 117295. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.117295>
- Koner, A. L., Ghosh, I., Saleh, N., & Nau, W. M. (2011). Supramolecular encapsulation of benzimidazole-derived drugs by cucurbit[7]uril. *Canadian Journal of Chemistry*, 89(2), 139–147. <https://doi.org/10.1139/V10-079>
- Kristensen, H. T. (1998). Simultaneous determination of dextromethorphan and its metabolites in human plasma by capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 18(4–5), 827–838. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(98\)00273-8](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(98)00273-8)
- Lagona, J., Mukhopadhyay, P., Chakrabarti, S., & Isaacs, L. (2005). The Cucurbit[n]uril Family. *Angewandte Chemie International Edition*, 44(31), 4844–4870. <https://doi.org/10.1002/anie.200460675>
- Laycock, H., & Bantel, C. (2019a). Opioid mechanisms and opioid drugs. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*, 20(8), 450–455. <https://doi.org/10.1016/j.mpaic.2019.05.009>
- Le, N. L., Reiter, A., Tomlinson, K., Jones, J., & Moore, C. (2005). The Detection of Oxycodone in Meconium Specimens. *Journal of Analytical Toxicology*, 29(1), 54–57. <https://doi.org/10.1093/jat/29.1.54>
- Lee, J. W., Samal, S., Selvapalam, N., Kim, H.-J., & Kim, K. (2003). Cucurbituril Homologues and Derivatives: New Opportunities in Supramolecular Chemistry. *Accounts of Chemical Research*, 36(8), 621–630. <https://doi.org/10.1021/ar020254k>
- Li, C.-F., Du, L.-M., Wu, W.-Y., & Sheng, A.-Z. (2010). Supramolecular interaction of cucurbit[n]urils and coptisine by spectrofluorimetry and its analytical application. *Talanta*, 80(5), 1939–1944. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.10.049>
- Li, J., Zhang, T., Sun, J., Ren, F., Jia, H., Yu, Z., Cheng, J., & Shi, W. (2022). Synthesis and evaluation of peptide–fentanyl analogue conjugates as dual μ/δ -opioid receptor agonists for the treatment of pain. *Chinese Chemical Letters*, 33(8), 4107–4110. <https://doi.org/10.1016/j.cclet.2021.11.036>
- Li, X., Sun, L., Xu, B., Dai, L., Xiao, Y., Ding, Y., Liu, Q., Meng, M., Xi, R., Guo, L., & Yin, Y. (2023). MOF-gold core-satellite nanostructure based SERS platform for fentanyl detection in multiple complex samples. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 385, 133710. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2023.133710>
- Li, Y., Li, K., Song, G., Liu, J., Zhang, K., & Ye, B. (2013). Electrochemical behavior of codeine and its sensitive determination on graphene-based modified electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 182, 401–407. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.03.023>
- Lian, Z., Lu, C., Sun, Q., Cheng, J., Miao, C., & Chen, Z. (2023). A nonmetal substrate of surface-enhanced Raman spectroscopy for trace fentanyl detection. *Journal of Raman Spectroscopy*, 54(6), 580–586. <https://doi.org/10.1002/jrs.6520>
- Lin, G.-S., Peng, W., Gao, J., Wahlen, A., & Tong, Z. (2023). *Functional naturally derived materials to improve the environment: Chemical structures, modifications, applications, and future perspectives* (pp. 93–144). <https://doi.org/10.1016/bs.aibe.2023.02.001>
- Liu, X., Kukkar, D., Deng, Z., Yang, D., Wang, J., Kim, K.-H., & Zhang, D. (2023). “Lock-and-key” recognizer-encoded lateral flow assays toward foodborne pathogen detection: An overview of their fundamentals and recent advances. *Biosensors and Bioelectronics*, 235, 115317. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2023.115317>
- Long, Y. F., Huang, C. Z., & Li, Y. F. (2007). Hybridization Detection of DNA by Measuring Organic Small Molecule Amplified Resonance Light Scattering Signals. *The Journal of Physical Chemistry B*, 111(17), 4535–4538. <https://doi.org/10.1021/jp066242o>
- Lotfi, A., Karimi, S., & Hassanzadeh, J. (2016a). Preconcentration of codeine in pharmaceutical and human urine samples by multi-walled carbon nanotubes and its spectrophotometric determination. *Canadian Journal of Chemistry*, 94(10), 857–864. <https://doi.org/10.1139/cjc-2016-0312>
- Lotfi, A., Karimi, S., & Hassanzadeh, J. (2016b). Preconcentration of codeine in pharmaceutical and human urine samples by multi-walled carbon nanotubes and its spectrophotometric determination. *Canadian Journal of Chemistry*, 94(10), 857–864. <https://doi.org/10.1139/cjc-2016-0312>
- Lü, J., Lin, J.-X., Cao, M.-N., & Cao, R. (2013). Cucurbituril: A promising organic building block for the design of coordination compounds and beyond. *Coordination Chemistry Reviews*, 257(7–8), 1334–1356. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.12.014>
- Luchansky, M. S., & Bailey, R. C. (2012). High- Q Optical Sensors for Chemical and Biological

- Analysis. *Analytical Chemistry*, 84(2), 793–821. <https://doi.org/10.1021/ac2029024>
- Lyles, M. B., & Cameron, I. L. (2002). Interactions of the DNA intercalator acridine orange, with itself, with caffeine, and with double stranded DNA. *Biophysical Chemistry*, 96(1), 53–76. [https://doi.org/10.1016/S0301-4622\(02\)00036-4](https://doi.org/10.1016/S0301-4622(02)00036-4)
- M. Valcárcel, Luque de Castro (Ed.). (1994). 1 Sensors in Analytical Chemistry. In *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry* (pp. 13–47). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0167-9244\(08\)70004-0](https://doi.org/10.1016/S0167-9244(08)70004-0)
- Ma, G., & Tian, G. (2023). Electrochemical determination of Methadone by use of chitosan and carbon nanostructured electrode: application to doping monitoring between athletes in biological and food samples. *Journal of Food Measurement and Characterization*. <https://doi.org/10.1007/s11694-023-02221-y>
- Malek, A., Amiri, S., & Habibi Asl, B. (2013). The Therapeutic Effect of Adding Dextromethorphan to Clonidine for Reducing Symptoms of Opioid Withdrawal: A Randomized Clinical Trial. *ISRN Psychiatry*, 2013, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2013/546030>
- Mandoj, F., Nardis, S., Di Natale, C., & Paolesse, R. (2018). Porphyrinoid Thin Films for Chemical Sensing. In *Encyclopedia of Interfacial Chemistry* (pp. 422–443). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.11677-4>
- Mashadizadeh, M. H., Abdollahi, G., & Yousefi, T. (2016). SmHCF/multiwalled carbon nanotube modified glassy carbon electrode for the determination of codeine. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 780, 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2016.09.001>
- Masson, E., Ling, X., Joseph, R., Kyeremeh-Mensah, L., & Lu, X. (2012). Cucurbituril chemistry: a tale of supramolecular success. *RSC Adv.*, 2(4), 1213–1247. <https://doi.org/10.1039/C1RA00768H>
- Mehta, B. R., & Reddy, Y. J. (2015). Fire and gas detection system. In *Industrial Process Automation Systems* (pp. 217–235). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800939-0.00005-X>
- Mehta, S., & Sharma, D. (2023). Wearable technology in healthcare engineering. In *Emerging Nanotechnologies for Medical Applications* (pp. 227–248). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91182-5.00005-X>
- Minhas, R. S., Rudd, D. A., Al Hmoud, H. Z., Guinan, T. M., Kirkbride, K. P., & Voelcker, N. H. (2020). Rapid Detection of Anabolic and Narcotic Doping Agents in Saliva and Urine By Means of Nanostructured Silicon SALDI Mass Spectrometry. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 12(28), 31195–31204. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c07849>
- Mishra, S., Raval, M., Singh, V., & Tiwari, A. K. (2023). *Synthetic receptors in medicine* (pp. 303–335). <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2022.09.011>
- Mohammadi, N., Bahmaei, M., & Sharif, A. M. (2021). Highly sensitive CuZnO-Fe₃O₄/rGO modified glassy carbon electrode for the electrochemical determination of acetaminophen, tyrosine and codeine in human blood plasma and urine. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 902, 115768. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2021.115768>
- Mohseni, N., Bahram, M., & Baheri, T. (2017). Chemical nose for discrimination of opioids based on unmodified gold nanoparticles. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 250, 509–517. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.04.145>
- Moksnes, K., Dale, O., Rosland, J. H., Paulsen, Ø., Klepstad, P., & Kaasa, S. (2011). How to switch from morphine or oxycodone to methadone in cancer patients? A randomised clinical phase II trial. *European Journal of Cancer*, 47(16), 2463–2470. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2011.06.047>
- Montes-Navajas, P., González-Béjar, M., Scaiano, J. C., & García, H. (2009). Cucurbituril complexes cross the cell membrane. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 8(12), 1743–1747. <https://doi.org/10.1039/b9pp00041k>
- Montone, C. M., Cerrato, A., Botta, B., Cannazza, G., Capriotti, A. L., Cavaliere, C., Citti, C., Ghirga, F., Piovesana, S., & Laganà, A. (2020). Improved identification of phytocannabinoids using a dedicated structure-based workflow. *Talanta*, 219, 121310. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121310>
- Moore, C., Guzaldo, F., Hussain, M. ., & Lewis, D. (2001). Determination of methadone in urine using ion trap GC/MS in positive ion chemical ionization mode. *Forensic Science International*, 119(2), 155–160. [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(00\)00427-8](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(00)00427-8)
- Moreno-Bondi, M. C., & Benito-Peña, E. (2021). Analytical applications of biomimetic recognition elements — an update. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 413(24), 6059–6061. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03534-x>

- Murata, M., Araki, T., & Nakahara, H. (2001). *Study on J-aggregate formation of a long-chain merocyanine in the mixed LB films and their optical behavior* (pp. 561–564). [https://doi.org/10.1016/S0167-2991\(01\)82153-4](https://doi.org/10.1016/S0167-2991(01)82153-4)
- Mynttinen, E., Wester, N., Lilius, T., Kalso, E., Koskinen, J., & Laurila, T. (2019). Simultaneous electrochemical detection of tramadol and O-desmethyltramadol with Nafion-coated tetrahedral amorphous carbon electrode. *Electrochimica Acta*, 295, 347–353. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2018.10.148>
- Mynttinen, E., Wester, N., Lilius, T., Kalso, E., Mikladal, B., Varjos, I., Sainio, S., Jiang, H., Kauppinen, E. I., Koskinen, J., & Laurila, T. (2020). Electrochemical Detection of Oxycodone and Its Main Metabolites with Nafion-Coated Single-Walled Carbon Nanotube Electrodes. *Analytical Chemistry*, 92(12), 8218–8227. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c00450>
- Narayanasamy, S., Pilli, N. R., Xu, L., Chockalingam, A., Shea, K. I., Stewart, S., Patel, V., Rouse, R., & Matta, M. K. (2019). An alternating polarity switching assay for quantification of oxycodone and topiramate: An application of LC-MS/MS method in support to PK/PD study in rodents. *Journal of Chromatography B*, 1118–1119, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.04.044>
- Nguyen, B. T., & Anslyn, E. V. (2006). Indicator–displacement assays. *Coordination Chemistry Reviews*, 250(23–24), 3118–3127. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.04.009>
- NIH. (2023). *Cancer Pain*. <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/side-effects/pain/pain-hp-pdq>
- O’Neal, C. L., Crouch, D. J., & Fatah, A. A. (2000). Validation of twelve chemical spot tests for the detection of drugs of abuse. *Forensic Science International*, 109(3), 189–201. [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(99\)00235-2](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(99)00235-2)
- Öberg, R., Landström, L., Gracia-Espino, E., Larsson, A., Andersson, M., & Andersson, P. O. (2024). Characterization of carfentanil and thiofentanil using surface-enhanced Raman spectroscopy and density functional theory. *Journal of Raman Spectroscopy*. <https://doi.org/10.1002/jrs.6643>
- Osman, B., Özer, E. T., Demirbel, E., Güçer, Ş., & Beşirli, N. (2013). Synthesis and characterization of L-tryptophan containing microbeads for removal of dimethyl phthalate from aqueous phase. *Separation and Purification Technology*, 109, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2013.02.025>
- Ouchi, R., Nagao, M., Suzuki, S., Yamagata, T., Chiba, M., Kurata, N., Usui, K., Watanabe, T., Koyama, K., & Okada, K. (2024). A case with a trend of QT interval prolongation due to the introduction of methadone to a pancreatic cancer patient on levofloxacin. *Journal of Pharmaceutical Health Care and Sciences*, 10(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s40780-023-00322-w>
- Ozkan, S. A., Kauffmann, J.-M., & Zuman, P. (2015). Electroanalysis in Biomedical and Pharmaceutical Sciences. In *Springer*. <http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-47138-8>
- Pan, J., Cha, T.-G., Chen, H., & Choi, J. H. (2013). Carbon nanotube-based optical platforms for biomolecular detection. In *Carbon Nanotubes and Graphene for Photonic Applications* (pp. 270–303e). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9780857098627.3.270>
- Park, M. O., Moon, M. G., & Kang, T. J. (2013). Fluorescence Enhancement of 7-Diethylamino-4-methylcoumarin by Noncovalent Dipolar Interactions with Cucurbiturils. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 34(5), 1378–1382. <https://doi.org/10.5012/bkcs.2013.34.5.1378>
- Paruli, E. I., Soppera, O., Haupt, K., & Gonzato, C. (2021). Photopolymerization and Photostructuring of Molecularly Imprinted Polymers. *ACS Applied Polymer Materials*, 3(10), 4769–4790. <https://doi.org/10.1021/acsapm.1c00661>
- Pathakoti, K., Manubolu, M., & Hwang, H.-M. (2018). Nanotechnology Applications for Environmental Industry. In *Handbook of Nanomaterials for Industrial Applications* (pp. 894–907). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813351-4.00050-X>
- Paul, A., Banga, I. K., Muthukumar, S., & Prasad, S. (2024). Naloxone-AuNPs@ZIF-8-Based Impedimetric Sensor Platform for Ultrasensitive Detection of Fentanyl and Fabrication of Fen-Track Prototype for Real-Field Analysis. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 16(1), 190–200. <https://doi.org/10.1021/acsami.3c14246>
- Peck, E. M., & Smith, B. D. (2015). *Chapter 1. Applications of Synthetic Receptors for Biomolecules* (pp. 1–38). <https://doi.org/10.1039/9781782622062-00001>
- Perçin, I., Baydemir, G., Ergün, B., & Denizli, A. (2013). Macroporous PHEMA-based cryogel discs for bilirubin removal. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 41(3), 172–177. <https://doi.org/10.3109/10731199.2012.712046>

- Piletsky, S. A., Mijangos, I., Guerreiro, A., Piletska, E. V., Chianella, I., Karim, K., & Turner, A. P. F. (2005). Polymer Cookery: Influence of Polymerization Time and Different Initiation Conditions on Performance of Molecularly Imprinted Polymers. *Macromolecules*, 38(4), 1410–1414. <https://doi.org/10.1021/ma048021r>
- Pizzoferrato, R. (2023). Optical Chemical Sensors: Design and Applications. *Sensors*, 23(11), 5284. <https://doi.org/10.3390/s23115284>
- Poumale, H. M. P., Hamm, R., Zang, Y., Shiono, Y., & Kuete, V. (2013). Coumarins and Related Compounds from the Medicinal Plants of Africa. In *Medicinal Plant Research in Africa* (pp. 261–300). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405927-6.00008-4>
- Pratiwi, R., Noviana, E., Fauziati, R., Carrão, D. B., Gandhi, F. A., Majid, M. A., & Saputri, F. A. (2021a). A Review of Analytical Methods for Codeine Determination. *Molecules*, 26(4), 800. <https://doi.org/10.3390/molecules26040800>
- Pratiwi, R., Noviana, E., Fauziati, R., Carrão, D. B., Gandhi, F. A., Majid, M. A., & Saputri, F. A. (2021b). A Review of Analytical Methods for Codeine Determination. *Molecules*, 26(4), 800. <https://doi.org/10.3390/molecules26040800>
- Rajpurohit, A. S., & Srivastava, A. K. (2019). Simultaneous electrochemical sensing of three prevalent anti-allergic drugs utilizing nanostructured manganese hexacyanoferrate/chitosan modified screen printed electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 294, 231–244. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.05.046>
- Rappleye, M., Wait, S. J., Lee, J. D., Siebart, J. C., Torp, L., Smith, N., Muster, J., Matreyek, K. A., Fowler, D. M., & Berndt, A. (2023). Optogenetic Microwell Array Screening System: A High-Throughput Engineering Platform for Genetically Encoded Fluorescent Indicators. *ACS Sensors*, 8(11), 4233–4244. <https://doi.org/10.1021/acssensors.3c01573>
- Rather, I. A., & Ali, R. (2021). Indicator displacement assays: from concept to recent developments. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 19(27), 5926–5981. <https://doi.org/10.1039/D1OB00518A>
- Razlansari, M., Ulucan-Karnak, F., Kahrizi, M., Mirinejad, S., Sargazi, S., Mishra, S., Rahdar, A., & Díez-Pascual, A. M. (2022). Nanobiosensors for detection of opioids: A review of latest advancements. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 179, 79–94. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2022.08.017>
- Rezaei, B., Irannejad, N., Ensafi, A. A., & Dinari, M. (2016). Application of Modified Carbon Quantum Dots/Multiwall Carbon Nanotubes/Pencil Graphite Electrode for Electrochemical Determination of Dextromethorphan. *IEEE Sensors Journal*, 16(8), 2219–2227. <https://doi.org/10.1109/JSEN.2016.2517005>
- Rezaei, B., Tajaddodi, A., & Ensafi, A. A. (2020a). An innovative highly sensitive electrochemical sensor based on modified electrode with carbon quantum dots and multiwall carbon nanotubes for determination of methadone hydrochloride in real samples. *Analytical Methods*, 12(43), 5210–5218. <https://doi.org/10.1039/D0AY01374A>
- Ricardo Teixeira Tarley, C., de Cássia Mendonça, J., Rianne da Rocha, L., Boareto Capelari, T., Carolyne Prete, M., Cecílio Fonseca, M., Midori de Oliveira, F., César Pereira, A., Luiz Scheel, G., Bastos Borges, K., & Gava Segatelli, M. (2020). Development of a Molecularly Imprinted Poly(Acrylic Acid)-MWCNT Nanocomposite Electrochemical Sensor for Tramadol Determination in Pharmaceutical Samples. *Electroanalysis*, 32(5), 1130–1137. <https://doi.org/10.1002/elan.201900148>
- Rohani Bastami, T., Bayat, M., & Paolesse, R. (2022). Naked-Eye Detection of Morphine by Au@Ag Nanoparticles-Based Colorimetric Chemosensors. *Sensors*, 22(5), 2072. <https://doi.org/10.3390/s22052072>
- Rostamzad, H. (2022). Active and intelligent biodegradable films and polymers. In *Biodegradable Polymers, Blends and Composites* (pp. 415–430). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823791-5.00023-5>
- Sadelain, M. (2016). From Adoptive Immunity to CAR Therapy: An Evolutionary Perspective. In *Encyclopedia of Immunobiology* (pp. 560–568). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374279-7.17023-7>
- Saleh, N., Koner, A. L., & Nau, W. M. (2008). Activation and Stabilization of Drugs by Supramolecular p K a Shifts: Drug-Delivery Applications Tailored for Cucurbiturils. *Angewandte Chemie International Edition*, 47(29), 5398–5401. <https://doi.org/10.1002/anie.200801054>
- Schmidt, H., Al-Ibrahim, A., Dietzel, U., & Bieker, L. (1981). ON THE ACRIDINE AND THIAZINE DYE SENSITIZED PHOTODYNAMIC INACTIVATION OF LYSOZYME—SINGLET

- OXYGEN SELF-QUENCHING BY THE SENSITIZERS. *Photochemistry and Photobiology*, 33(1), 127–130. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1981.tb04310.x>
- Scientific, T. F. (n.d.). *Compound Discoverer Software*.
<https://www.thermofisher.com/tr/en/home/industrial/mass-spectrometry/liquid-chromatography-mass-spectrometry-lc-ms/lc-ms-software/multi-omics-data-analysis/compound-discoverer-software.html>
- Sedgwick, A. C., Brewster, J. T., Wu, T., Feng, X., Bull, S. D., Qian, X., Sessler, J. L., James, T. D., Anslyn, E. V., & Sun, X. (2021). Indicator displacement assays (IDAs): the past, present and future. *Chemical Society Reviews*, 50(1), 9–38. <https://doi.org/10.1039/C9CS00538B>
- Sevilla, F., & Narayanaswamy, R. (2003). Chapter 9 Optical chemical sensors and biosensors (pp. 413–435). [https://doi.org/10.1016/S0166-526X\(03\)80114-9](https://doi.org/10.1016/S0166-526X(03)80114-9)
- Shafaat, Atefeh; Pazoki, Ali ;Faridbod, F. (2023). Lanthanum Cerium Ferrite Nanoparticles for Enhancing Voltammetric Response of a Carbon Paste Electrode to Opioid Methadone. *ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY*, 15, 294–304.
<https://doi.org/10.22034/ABEC.2023.704568>
- Shaikh, M., Mohanty, J., Singh, P. K., Nau, W. M., & Pal, H. (2008). Complexation of acridine orange by cucurbit[7]uril and β -cyclodextrin: photophysical effects and pKa shifts. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 7(4), 408–414. <https://doi.org/10.1039/b715815g>
- Shanbhag, M. M., Manasa, G., Mascarenhas, R. J., Mondal, K., & Shetti, N. P. (2023). Fundamentals of bio-electrochemical sensing. *Chemical Engineering Journal Advances*, 16, 100516.
<https://doi.org/10.1016/j.ceja.2023.100516>
- Shcherbakova, E. G., Zhang, B., Gozem, S., Minami, T., Zavalij, P. Y., Pushina, M., Isaacs, L. D., & Anzenbacher, P. (2017). Supramolecular Sensors for Opiates and Their Metabolites. *Journal of the American Chemical Society*, 139(42), 14954–14960. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b06371>
- Shende, C., Brouillette, C., & Farquharson, S. (2019). Detection of codeine and fentanyl in saliva, blood plasma and whole blood in 5-minutes using a SERS flow-separation strip. *Analyst*, 144(18), 5449–5454. <https://doi.org/10.1039/c9an01087d>
- Shenderovich, I. (2019). The Partner Does Matter: The Structure of Heteroaggregates of Acridine Orange in Water. *Molecules*, 24(15), 2816. <https://doi.org/10.3390/molecules24152816>
- Shimizu, K. D., & Stephenson, C. J. (2010). Molecularly imprinted polymer sensor arrays. *Current Opinion in Chemical Biology*, 14(6), 743–750. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.07.007>
- Siddiqui, M. R., AlOthman, Z. A., & Rahman, N. (2017). Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S1409–S1421.
<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.04.016>
- Simioni, N. B., Oliveira, G. G., Vicentini, F. C., Lanza, M. R. V., Janegitz, B. C., & Fatibello-Filho, O. (2017). Nanodiamonds stabilized in dihexadecyl phosphate film for electrochemical study and quantification of codeine in biological and pharmaceutical samples. *Diamond and Related Materials*, 74, 191–196. <https://doi.org/10.1016/j.diamond.2017.03.007>
- Song, Y., Sun, J., Li, Y., & Zhao, Y. (2022). Electrochemical detection of Methadone by use of poly-L-arginine/carbon nanotubes composite modified carbon paste electrode (P-L-Arg/CNTs/CPE) in human urine. *International Journal of Electrochemical Science*, 17(12), 221239.
<https://doi.org/10.20964/2022.12.43>
- Švorc, L., Sochr, J., Svítková, J., Rievaj, M., & Bustin, D. (2013). Rapid and sensitive electrochemical determination of codeine in pharmaceutical formulations and human urine using a boron-doped diamond film electrode. *Electrochimica Acta*, 87, 503–510.
<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2012.09.111>
- Tuncel, D., & Katterle, M. (2008). pH-Triggered Dethreading–Rethreading and Switching of Cucurbit[6]uril on Bistable [3]Pseudorotaxanes and [3]Rotaxanes. *Chemistry – A European Journal*, 14(13), 4110–4116. <https://doi.org/10.1002/chem.200702003>
- Turiel, E., & Esteban, A. M. (2020). Molecularly imprinted polymers. In *Solid-Phase Extraction* (pp. 215–233). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816906-3.00008-X>
- United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). (1994). Rapid Testing Methods of Drugs of Abuse. In *United Nations Publication*.
https://www.unodc.org/documents/scientific/Rapid_Testing_Methods_of_Drugs_of_Abuse_E.pdf
- Vasapollo, G., Sole, R. Del, Mergola, L., Lazzoi, M. R., Scardino, A., Scorrano, S., & Mele, G. (2011). Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(9), 5908–5945. <https://doi.org/10.3390/ijms12095908>

- Verrinder, E., Wester, N., Leppänen, E., Lilius, T., Kalso, E., Mikladal, B., Varjos, I., Koskinen, J., & Laurila, T. (2021). Electrochemical Detection of Morphine in Untreated Human Capillary Whole Blood. *ACS Omega*, 6(17), 11563–11569. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c00773>
- Vignali, C., Stramesi, C., Morini, L., Pozzi, F., & Groppi, A. (2015). Methadone-related deaths. A ten year overview. *Forensic Science International*, 257, 172–176. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2015.08.017>
- Walker, S., Oun, R., McInnes, F. J., & Wheate, N. J. (2011). The Potential of Cucurbit[n]urils in Drug Delivery. *Israel Journal of Chemistry*, 51(5–6), 616–624. <https://doi.org/10.1002/ijch.201100033>
- Wang, R., Bardelang, D., Waite, M., Udachin, K. A., Leek, D. M., Yu, K., Ratcliffe, C. I., & Ripmeester, J. A. (2009). Inclusion complexes of coumarin in cucurbiturils. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 7(11), 2435. <https://doi.org/10.1039/b903057c>
- Wang, S., Wan, B., Zhang, L., Yang, Y., & Guo, L.-H. (2014). In vitro inhibition of lysine decarboxylase activity by organophosphate esters. *Biochemical Pharmacology*, 92(3), 506–516. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.09.011>
- Warriner, K., & Namvar, A. (2011). Biosensors for Foodborne Pathogen Detection. In *Comprehensive Biotechnology* (pp. 659–674). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00322-6>
- Weingarten, B., Wang, H.-Y., & Roberts, D. M. (1995). Determination of codeine in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 696(1), 83–92. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(94\)01212-W](https://doi.org/10.1016/0021-9673(94)01212-W)
- Wencel, D., Abel, T., & McDonagh, C. (2014). Optical Chemical pH Sensors. *Analytical Chemistry*, 86(1), 15–29. <https://doi.org/10.1021/ac4035168>
- Whalen, K., Finkel, R., & Panavelil, T. A. (Eds.). (2015). *Lippincott Illustrated Reviews: Pharmacology* (Sixth). Wolters Kluwer. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- WHO. (2023). *No Title*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/opioid-overdose>
- Wilcox, P. G., Emmons, E. D., Pardoe, I. J., Kline, N. D., & Guicheteau, J. A. (2023). Quantitative Raman Cross-Sections and Band Assignments for Fentanyl and Fentanyl Analogs. *Applied Spectroscopy*, 77(5), 439–448. <https://doi.org/10.1177/00037028231160565>
- Wong, A., Riojas, A. C., Baena-Moncada, A. M., & Sotomayor, M. D. P. T. (2021). A new electrochemical platform based on carbon black paste electrode modified with α -cyclodextrin and hierarchical porous carbon used for the simultaneous determination of dipyrone and codeine. *Microchemical Journal*, 164. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106032>
- WU, Y., CHENG, Y., ZENG, S., & MA, M. (2003). Determination of dextromethorphan and its metabolite dextrorphan in human urine by capillary gas chromatography without derivatization. *Journal of Chromatography B*, 784(2), 219–224. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)00797-3](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00797-3)
- Xu, F., Testoff, T. T., Wang, L., & Zhou, X. (2020). Cause, Regulation and Utilization of Dye Aggregation in Dye-Sensitized Solar Cells. *Molecules*, 25(19), 4478. <https://doi.org/10.3390/molecules25194478>
- Yan, K., Wang, L., Zhou, H., Hua, Z., Xu, P., Xu, H., Wang, Y., Di, B., & Hu, C. (2022). Cucurbituril-mediated AIE: An unconventional indicator displacement assay for ketamine detection. *Dyes and Pigments*, 197, 109875. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2021.109875>
- Yao, M., Fang, B., Yang, J., Wang, S., & Chen, F. (2024). Simultaneous determination of 14 analgesics in postoperative analgesic solution by HPLC–DAD and LC–MS/MS. *BMC Chemistry*, 18(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s13065-024-01113-6>
- Yence, M., Cetinkaya, A., Çorman, M. E., Uzun, L., Caglayan, M. G., & Ozkan, S. A. (2023). Fabrication of molecularly imprinted electrochemical sensors for sensitive codeine detection. *Microchemical Journal*, 193, 109060. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.109060>
- Yence, M., Cetinkaya, A., Kaya, S. I., & Ozkan, S. A. (2022). Recent Developments in the Sensitive Electrochemical Assay of Common Opioid Drugs. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 0(0), 1–14. <https://doi.org/10.1080/10408347.2022.2099732>
- You, L., Zha, D., & Anslyn, E. V. (2015). Recent Advances in Supramolecular Analytical Chemistry Using Optical Sensing. *Chemical Reviews*, 115(15), 7840–7892. <https://doi.org/10.1021/cr5005524>
- Yu, L. (2014). Opioids. *Reference Module in Biomedical Sciences*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.00248-8>
- Zhang, M., Jin, C., Nie, Y., Ren, Y., Hao, N., Xu, Z., Dong, L., & Zhang, J. X. J. (2021). Silver nanoparticle on zinc oxide array for label-free detection of opioids through surface-enhanced

- raman spectroscopy. *RSC Advances*, 11(19), 11329–11337.
<https://doi.org/10.1039/D1RA00760B>
- Zhang, Q.-W., Li, D., Li, X., White, P. B., Mecinović, J., Ma, X., Ågren, H., Nolte, R. J. M., & Tian, H. (2016). Multicolor Photoluminescence Including White-Light Emission by a Single Host–Guest Complex. *Journal of the American Chemical Society*, 138(41), 13541–13550.
<https://doi.org/10.1021/jacs.6b04776>
- Zhao, Y., Buck, D. P., Morris, D. L., Pourgholami, M. H., Day, A. I., & Collins, J. G. (2008). Solubilisation and cytotoxicity of albendazole encapsulated in cucurbit[n]uril. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 6(24), 4509. <https://doi.org/10.1039/b813759e>
- Ziarani, G. M., Moradi, R., Lashgari, N., & Kruger, H. G. (2018). Introduction and Importance of Synthetic Organic Dyes. In *Metal-Free Synthetic Organic Dyes* (pp. 1–7). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815647-6.00001-7>

